UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Modelización del desarrollo de los depredadores *Nesidiocoris tenuis*, *Macrolophus pygmaeus* y *Orius majusculus* (hemiptera: heteroptera) para la optimización de su manejo como agentes de control biológico de plagas
Autor/es
Héctor Martínez García
Director/es
Vicente Santiago Marco Mancebón y Ignacio Pérez Moreno
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico

Tesis presentada como compendio de publicaciones. La edición en abierto de la misma NO incluye las partes afectadas por cesión de derechos

Modelización del desarrollo de los depredadores *Nesidiocoris tenuis*, *Macrolophus pygmaeus* y *Orius majusculus* (hemiptera: heteroptera) para la optimización de su manejo como agentes de control biológico de plagas, tesis doctoral de Héctor Martínez García, dirigida por Vicente Santiago Marco Mancebón y Ignacio Pérez Moreno (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, 2018
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es

Modelización del desarrollo de los depredadores *Nesidiocoris tenuis*, *Macrolophus pygmaeus* y *Orius majusculus* (Hemiptera: Heteroptera) para la optimización de su manejo como agentes de control biológico de plagas

Tesis Doctoral presentada por **Héctor Martínez García** para optar al título de Doctor en Ingeniería por la Universidad de La Rioja.

Logroño, 2018

ÁREA DE PRODUCCIÓN VEGETAL

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Doctorado universitario en Enología, Viticultura y Sostenibilidad

Modelización del desarrollo de los depredadores *Nesidiocoris tenuis*, *Macrolophus pygmaeus* y *Orius majusculus* (Hemiptera: Heteroptera) para la optimización de su manejo como agentes de control biológico de plagas

Fdo.: **Héctor Martínez García**

Logroño, 2018.

Dr. **Vicente Santiago Marco Mancebón**, Doctor Ingeniero Agrónomo. Profesor Titular de Universidad del área de conocimiento de Producción Vegetal, adscrita al Departamento de Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja

Dr. **Ignacio Pérez Moreno**, Doctor en Ciencias Biológicas. Profesor Titular de Universidad del área de conocimiento de Producción Vegetal, adscrita al Departamento de Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja.

Por la presente declaran que:

La memoria titulada **"Modelización del desarrollo de los depredadores *Nesidiocoris tenuis, Macrolophus pygmaeus* y *Orius majusculus* (Hemiptera: Heteroptera) para la optimización de su manejo como agentes de control biológico de plagas"**, que presenta Héctor Martínez García, Ingeniero Técnico Agrícola, ha sido realizada en la Universidad de La Rioja bajo su dirección y reúne las condiciones específicas para optar al grado de Doctor como compendio de artículos.

Lo que hacen constar en Logroño, a 21 de junio de 2018.

Vº Bº del Director

Vº Bº del Director

Dr. Vicente Santiago Marco Mancebón
Profesor Titular Dto. Agricultura y Alimentación
Universidad de La Rioja

Dr. Ignacio Pérez Moreno
Profesor Titular Dto. Agricultura y Alimentación
Universidad de La Rioja

ARTÍCULOS INCLUIDOS EN LA TESIS

De acuerdo con la normativa vigente en la Universidad de La Rioja (Normativa para la defensa de tesis doctoral en la Universidad de La Rioja, aprobada por Consejo de Gobierno de 3 de noviembre de 2016 y, específicamente con su Capítulo V), la tesis se presenta como compendio de publicaciones científicas. Las referencias completas de las mismas se listan a continuación en orden cronológico por fecha de publicación. Además, se presenta una copia de los artículos en el apartado “compendio de publicaciones”.

La presente tesis se ha configurado partiendo de tres artículos científicos, todos ellos publicados en revistas internacionales incluidas en los listados "Journal of Citation Reports-Science Edition" (JCR) dentro del primer cuartil del área temática “Entomology”. Son los siguientes:

1. Martínez-García, H., L. R. Román-Fernández, M. G. Sáenz-Romo, I. Pérez-Moreno, and V. Marco-Mancebón. 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 106:215-224.
   DOI: 10.1017/S0007485315000978.
   Factor de impacto: 1.758 (año 2016). Q1.

2. Martínez-García, H., M. G. Sáenz-Romo, M. Aragón-Sánchez, L. R. Román-Fernández, E. Sáenz-de-Cabezón, V. Marco-Mancebón, and I. Pérez-Moreno. 2017. **Temperature-dependent development of *Macrolophus pygmaeus* and its applicability to biological control**. BioControl 62:481-493.
   DOI: 10.1007/s10526-017-9798-8.
   Factor de impacto: 1.918 (año 2016). Q1.

3. Martínez-García, Héctor; Aragón-Sánchez, Miguel; Sáenz-Romo, María; Román-Fernández, Luis; Veas-Bernal, Ariadna; Marco-Mancebón, Vicente and Pérez-Moreno, Ignacio. 2018. **Mathematical models for predicting development of *Orius majusculus* and its applicability to biological control**. Journal of Economic Entomology.
   DOI: 10.1093/jee/toy127.
   Factor de impacto: 1.824 (año 2016). Q1.

El autor de esta tesis ha desarrollado en cada uno de los trabajos:

- Diseño de los bioensayos, junto a los directores de tesis.
- Establecimiento y mantenimiento de las poblaciones de las especies de insectos utilizadas en el desarrollo de las investigaciones.
- Diseño y ejecución de los diferentes bioensayos realizados.
- Procesamiento de los datos obtenidos.
- Análisis estadístico, junto a los directores de la tesis.
- Análisis de los resultados de cada bioensayo, junto a los directores de la tesis y con la colaboración del resto de coautores.
- La redacción completa de los artículos, junto a los directores de tesis y la colaboración y aprobación de todos los coautores.

Portada:

Ejemplar adulto de *Nesidiocoris tenuis* en laboratorio.

Ilustraciones:

Todas las fotografías que aparecen en la presente tesis han sido

realizadas por Héctor Martínez García.

AGRADECIMIENTOS

Tras cada puerta abierta, cientos de ellas aparecen en su umbral en una especie de ciclo infinito. Investigar es seguir, perseverar, no esperar metas cercanas y buscar el alimento en cada umbral traspasado, puesto que no hay banquetes finales. A pesar de lo frustrante que puede ser, esta era una enseñanza enorme que necesitaba aprender. Es a ella, a la investigación, a quien le debo mi primer gracias.

Cuando me propuse hacer la tesis buscaba abrir puertas y, más allá de mi interés por la sostenibilidad y el control biológico, tengo claro que elegí Entomología en este Departamento porque quería cruzar puertas. No necesariamente debían ser las más grandes o brillantes, me interesaba más la forma de pasarlas. Quería cruzarlas con respeto, humildad y honestidad. Con amor por lo hecho y por hacer. Con pasión. Por eso decidí que mi doctorado sería en Entomología Aplicada, porque quería cruzar las puertas que me invitase a cruzar Vicente. Es por él por quien empecé, continué y acabé. Es a él a quien le debo todo esto (y no me refiero sólo al doctorado).

A su lado, nunca antes ni después, me topé con el buenhacer, la complicidad y el apoyo constante de Nacho. Si bien no en el origen, sí que ha estado en todo lo demás. Sabiendo que no sé nada, nunca me ha hecho sentir esa realidad, algo que agradezco enormemente. Siempre supe que podía contar contigo para lo que fuera y eso compañero, es enorme.

Durante estos 6 años, muchos han sido los que han puesto su cabeza y sus manos a mi disposición. Rubén, Miguel o María habéis sido imprescindibles. Miguel, Raquel, Ariadna, Eduardo o Bea compañeros de los que nunca quieres prescindir. Y, como las historias largas necesitan motores potentes, uno de los mejores combustibles habéis sido vosotros Javi, Paula, Juli, Gonzalo y Lidia. Caminar junto a gente con tantas ganas y talento, es un placer.

A quienes tan pacientemente habéis limpiado mi pocilga hasta que no lo pareciera. A todos los que sonreís por los pasillos y las cafeterías del CCT. A los compañeros de cafés o cerves. A los chicos de seguridad que siempre abrían la puerta cuando mi dedo no funcionaba a las tantas de la noche.

Y, como no, a todos los daños colaterales. Amigos, papás y compañeros a los que os ha salpicado este lío. A Marta por acompañarme en todo momento y enseñarme a luchar por ser quien quiera ser. A Martín (¡acabamos de confirmar que te vas a llamar así!), por meterme prisa para acabarla y, muy especialmente a Ta. Por sonreír cuando nos tocaba volver de cualquier sitio del mundo para que el señorito pasara a cuidar a sus bichos; por escuchar cien mil veces explicaciones de las que nada entendías pero disimulabas; por tener más paciencia de la que cabe en un cuerpo así de pequeño, pero, sobre todo, por quererme tanto y tan bien.

Héctor. 10 de junio de 2018

ÍNDICE

1. RESUMEN **23**

2. INTRODUCCIÓN **27**

2.1 Sostenibilidad y manejo integrado de plagas **29**

2.1.1 Uso de depredadores en control biológico de plagas 30

2.1.2 Los míridos como enemigos naturales 30

2.1.3 Los antocóridos como enemigos naturales 32

2.2 Enemigos naturales estudiados **33**

2.2.1 *Nesidiocoris tenuis* (Reuter, 1885) 33

2.2.1.1 *Posición taxonómica* 33

2.2.1.2 *Distribución geográfica y hábitat* 34

2.2.1.3 *Morfología y biología* 34

2.2.1.4 *Empleo en control biológico de plagas* 37

2.2.2 *Macrolophus pygmaeus* (Rambur, 1839) 40

2.2.2.1 *Posición taxonómica* 40

2.2.2.2 *Distribución geográfica y hábitat* 40

2.2.2.3 *Morfología y biología* 41

2.2.2.4 *Empleo en control biológico de plagas* 43

2.2.3 *Orius* (Heterorius) *majusculus* (Reuter, 1879) 44

2.2.3.1 *Posición taxonómica* 44

2.2.3.2 *Distribución geográfica y hábitat* 45

2.2.3.3 *Morfología y biología* 45

2.2.3.4 *Empleo en control biológico de plagas* 48

2.3 Modelización del desarrollo de insectos 49

2.3.1 Modelos matemáticos 51

3. JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA 55

4. MATERIALES Y MÉTODOS 59

4.1 Cría masiva de los depredadores 61

4.2 Bioensayos realizados para la modelización a temperaturas constantes 62

4.3 Bioensayos realizados para la determinación de la influencia de la variación intradiaria de la temperatura en el tiempo de desarrollo de los depredadores 64

4.4 Validación de los modelos en condiciones de exterior y determinación de la calidad de la predicción 65

4.5 Análisis estadísticos 66

5. OBJETIVOS 67

6. COMPENDIO DE PUBLICACIONES 71

6.1 Publicación 1. Optimizing *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae) as a biological control agent: mathematical models for predicting its development as a function of temperature **73**

6.2 Publicación 2. Temperature-dependent development of *Macrolophus pygmaeus* and its applicability to biological control **77**

6.3 Publicación 3. Mathematical models for predicting development of *Orius majusculus* and its applicability to biological control **81**

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN **83**

7.1 Supervivencia **85**

7.2 Tiempo de desarrollo **89**

7.3 Modelos ajustados **90**

7.4 Evaluación de los modelos **93**

8. CONCLUSIONES **97**

9. FUTUROS TRABAJOS **103**

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS **107**

1. RESUMEN

El uso de productos fitosanitarios ha contribuido de forma crucial al desarrollo de la agricultura desde mediados del siglo XX. Su alta eficacia inicial, su fácil aplicación y el desconocimiento o el desuso de otras técnicas de control, los mantuvo como la única técnica fiable para el correcto manejo de plagas, patógenos y malas hierbas en los cultivos.

El avance de la agricultura intensiva y la masificación del uso de estos compuestos han acarreado una serie de efectos secundarios, como la eliminación de gran parte de los organismos beneficiosos que ayudan en el control de plagas, la aparición de resistencias, la potenciación de plagas que antes solo eran secundarias, la rápida resurgencia de sus poblaciones, la generación de residuos en los alimentos, riesgos para los aplicadores y serios problemas ambientales. Por todo ello, parece obligado replantearse la sostenibilidad del uso de los productos fitosanitarios, al menos en las condiciones en que se viene haciendo hasta ahora. Es desde esta perspectiva, de donde nace un nuevo marco legislativo y una mayor conciencia social y ambiental, que invitan a la implementación de la Gestión Integrada de Plagas, la cual no exime del uso de productos fitosanitarios, pero da prioridad al uso de técnicas de control alternativas y compatibles entre sí y que cumplan unas mínimas exigencias ecológicas, toxicológicas y económicas.

Una de estas técnicas es el control biológico de plagas. Consiste en la utilización deliberada de ciertos organismos vivos, los enemigos naturales (depredadores, parasitoides o entomopatógenos), cuyo fin es mantener las poblaciones de los fitófagos a niveles tolerables. Generar la máxima cantidad posible de conocimientos sobre estos organismos, que permita una mayor eficacia en su labor de control, es un paso necesario para optimizar su uso.

En el presente trabajo, se han elegido tres depredadores para su estudio. Se trata de los míridos *Nesidiocoris tenuis* y *Macrolophus pygmaeus* y del antocórido *Orius majusculus*. Los tres han demostrado tener un notable potencial de control sobre importantes plagas agrícolas, como moscas blancas, ya sea *Bemisia tabaci* o *Trialeurodes vaporariorum*, pulgones como *Myzus persicae* o polillas como *Tuta absoluta*, en el caso de los míridos, o trips como *Frankliniella occidentalis*, en el del antocórido.

Una de las prioridades que exige el manejo de enemigos naturales es conocer su evolución en los cultivos. Si se consigue llevar a cabo un seguimiento preciso y sencillo de su evolución y fenología en el campo, así como el de sus presas, se podrá realizar una gestión efectiva y tomar las decisiones más eficientes para mantener las poblaciones de las plagas por debajo del Umbral Económico. Una herramienta que capacita para llevar a cabo estos pasos es la modelización del desarrollo de los insectos, que predice con una enorme exactitud la evolución de su desarrollo en

el campo conociendo la temperatura a la que se ven sometidos. Por otra parte, también permite programar la cría masiva de los enemigos naturales en biofábricas, combinando las necesidades de producción con la optimización de la misma a un nivel de exactitud muy elevado.

Los tres depredadores objeto de estudio en la presente tesis han mostrado una enorme adaptabilidad a un amplio rango térmico, con tasas de supervivencia superiores al 80%, en la mayor parte del mismo. Dentro de dicho rango, las condiciones de temperatura más favorables, es decir, aquellas que combinan una alta tasa de desarrollo con una menor mortalidad, oscilan entre 27 y 30 ºC, dato a tener muy en cuenta en su aplicabilidad, especialmente, en su cría masiva. Los umbrales de desarrollo mínimos oscilan entre 2 y 6 ºC, mientras que los máximos varían entre 38 y 43 ºC. *M. pygmaeus* muestra viabilidad en un rango de temperaturas ligeramente más bajo en comparación con *N. tenuis* y *O. majusculus*. El tiempo total de desarrollo desde la puesta hasta alcanzar el estado adulto oscila entre 10 y 90 días, en función de las temperaturas ensayadas. Cabe destacar que, si bien con duraciones de desarrollo similares, *M. pygmaeus* muestra una evolución más lenta a igual temperatura.

Cuando se comparó la duración del desarrollo a una temperatura constante de 24 ºC y a temperaturas variables dentro de un día cuya media era 24 ºC, se comprobó que para ninguno de los tres depredadores había diferencias entre ambos contextos térmicos. Este resultado permite modelizar su crecimiento en cualquiera de los dos regímenes. Con objeto de predecir la evolución del desarrollo de estos enemigos naturales y optimizar así su uso como agentes de control biológico de plagas, se ajustó el modelo matemático lineal y los tres no lineales de Logan tipo III, de Lactin y de Brière. El modelo lineal, con errores en la predicción del desarrollo, sobre todo cuando las temperaturas son elevadas, solo es válido para intervalos de temperaturas medias y situaciones que no exijan excesiva precisión. Los modelos no lineales predicen con mayor exactitud el comportamiento de los insectos en campo, como se ha demostrado al comparar los resultados obtenidos bajo condiciones de exterior con los predichos por los mismos. Si bien destaca ligeramente el modelo de Logan tipo III, los tres modelos son altamente recomendables, especialmente en el caso de *O. majusculus*, para el que la calidad de precisión siempre ha sido superior al 99%.

La información obtenida en el presente documento contribuye de forma significativa al conocimiento y a la optimización del manejo de estos tres importantes depredadores como agentes de control biológico de plagas, tanto en su aplicación práctica en campo como en su cría masiva en biofábricas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 SOSTENIBILIDAD Y MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS

Actualmente, el ser humano se enfrenta a múltiples desafíos. Uno de los principales es el de ser capaz de garantizar el suministro alimentario global a través de una productividad agrícola elevada, pero asegurando la conservación del entorno y la satisfacción de las exigencias sociales, tanto en el medio como en el largo plazo.

El tradicional uso abusivo de la lucha química para el control de las plagas que asolan los cultivos, supone un importante riesgo para esa pretendida sostenibilidad. Así, una mayor conciencia ecológica, un interés creciente de los consumidores por una alimentación sana y libre de residuos tóxicos, o la aparición de resistencias, son razones que, entre otras, han motivado la búsqueda de estrategias de control de plagas que sean no solo rentables, sino también acordes con el objetivo de no perjudicar la salud para el propio ser humano y el entorno en el que habita.

Es en esta perspectiva general donde nace el Manejo Integrado de Plagas (IPM). Se trata de un sistema de apoyo para la selección y el uso de técnicas de control de plagas que, ya sea aplicadas de forma individual o coordinadas armoniosamente, definan una estrategia de manejo que contribuya al control de las poblaciones de fitófagos hasta niveles inferiores a los que causan daño económico, a la vez que considere los intereses de la sociedad y el respeto por el medio ambiente (Kogan 1998; Kogan y Shenk 2002). Siguiendo esta pretensión, aparece el Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, que propone un uso sostenible de los productos fitosanitarios. El objetivo principal es “establecer el marco de acción para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios mediante la reducción de los riesgos y los efectos del uso de los productos fitosanitarios en la salud humana y el medio ambiente, y el fomento de la gestión integrada de plagas y de planteamientos o técnicas alternativos, tales como los métodos no químicos”.

Uno de los pilares fundamentales del IPM es el desarrollo y la preferencia en la utilización de los métodos biológicos frente a los métodos químicos y, en cualquier caso, la compatibilización de los mismos. El control biológico de plagas se puede definir como la utilización de organismos vivos para reducir las poblaciones 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.

Para estos autores, el control biológico de plagas se puede llevar a cabo de acuerdo a tres estrategias diferentes. Son las siguientes:

i. Inoculativa, clásica o de importación. Se basa en la introducción deliberada de enemigos naturales exóticos en la zona donde se ubica la plaga diana. Se pretende su instalación y mantenimiento en el medio y largo plazo.

ii. Inundativa. Consiste en recoger, criar de forma masiva y liberar periódicamente grandes cantidades de un enemigo natural para conseguir el control inmediato de la plaga objetivo.

iii. De conservación. Pretende el correcto manejo del ambiente para mejorar la eficacia de los enemigos naturales ya presentes en la zona, ofreciéndoles las mejores condiciones posibles de alimentación, huéspedes alternativos o refugios y, a la vez, eliminando o disminuyendo la presencia de productos fitosanitarios u otros elementos perjudiciales para su mantenimiento en el cultivo o recurriendo a prácticas culturales que no perjudiquen su óptimo desarrollo.

El control biológico es una herramienta imprescindible, no solo por lo que implica en un marco sostenible, sino por las actuales demandas de los consumidores, más concienciados con el cuidado del medio ambiente y la calidad y seguridad de los productos alimentarios. Por ello, el buen conocimiento de los enemigos naturales que controlen o, cuanto menos, ayuden al control de esas plagas, parece una necesidad crucial en ese contexto.

Los enemigos naturales de plagas, sean depredadores, parasitoides o entomopatógenos requieren de una serie de requisitos para su aplicabilidad. Entre estas características deseables para cualquier enemigo natural se pueden destacar las siguientes: 1) buena acción letal sobre poblaciones plaga concretas, con las que mantengan una sincronía en sus ciclos estacionales; 2) voracidad; 3) alta capacidad de búsqueda; 4) rápida adaptación a las densidades de las poblaciones plaga que permita un control rápido; 5) coste económico asumible para el agricultor, así como 6) una sencilla cría masiva en biofábrica. La presente tesis se centra en el estudio de la influencia de la temperatura en diversos aspectos relacionados con la biología de tres especies de insectos depredadores utilizados habitualmente en control biológico de plagas.

2.1.1 Uso de depredadores en control biológico de plagas

Las especies depredadoras de plagas se distribuyen entre un variado espectro de órdenes y familias dentro de las clases Insecta y Arachnida. La presente tesis se centra en el orden Hemiptera, uno de los más destacados en control biológico de plagas. Este orden engloba, a su vez, varias familias nombradas de forma recurrente en control biológico de plagas, caso de la familia Pentatomidae, en la que destaca la especie *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851), que se alimenta de larvas de lepidópteros; o de la familia Nabidae, con *Nabis pseudoferus* Remane, 1949, depredador de pulgones, larvas y huevos de lepidópteros, como principal exponente. Sin embargo, por su interés comercial y su papel en IPM, destacan especialmente dos familias: Miridae y Anthocoridae. Ambas familias se caracterizan por incluir especies de depredadores ágiles, activos buscadores de presas y, normalmente, muy voraces. Suelen alimentarse de todos los estados de desarrollo de sus presas (huevo, larva o ninfa, pupa y adulto), aunque se evidencian preferencias por parte de cada depredador en función de la especie presa ingerida.

2.1.2 Los míridos como enemigos naturales

Si bien se trata de una familia a la que pertenecen numerosas especies herbívoras, incluye también un buen número de especies de gran interés como depredadoras. Estas últimas manifiestan en muchos casos un régimen alimenticio mixto zoófago y fitófago (Dolling 1991), siendo precisamente ese consumo de tejidos vegetales uno de los aspectos que suscita más interés de esta familia. El motivo es que, en algunos casos, se han registrado daños en el cultivo, como ocurre con *Nesidiocoris tenuis* (Reuter, 1895). Varios autores, como Sánchez *et al*. (2009), informan de perjuicios en cultivos de tomate, judía, berenjena o pimiento, que se manifiestan por la presencia de anillos necróticos en hoja o en los pecíolos florales, pudiendo provocar aborto floral e importantes mermas económicas para el agricultor. No ocurre lo mismo con otras especies de la familia, como *Macrolophus pygmaeus* (Rambur, 1839), para la que no parecen evidenciarse daños en los cultivos en los que se libera (Castañé *et al*. 2011).

Entre las presas más destacadas de los míridos se encuentran moscas blancas, lepidópteros de gran interés hortícola, como *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae), trips, ácaros o pulgones. Depredadores voraces y ávidos buscadores de presas, su principal limitación es conseguir un correcto establecimiento en los cultivos (Trottin-Caudal y Millot 1994). No obstante, su interés está ampliamente demostrado, como se aprecia en la extensa distribución comercial alcanzada por especies como *Macrolophus melanotoma* (A. Costa, 1853), *Dicyphus hesperus*

Knight, 1943, *Dicyphus tamaninii* Wagner, 1951 o las dos que recoge la presente tesis *N. tenuis* y *M. pygmaeus*.

El género *Nesidiocoris* Kirkaldy, 1902, está formado exclusivamente por la especie *N. tenuis*, de la que se hablará posteriormente de forma detallada.

El género *Macrolophus* Fieber, 1858 incluye una quincena de especies depredadoras polífagas que, si bien muestran una preferencia por las ninfas de moscas blancas, incluyen también en su dieta huevos y larvas de trips, lepidópteros, pulgones o ácaros, además de completarla con una fitofagia que no llega a producir daños significativos en los cultivos (Malais y Ravensberg 1992). Además de la especie estudiada en la presente tesis, *M. pygmaeus*, de la que se hablará más en profundidad posteriormente, destaca *M. melanotoma*, una buena consumidora de moscas blancas.

2.1.3 Los antocóridos como enemigos naturales

Dentro de la familia Anthocoridae se han descrito algo más de 500 especies, muchas de las cuales son depredadoras de pequeño tamaño, no más de 6 mm, y que destacan por su enorme polifagia basada, principalmente, en el consumo de trips, pulgones, moscas blancas, ácaros, psílidos y huevos y larvas de lepidópteros. Formidables buscadores, con una buena capacidad de dispersión y concentración, y facilidad para el incremento poblacional en presencia de alimento, son una de las familias más utilizadas a nivel comercial en el contexto del IPM (Saulich y Musolin 2009).

Dos géneros destacan sobremanera. Uno de ellos es *Anthocoris* Fallen, 1814, dentro del cual sobresalen las especies *Anthocoris nemoralis* (Fabricius, 1794), *A. nemorum* (Linnaeus, 1761) y *A. confusus* Reuter, 1884. El otro gran género es *Orius* Wolff, 1811, con especies de gran relevancia como *O. laevigatus* (Fieber, 1860), *O. insidiosus* (Say 1832), *O. albidipennis* (Reuter 1884), *O. niger* (Wolff, 1811) y *O. majusculus* (Reuter, 1879). Si bien aparecen de forma espontánea en numerosos cultivos, su manifiesto interés como agentes de control biológico de plagas hace que estén presentes en los catálogos de un buen número de empresas comercializadoras de enemigos naturales.

El género *Orius* incluye depredadores de pequeño tamaño que, como ocurre con el resto de heterópteros depredadores, se alimentan de los jugos que extraen de sus presas al introducir su aparato bucal en el interior de huevos, ninfas (o larvas), pupas y/o adultos de un amplio abanico de presas que incluye pulgones y lepidópteros, pero, especialmente, ácaros y trips. Su dieta, en

ausencia de presas, puede ser fitófaga, consumiendo polen o savia de las plantas (Lattin 1999). Varias de sus especies han demostrado ser altamente eficaces en el control de plagas, ya sea de forma individual o en liberaciones conjuntas.

2.2 ENEMIGOS NATURALES ESTUDIADOS

2.2.1 *Nesidiocoris tenuis* (Reuter, 1885)

2.2.1.1 Posición taxonómica

De acuerdo con los datos proporcionados por Fauna Europaea (Fauna Europaea 2016), *N. tenuis* se ordena taxonómicamente de la siguiente forma:

Regnum	Animalia
Subregnum	Eumetazoa
Phyllum	Arthropoda
Subphylum	Hexapoda
Clase	Insecta
Orden	Hemiptera
Suborden	Heteroptera
Infraorden	Cimicomorpha
Superfamilia	Miroidea
Familia	Miridae
Subfamilia	Bryocorinae
Tribu	Dicyphini
Género	*Nesidiocoris*
Especie	*N. tenuis*

Sinonimia: *Cyrtopeltis tenuis* Reuter, 1895.

2.2.1.2 Distribución geográfica y hábitat

En Europa, *N. tenuis* se encuentra en la cuenca mediterránea y en otras áreas de clima similar, donde aparece de forma espontánea (Figura 1). Este depredador está asociado a cultivos hortícolas propios del Mediterráneo, tanto al aire libre como en invernadero, donde suele encontrar las condiciones climáticas, alimentarias y de refugio que demanda, con preferencia por los cultivos que muestran pilosidad, como el tomate (*Solanum lycopersicum*) o la berenjena (*Solanum melongena*), pero también presente en muchos otros, como la judía (*Phaseolus vulgaris*), el pimiento (*Capsicum* spp.) o diversas cucurbitáceas. No se debe olvidar que también se hospeda en plantas espontáneas, como la olivarda (*Dittrichia viscosa*), que actúan como reservorio, o su presencia en especies ornamentales (Arnó y Gabarra 2011; Castañé *et al.* 2011).

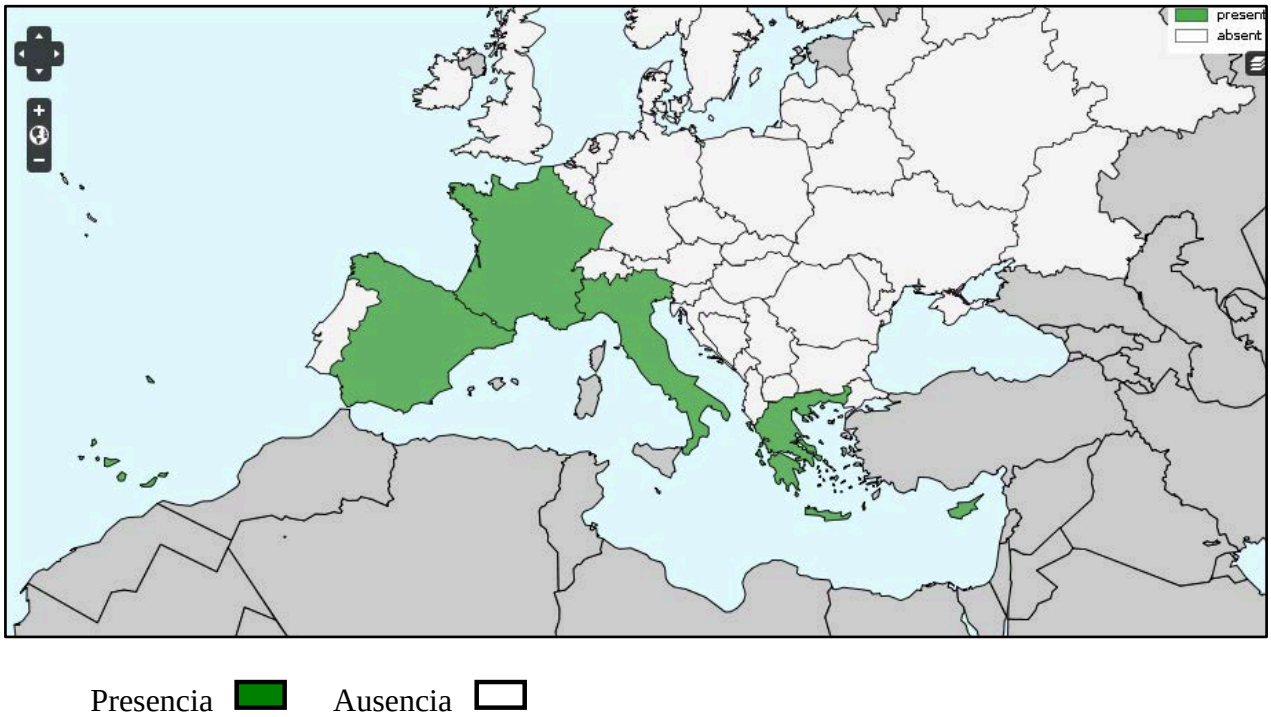


Figura 1. Distribución geográfica de *N. tenuis* en Europa (Fauna Europaea 2016).

2.2.1.3 Morfología y biología

N. tenuis es un hemíptero y, por lo tanto, un insecto de desarrollo heterometábolo cuyo ciclo biológico completo comienza con el estado de huevo, continua con el de ninfa (que incluye a su vez estadios ninfales) para, finalmente, pasar al estado adulto (Figura 2).

Figura 2. Ciclo de desarrollo de *N. tenuis.*

El ciclo biológico comienza con la inserción del huevo por parte de la hembra en el interior del tejido vegetal. De menos de 1 mm de longitud y con forma de saco alargado, la localización del huevo es difícilmente visible desde el exterior, ya que incluso el opérculo es complicado de distinguir bajo microscopio estereoscópico (Rozenberg *et al.* 2015).

Las ninfas evolucionan pasando por cinco estadios (N1 a N5) en los que el tamaño va incrementándose y variando su coloración. Son muy activas desde los primeros estadios y únicamente en el momento de la muda son quiescentes. Las exuvias son transparentes. En el penúltimo y, muy especialmente, en el último estadio ninfal, se reconocen claramente los vestigios alares. Ya como N5, se puede diferenciar a simple vista el sexo del individuo. Los machos presentan un último segmento abdominal más estrecho y fino, así como una zona oscurecida justo al final del abdomen. Las hembras, con un abdomen más engrosado, muestran claramente el ovipositor plegado que recorre sus últimos segmentos abdominales. Esas diferencias se mantienen en el estado adulto. El tamaño de las hembras es ligeramente superior al de los machos (Figura 3).

Una vez completado su desarrollo, los adultos alcanzan una longitud de unos 4 mm; muestran unos hemiélitros traslúcidos, provistos de muy fina pilosidad y con un característico

patrón de coloración oscura simétrico. Con el cuerpo de color verde claro, también muestra ese oscurecimiento en la base y el extremo de las tibias, los tarsos y los diferentes artejos de sus antenas, así como en la inserción entre la cabeza y el tórax. Dichas manchas negras permiten diferenciar claramente a esta especie de otros míridos como *M. pygmaeus*. Los ojos compuestos se tornan igualmente oscuros, diferenciándose del rojo propio del estado ninfal (Goula y Alomar 1994).

Figura 3. Dimorfismo sexual de los adultos de *N. tenuis*.

N. tenuis es una especie polígama. La cópula es tanto nocturna como diurna y la hembra es fácilmente accesible para el macho. Tras una elección de hembra, aparentemente al azar, se inicia una breve persecución que puede finalizar en cópula. En ese caso, ambos ejemplares permanecen unidos en sentidos opuestos, sea estáticos o con la hembra andando y arrastrando al macho (Figura 4). La duración de la cópula puede alargarse hasta las tres horas (Franco 2010).

Figura 4. Cópula de *N. tenuis*.

Una vez alcanzado el estado adulto, la posibilidad de realizar puestas requiere de la superación de un periodo de preoviposición de duración variable, entre los 3 y los 7 días (El-Dessouki *et al*. 1976). Otro parámetro reproductivo, variable en función, entre otros factores, de la planta huésped y de las condiciones de la presa, es la fecundidad, que oscila entre 1 y 4,6 huevos por hembra y día. Los adultos llegan a vivir entre 16 y 25 días (Calvo y Urbaneja 2003).

2.2.1.4 Empleo en control biológico de plagas

N. tenuis es un depredador polífago que basa su alimentación en ninfas de moscas blancas, tanto *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856) (Hemiptera: Aleyrodidae) como *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae), trips (*Frankliniella occidentalis* (Pergande, 1895) (Thysanoptera: Thripidae)), pulgones (*Myzus persicae* Sulzer, 1776 (Hemiptera: Aphididae)), huevos y larvas jóvenes de lepidópteros y ácaros (Urbaneja 2003; Calvo *et al*. 2009; Castañé *et al.* 2011; Moreno-Ripoll *et al.* 2012; Pérez-Hedo y Urbaneja 2014). De movimientos rápidos, especialmente la N5 y el estado adulto, detecta la presa y clava su estilete en ella para succionar sus jugos internos (Calvo y Urbaneja 2004).

Un aspecto claramente diferenciador de *N. tenuis* es su condición de fitófago. Es capaz de alimentarse de las plantas huésped donde habita, como ocurre en el caso de tomate, alubia, berenjena o pimiento, causando anillos necróticos en hojas y pecíolos, aborto floral y punteaduras en frutos (Urbaneja *et al.* 2005; Arnó *et al.* 2006; Sánchez 2009). La gravedad de los daños causados está directamente relacionada con la proporción presa/depredador y, por lo tanto, es un aspecto de enorme importancia a la hora de definir los tiempos en los programas de control (Sánchez 2009).

Los primeros estudios de *N. tenuis* como depredador se centraron en el control de la mosca blanca, *B. tabaci*. Los trabajos se centraron en la conservación y/o aumento de sus poblaciones en zonas en las que el chinche aparece de forma espontánea en cultivos al aire libre y mínimamente tratados (Sánchez *et al.* 2009).

En la constante búsqueda de una mayor eficacia y de un menor coste económico del tratamiento, Calvo *et al.* (2012) inocularon adultos jóvenes de *N. tenuis* en la propia planta de tomate aún en vivero, para el control de poblaciones de *B. tabaci*. No sólo consiguieron la rápida aparición de los adultos del depredador en el cultivo, sino que también consiguieron mayores densidades poblacionales respecto a cuando la liberación se llevaba a cabo directamente sobre el

mismo. Para evitar daños en el cultivo por la propia fitofagia de esta especie, a la vez que asegurar un buen control de la plaga, estos autores recomendaron liberar densidades de 0,5 y 1 ejemplares de *N. tenuis* por planta de tomate.

Pero el interés del mírido y su capacidad de control de especies plaga no se limita a las moscas blancas. Una especie plaga que ha generado un enorme interés es la polilla del tomate, *T. absoluta*. Se trata de una plaga procedente de Sudamérica que fue detectada en Europa en 2006. Aunque afecta a otros cultivos hortícolas, sus ataques en tomate son altamente perjudiciales. En los últimos años se han realizado varias investigaciones en busca de su control efectivo, sea con *N. tenuis* en exclusiva o combinado con otros enemigos naturales. Así, Mollá *et al.* (2009) liberaron *M. pygmaeus* y *N. tenuis* de forma conjunta. La reducción obtenida en la infestación de las hojas por parte de *T. absoluta* oscilaba entre el 75% y el 97%, y entre el 56% y 100% en el caso de los frutos.

En plantaciones de tomate, y para el control de moscas blancas, las estrategias aumentativas recomiendan liberar entre 1 y 2 individuos de *N. tenuis* por m^2, de manera que se consigan resultados satisfactorios con mínimos costes y riesgos para el cultivo (Calvo y Urbaneja 2004). El problema reside en que, para su correcta implantación, y con ello para el control total de la plaga, se requieren entre 5 y 8 semanas. Este inconveniente parece solucionarse con la preinoculación del agente en el propio vivero (Calvo *et al.* 2012), especialmente cuando las temperaturas no proporcionan un ambiente óptimo para su desarrollo. Las técnicas de preinoculación han sido probadas con éxito en varias ocasiones. Así, por ejemplo, Calvo *et al.* (2012) establecieron poblaciones de *N. tenuis* en planta de tomate aún en vivero, con densidades de 0,5 ejemplares por planta, y con un complemento de huevos de *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) para favorecer la supervivencia del depredador hasta que la plaga alcanzase niveles poblacionales suficientes. El control de la población de *T. absoluta* fue satisfactorio en cultivo de invernadero. Experiencias similares al aire libre han obtenido resultados igualmente eficaces en Israel (Urbaneja *et al.* 2012). Por contra, esta técnica requiere un buen manejo de las densidades inoculadas puesto que, en ausencia de presas, su capacidad fitófaga puede ocasionar daños en el propio cultivo.

En el control de plagas como *T. absoluta* se ha combinado el empleo de *N. tenuis* con tratamientos del microinsecticida *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 (Bacillales: Bacillaceae) (Mollá *et al.* 2011) o con tratamientos químicos, como puede ser azufre (Zappalá *et al.* 2011). El ataque combinado con la bacteria entomopatógena se muestra más eficaz puesto que, mientras *B.*

thuringiensis actúa sobre las larvas de la plaga, el mírido prefiere los huevos. Sin embargo, además de un buen diseño, lograr una buena eficacia exige conocer otros factores. Hacer coincidir el momento de mayor voracidad de *N. tenuis* con el de mayor susceptibilidad de la plaga, *T. absoluta*, es garantía de un tratamiento más efectivo y, por lo tanto, de un mayor rendimiento para el cultivo.

N. tenuis requiere de un buen número de presas para poder asentarse y ser una herramienta verdaderamente útil en el control biológico (Calvo *et al.* 2009). Las sueltas deben hacerse, por lo tanto, cuando la plaga muestra un nivel poblacional suficiente. Este requerimiento redunda en otro de los pilares del IPM, que es la aplicación de tratamientos sólo una vez alcanzado el Umbral Económico. Además, se evitarán posibles daños sobre el cultivo por ausencia de presa. En liberaciones de varios depredadores es crucial tomar este aspecto en consideración. Así, se pueden encontrar casos de fracaso en el control de la mosca blanca, *B. tabaci*, cuando se usa un depredador como *Eretmocerus mundus* (Mercet, 1931) (Hymenoptera: Aphelinidae) y posteriormente *N. tenuis*, precisamente por esa ausencia de una densidad de presa suficiente (Calvo *et al.* 2009). Por otra parte, los míridos tienden a colonizar los cultivos exentos de insecticidas de amplio espectro (Gabarra *et al.* 2004), factor que debe ser considerado a la hora de establecer estrategias de implantación.

2.2.2 *Macrolophus pygmaeus* (Rambur, 1839)

2.2.2.1 Posición taxonómica

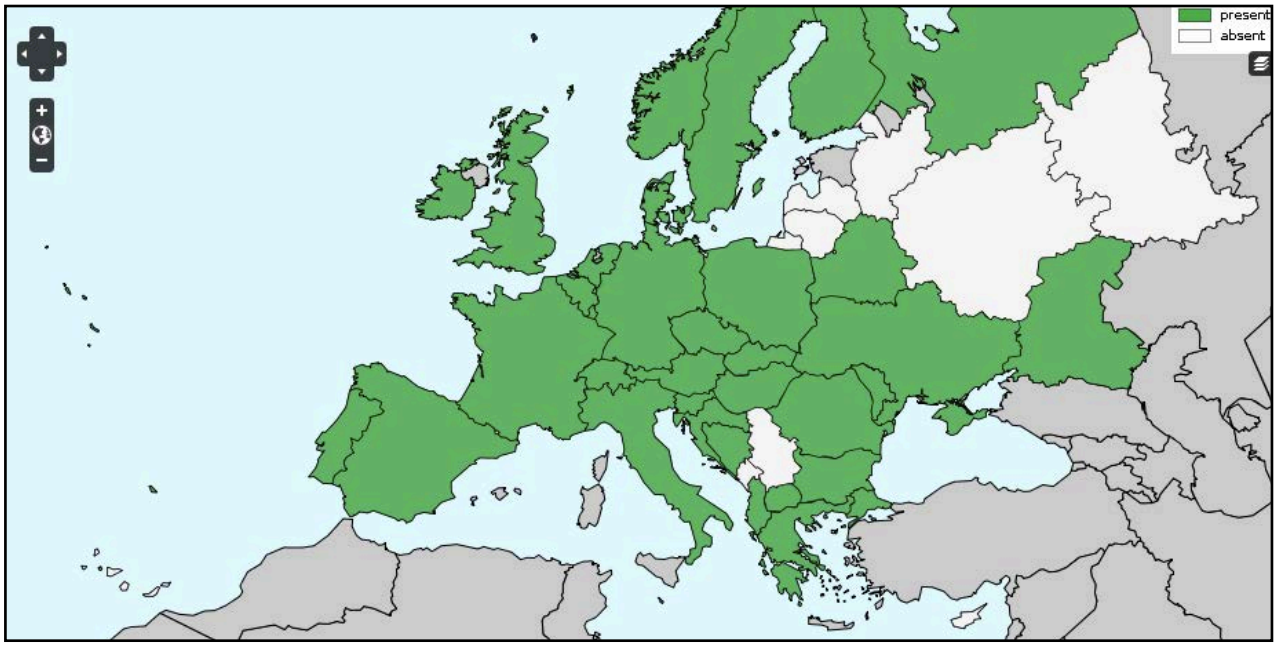
De acuerdo con los datos proporcionados por Fauna Europaea (Fauna Europaea, 2016), *M. pygmaeus* se ordena taxonómicamente a de la siguiente forma:

Regnum	Animalia
Subregnum	Eumetazoa
Phyllum	Arthropoda
Subphylum	Hexapoda
Clase	Insecta
Orden	Hemiptera
Suborden	Heteroptera
Infraorden	Cimicomorpha
Superfamilia	Miroidea
Familia	Miridae
Subfamilia	Bryocorinae
Tribu	Dicyphini
Género	*Macrolophus*
Especie	*M. pygmaeus*

Sinonimia: *Phytocoris pygmaeus* Rambur, 1839

2.2.2.2 Distribución geográfica y hábitat

M. pygmaeus es un mírido polífago que aparece de forma espontánea en cultivos de tomate, berenjena, patata, pimiento o alubia de la región mediterránea, de donde es nativo (Urbaneja *et al.* 2012). Su presencia en el norte de Europa también está claramente documentada (Figura 5).



Presencia Ausencia

Figura 5. Distribución geográfica de *M. pygmaeus* en Europa (Fauna Europaea 2016).

2.2.2.3 Morfología y biología

Tal y como ocurre con *N. tenuis*, el desarrollo de *M. pygmaeus* es de tipo heterometábolo y su ciclo biológico completo consta de los estados de huevo, ninfa (con cinco estadios ninfales) y adulto (Figura 6).

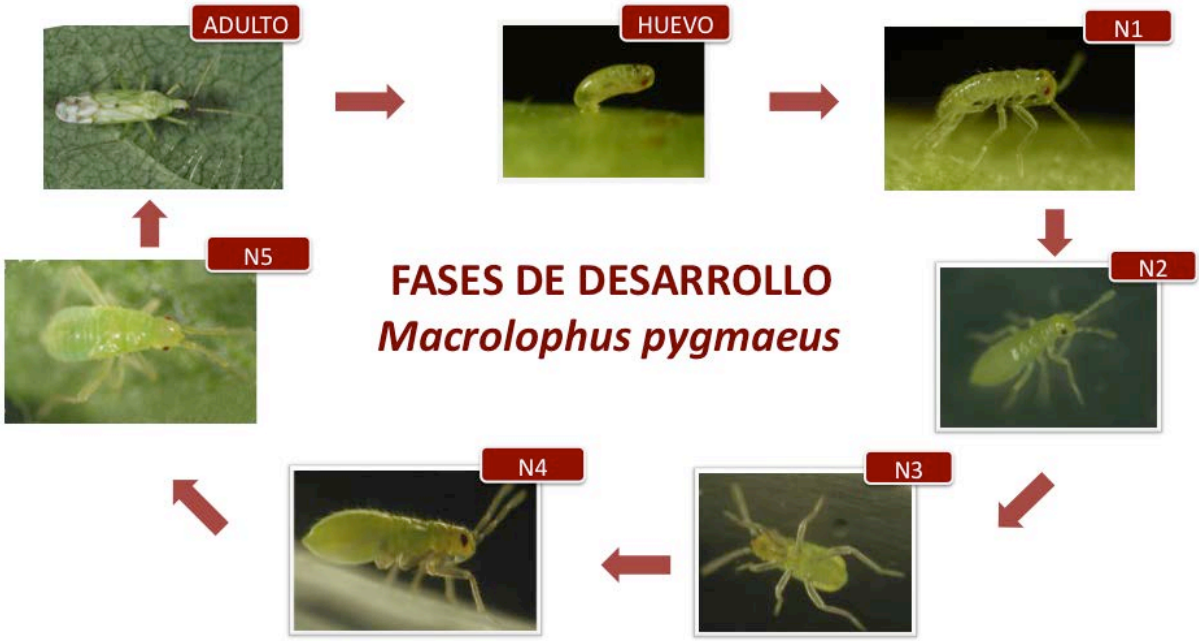


Figura 6. Ciclo de desarrollo de *M. pygmaeus*.

El ciclo de desarrollo de *M. pygmaeus* es muy similar al del resto de míridos. No existen diferencias sustanciales con el ciclo ya explicado para *N. tenuis*. La identificación de los huevos, depositados en el interior del tejido vegetal, es igualmente complicada por no apreciarse con facilidad ni seguridad la presencia del opérculo desde el exterior. Dichos huevos, muestran una forma de saco encorvado de 0,97 mm de longitud y un diámetro aproximado de 0,24 mm (Constant *et al.* 1994).

Donde sí existen diferencias es en la morfología de ambos depredadores. De tamaño similar en estado adulto, 3-4 mm, las principales diferencias residen en la ausencia en *M. pygmaeus* de manchas oscuras en hemiélitros, tibias, tarsos, antenas y del anillo del margen anterior al pronoto descritos para *N. tenuis*. Además, *M. pygmaeus* presenta un color verde ligeramente más claro, tanto dorsal como ventralmente (Figura 7) (Goula y Alomar 1994; Castañé *et al.* 2013).

Figura 7. Adulto de *M. pygmaeus.*

M. pygmaeus es un depredador con régimen alimentario mixto. De preferencia zoófaga, cuando la densidad de presa es baja recurre en mayor grado a la fitófaga, pudiendo sobrevivir exclusivamente del alimento que le proporciona la savia de las plantas huésped (Perdikis y Lykouressis 2000). En este aspecto, la gran diferencia con *N. tenuis* reside en que no parece que los daños generados por su fitofagia sean relevantes para el rendimiento del cultivo del que se alimenta (Castañé *et al.* 2011).

La hembra no acepta con facilidad al macho. Por ello, la proporción entre machos y hembras es un factor a tener en cuenta en su cría masiva. La cópula es preferentemente nocturna y tiene una duración inferior a los cuatro minutos. Los machos pueden volver a acoplarse, pero las hembras parecen evitar nuevas cópulas durante unas tres semanas (Gemeno *et al.* 2007).

2.2.2.4 Empleo en control biológico de plagas

M. pygmaeus es una especie con un enorme potencial en su utilización como enemigo natural. A su amplio rango de huéspedes se debe añadir su gran voracidad y, tal como ya se ha comentado, una menor incidencia de su fitofagia sobre el cultivo.

Se trata de un depredador polífago que contribuye al control de moscas blancas, tanto *T. vaporariorum* como *B. tabaci*, polillas como *T. absoluta*, trips como *F. occidentalis*, pulgones como *M. persicae*, o ácaros como *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) (Hansen *et al.* 1999; Urbaneja *et al.* 2012). Su interés como depredador, tal y como ocurre con *N. tenuis*, parece quedar claramente demostrado con su presencia en el catálogo de la inmensa mayoría de las empresas especializadas en control biológico de plagas. Su empleo se recomienda en solitario, solapado con otras especies o realizando un programa combinado con productos fitosanitarios compatibles u otros agentes de control.

El uso de *M. pygmaeus* como enemigo natural está ampliamente consolidado desde los años 90, tanto en cultivos al aire libre, como en invernadero (Van Lenteren 2003). Desde entonces, es una especie muy utilizada en programas de IPM por su amplio abanico de presas de relevancia agrícola y a pesar de su sensibilidad a la presencia de productos fitosanitarios en las parcelas donde se libera (Gabarra *et al.* 2004).

Como enemigo natural, comenzó a utilizarse para el control de moscas blancas (Arnó *et al.* 2009). En los últimos años, se ha intensificado mucho su uso gracias al elevado interés que la especie ofrece para el control de *T. absoluta*, plaga que, como se ha mencionado anteriormente, asola los cultivos de tomate de toda la cuenca mediterránea. La lucha química tradicional contra este fitófago exótico choca con los pilares del IPM, a lo que hay que añadir que el riesgo de aparición de resistencias es elevado, como así ha sido ya citado en los países de donde procede (Bielza 2010; Siqueira *et al.* 2001). Sea de forma exclusiva, en combinación con otros agentes de control, como el propio *N. tenuis* u otros como *B. thuringiensis*, *M. pygmaeus* ha demostrado ser un depredador altamente eficaz contra la polilla del tomate, con reducciones del daño de hasta el 80% en hojas y el 95% en frutos jóvenes (Arnó *et al.* 2009).

Estrategias tales como el uso de preinoculación en plantas de vivero o el uso de plantas banco (*banker plants*) persiguen un reparto más homogéneo del depredador en la parcela cultivada (Arnó *et al.* 2000; Lenfant *et al.* 2000). Programar la evolución del desarrollo de los enemigos naturales que se inoculan en vivero, es un factor que necesita ser controlado para su óptima

evolución y adaptación en el cultivo una vez instalado en invernadero. Esta inoculación es otra de las estrategias utilizadas con *M. pygmaeus*, así, por ejemplo, Avilla *et al.* (2004) realizaron liberaciones inundativas aumentativas en semillero de 1-2 adultos por m^2 para consolidar poblaciones naturales.

2.2.3 *Orius majusculus* (Reuter, 1879)

2.2.3.1 Posición taxonómica

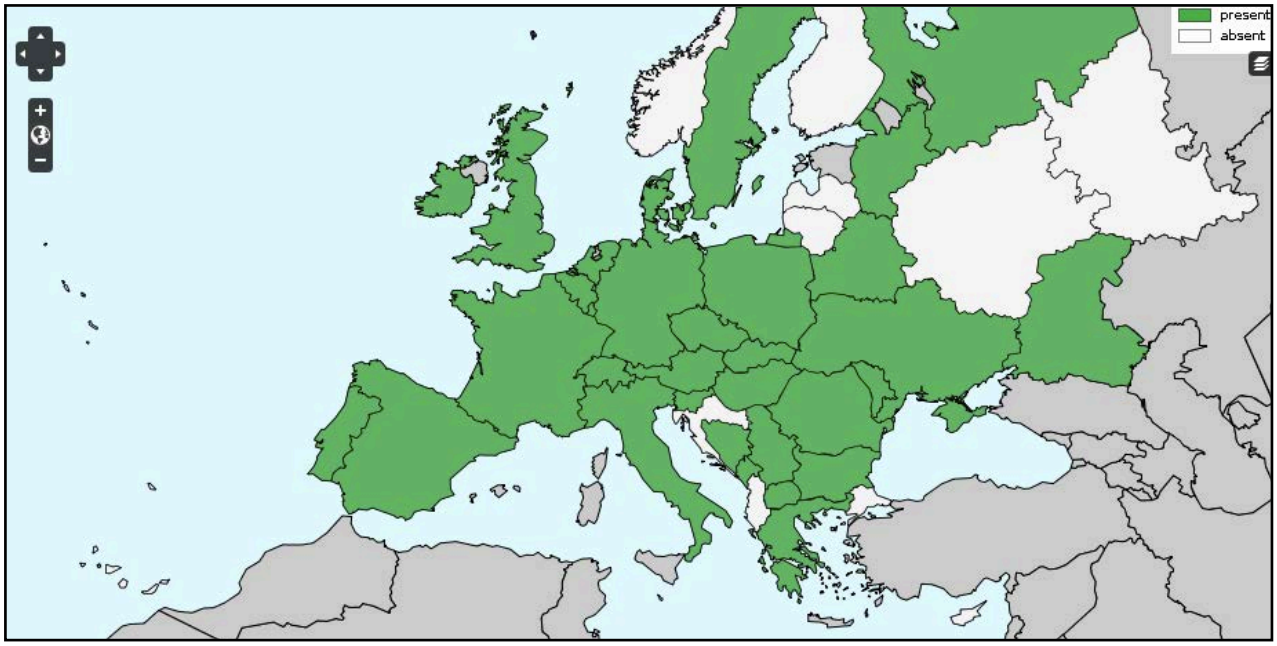
De acuerdo con los datos proporcionados por Fauna Europaea (Fauna Europaea 2016), *O. majusculus* se ordena taxonómicamente de la siguiente forma:

Regnum	Animalia
Subregnum	Eumetazoa
Phyllum	Arthropoda
Subphylum	Hexapoda
Clase	Insecta
Orden	Hemiptera
Suborden	Heteroptera
Infraorden	Cimicomorpha
Superfamilia	Cimicoidea
Familia	Anthocoridae
Subfamilia	Anthocorininae
Tribu	Oriini
Género	*Orius*
Subgénero	*Heterorius*
Especie	*Orius (Heterorius) majusculus*

Sinonimia: *Triphleps majusculus* Reuter, 1879.

2.2.3.2 Distribución geográfica y hábitat

O. majusculus es una especie de distribución europea (Fauna Europaea 2016), siendo especialmente abundante en el centro y sur continental donde aparece de forma espontánea en un buen número de cultivos mediterráneos como pepino, alubia, pimiento, melón, fresa o maíz (Riudavets 1995; Riudavets y Castañé 1998; Madeira y Pons 2015) (Figura 8). También esta documenta su presencia en la flora espontánea que rodea a los cultivos (Bosco y Tavella 2008).



Presencia Ausencia

Figura 8. Distribución geográfica de *O. majusculus* en Europa (Fauna Europaea 2016).

2.2.3.3 Morfología y biología

O. majusculus es un depredador de desarrollo heterometábolo que pasa por un primer estado de huevo, al que le suceden cinco estadios ninfales y finaliza con el estado adulto (Figura 9). Al igual que ocurría con los míridos descritos anteriormente, este antocórido es un depredador polífago y, a su amplio rango de especies presa, une una ligera fitofagia de la que, hasta el momento, no hay documentados daños apreciables en la planta huésped (Pumariño y Alomar 2012). A diferencia de otros antocóridos, como *Orius laevigatus*, que muestra una mayor presencia en las flores, *O. majusculus* tiende a habitar en las hojas de los cultivos (Chambers *et al.* 1993).

Figura 9. Estados del ciclo desarrollo de *O. majusculus.*

El ciclo de desarrollo comienza con la inserción del huevo por parte de la hembra en el interior del tejido vegetal (Figura 10). Con la ayuda del microscopio estereoscópico, los huevos son visibles desde el exterior gracias a la presencia del opérculo blanquecino que se aprecia por encima de la superficie de la epidermis de la planta. Incluso es posible diferenciar el color brillante de los ojos de la ninfa en su interior cuando está próxima a la eclosión.

Figura 10. Inserción del ovipositor por parte de la hembra de *O. majusculus* en el tejido vegetal de una vaina de alubia.

Las ninfas evolucionan desde colores amarillentos más claros, propios de los primeros estadios, hasta los marrones de N4 y N5. Solo en estos dos últimos estadios se aprecian los vestigios alares, que se transformarán en hemiélitros funcionales en el estado adulto. En cada proceso de muda se desprende una exuvia de color blanco, casi transparente.

El adulto de *O. majusculus* presenta un color marrón intenso, con las patas amarillentas. Se trata de la especie cuyo imago presenta el mayor tamaño de su género, con una longitud de entre

2,5 y 3 mm. Los ojos también se oscurecen en este estado adulto. Las antenas muestran un segundo antenómero y la mayor parte del tercero amarillentos, siendo el primero, el resto del tercero y el cuarto oscuros en las hembras; por el contrario, los machos tienden a presentar los segmentos distales tercero y cuarto oscuros, mientras que son más amarillentos el primero y segundo. Los hemiélitros no sobrepasan el final del cuerpo, siendo traslúcidos claros en su mayor parte, con un oscurecimiento en el clavo, el cúneo y la extremidad de la exocoria. La membrana es igualmente traslúcida clara, especialmente en los machos.

Además de las diferencias que se observan en los hemiélitros entre machos y hembras, el dimorfismo sexual es evidente. Los machos presentan un abdomen delgado, asimétrico con una clara tendencia hacia el lado izquierdo. Las hembras, de tamaño ligeramente superior, muestran un abdomen simétrico y de bordes aserrados, así como un ovipositor en su extremo que emplea para la inserción de los huevos bajo el tejido vegetal (Figura 11).

Figura 11. Dimorfismo sexual de *O. majusculus*.

La duración del periodo de preoviposición varía entre los 4 y los 7 días en función de la presa ingerida, de la planta huésped y de la temperatura ambiental. Así, por ejemplo, a 25º C, dicho periodo es de 4,4 días sobre geranio (*Pelargonium peltatum* Soland). Su fecundidad alcanza medias de unos 8 huevos por hembra y día, llegando valores que rondan los 200 huevos en el total de su vida fértil, pudiendo así multiplicar por 20 su población en un mes, aproximadamente (Alauzet *et al.* 1992).

2.2.3.4 Empleo en control biológico de plagas

O. majusculus es un predador activo de un gran número de especies plaga. Cabe destacar su eficiencia en el control de *F. occidentalis* (Trottin-Caudal *et al.* 1991). Si bien comercialmente su uso en control biológico se ha centrado en los trips, también se ha demostrado su interés en el control de otras plagas de importante interés agrícola como pueden ser la mosca blanca *B. tabaci*, dípteros como *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae) (Cuthbertson *et al.* 2014), ácaros como *T. urticae* (Jacobsen *et al.* 2016), pulgones (Alvarado *et al.* 1997) o huevos de lepidópteros (Pericart 1972). Este amplio abanico de presas implica una buena capacidad adaptativa hacia aquellos lugares en los que las densidades poblacionales de las plagas fluctúan de modo importante. Además, su carácter fitófago le permite extraer agua y sustancias suplementarias del tejido vegetal en momentos de escasez de presa (Pumariño y Alomar 2012). Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no existen datos que reporten ningún tipo de daño en cultivos como consecuencia de sus picaduras. En el polen también encuentra un complemento alimentario que le facilita la supervivencia (Lattin 1999).

Según Van Lenteren (2012), *O. majusculus* es una especie de valor de mercado de nivel medio, por detrás de dos antocóridos de amplio uso comercial como son *Orius insidiosus* (Say) y *O. laevigatus*. Sin embargo, hay varios parámetros que hacen ser optimistas con respecto a esta especie: 1) es un depredador muy activo en la búsqueda de presas, lo que le confiere una gran movilidad en comparación con otros importantes enemigos naturales, como *M. pygmaeus* (Montserrat *et al.* 2004); y 2) presenta un comportamiento más explorador de toda la planta que otros antocóridos, a diferencia de *O. laevigatus* que focaliza su búsqueda en las flores (Amor 2013).

Su potencial como agente de control biológico no parece inferior al de *O. laevigatus* en términos de longevidad, tasa de supervivencia o capacidad depredadora sobre plagas como *F. occidentalis* (Tommasini y Nicoli 1994). Además, la cría masiva es sencilla y requiere de poco mantenimiento (Alauzet *et al.* 1992). Por contra, al igual que ocurre con otros muchos enemigos naturales, incluso dentro del propio género *Orius*, la presencia de productos fitosanitarios puede comprometer la efectividad de *O. majusculus*. Por lo tanto, la aplicación de programas de IPM en los que se cuide la compatibilidad del control biológico con la lucha química, es esencial para la optimización de su uso.

Un factor a tener en cuenta en el empleo de *O. majusculus* como enemigo natural es la diapausa. Como muchos otros antocóridos multivoltinos, entra en diapausa reproductiva en

condiciones de día corto. Para Bahşi y Tunç (2012), el fotoperiodo crítico es de 11,5:12,5 (L:O). Con más horas de oscuridad, las hembras de *O. majusculus* entran en diapausa. En el otro extremo, según señalan estos autores, por encima de 14,5 horas de luz ninguna hembra entra en diapausa. Este dato, a considerar bajo condiciones artificiales, también es muy relevante a la hora de realizar las sueltas en aquellos lugares en los que las horas de luz sean un factor limitante, no tanto en la zona mediterránea.

Por todo ello, parece que *O. majusculus* es una especie prometedora para su incorporación en programas de IPM, tanto en invernadero como en cultivo al aire libre en zonas de clima mediterráneo o similar y a través de la utilización de estrategias inoculativa e inundativa.

2.3 MODELIZACIÓN DEL DESARROLLO DE INSECTOS

La eficacia en la implementación de programas de IPM (y de la incorporación en dichos programas del control biológico), exige de un buen conocimiento sobre la biología y ecología de los enemigos naturales utilizados, de forma que puedan ser criados en las condiciones más adecuadas y liberados en los momentos más favorables para incidir en las plagas diana de la forma más eficiente.

De todos los factores ambientales, el que ejerce un efecto mayor sobre el desarrollo de los insectos es, probablemente, la temperatura. Ello es debido, principalmente, a su importante incidencia sobre sus procesos bioquímicos, al ser organismos poiquilotermos. Por tanto, no es de extrañar que la idea de utilizar la temperatura y su influencia sobre el tiempo de desarrollo como instrumento de predicción haya sido aplicada desde hace décadas (Wagner *et al.* 1984). Por otro lado, la temperatura también influye de modo importante sobre la mortalidad. El conocimiento, tanto de la velocidad de desarrollo (definida como la inversa del tiempo de desarrollo y que, por tanto, mide la porción de desarrollo avanzada por unidad de tiempo), como de la mortalidad de plagas y de sus enemigos naturales, es fundamental para la correcta implementación de cualquier programa de IPM. Efectivamente, además de ser datos muy relevantes de los propios insectos y de sus dinámicas poblacionales, pueden ayudar a coordinar las evoluciones de las poblaciones de plagas y enemigos naturales para establecer estrategias de control biológico eficaces (Kim *et al.* 2009). Por todo ello, el conocimiento de la relación entre mortalidad y temperatura y la obtención de modelos que permitan predecir la evolución del desarrollo en función de este parámetro adquieren un interés especial.

Si bien en la mayoría de insectos es suficiente determinar su tasa de desarrollo bajo un régimen de temperaturas constantes, existe una proporción de los mismos para los que no es suficiente, por no ser representativo de su evolución fenológica real en campo. Esto se debe a que, bajo condiciones ambientales naturales, el desarrollo del insecto ante las frecuentes fluctuaciones térmicas dentro del día en campo es diferente al que presenta cuando está expuesto a regímenes térmicos constantes (Beck 1983). Es por ello que realizar una comprobación de la posible afectación del tipo de régimen térmico, constante frente a variable entro del día, es un paso imprescindible en el establecimiento de modelos válidos para cada especie.

Si se mide el tiempo de desarrollo de un insecto utilizando valores puntuales próximos de temperatura y se representan los resultados en unos ejes cartesianos, aparece una curva en forma de "J" invertida (Figura 12). Si lo que se representa en función de la temperatura es la tasa de desarrollo, la curva resultante tiene forma de sigmoide (Figura 13). Puede observarse cómo en el límite térmico inferior, la curva se aproxima asintóticamente al punto cero de desarrollo, porque los insectos sobreviven frecuentemente durante largos periodos de tiempo a bajas temperaturas con un desarrollo lento. Por esta razón, la temperatura a la que ocurre el desarrollo inicial (umbral mínimo de desarrollo -UmD-), es difícil de medir con precisión. A medida que las temperaturas suben desde ese límite inferior, la tasa de desarrollo aumenta, pudiéndose ajustar la función a una recta en la zona intermedia. A medida que la temperatura se acerca a la temperatura óptima (T_{opt}; aquélla en que la tasa de desarrollo es máxima), esta tasa de desarrollo comienza a ralentizarse, para caer después bruscamente. Además, a temperaturas superiores a la T_{opt}, los porcentajes de mortalidad suelen ser muy elevados, lo que hace también difícil el estudio del desarrollo a altas temperaturas y, por tanto, la determinación del umbral máximo de desarrollo (UMD) (temperatura por encima de la cual el insecto no puede desarrollarse) (Marco 2001).

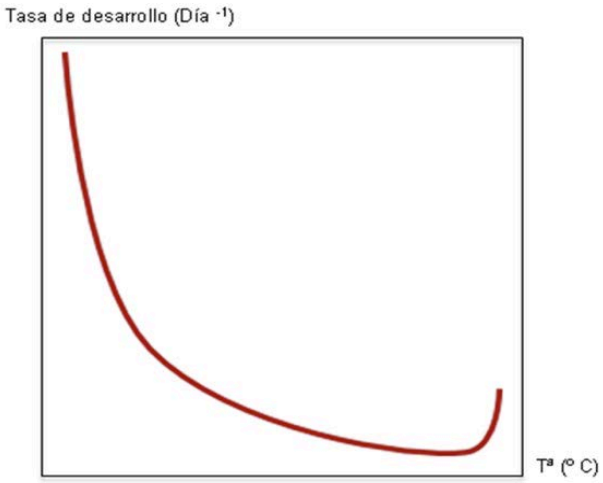


Figura 12. Relación entre el tiempo de desarrollo y la temperatura.

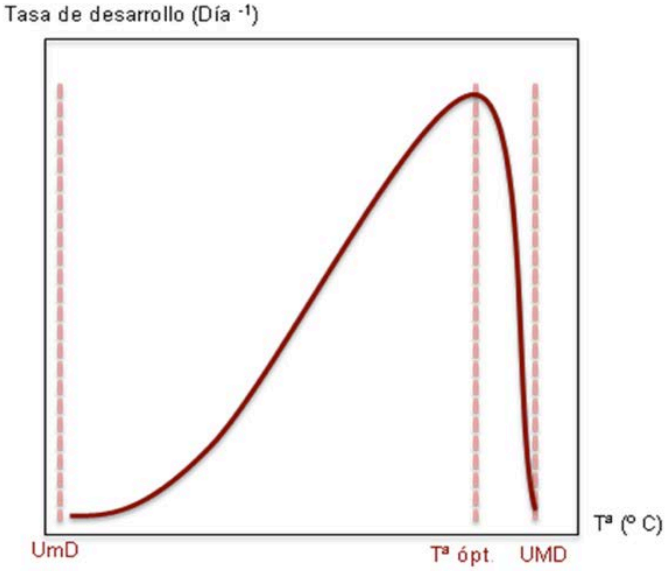


Figura 13. Relación entre la tasa de desarrollo y la temperatura. UmD: Umbral mínimo de desarrollo; Tª ópt.: Temperatura óptima; UMD: Umbral máximo de desarrollo.

De forma paralela, las mortalidades reflejan una evolución similar. A temperaturas próximas al UmD y superiores a la temperatura óptima, los porcentajes de mortalidad son muy elevados. Por el contrario, bajo temperaturas intermedias, las mortalidades son realmente bajas. Estas consideraciones deben ser tenidas muy en cuenta en aquellas decisiones relacionadas con la temperatura y el correcto manejo de los insectos.

Es muy importante señalar que a cada estado o estadio de desarrollo de un insecto concreto le corresponde su propia función y que cualquier análisis total del desarrollo recogerá errores y una orientación imprecisa y equívoca.

2.3.1 Modelos matemáticos

A lo largo del tiempo se han propuesto numerosos modelos empíricos y biofísicos que describen la relación entre la tasa de desarrollo y la temperatura. El primer modelo utilizado fue el modelo lineal. Basado en el trabajo de diversos autores (Candolle 1885; Reibisch 1902; Sanderson y Peairs 1913; Arnold 1960; Baskerville y Emin 1969; Abrami 1972; Allen 1976; Sevacherian *et al.* 1977), asume como relación válida entre tasa de desarrollo y temperatura, 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 UmD y de la integral térmica y no puede obtener un valor para la temperatura óptima ni el UMD. No obstante, este modelo ha sido utilizado desde hace mucho tiempo por muy diversos autores dada su sencillez de cálculo y manejo y porque, en muchos casos, representa una aproximación aceptable.

Posteriormente, han ido apareciendo diversos modelos cuyo objetivo principal era el de resolver los problemas de que adolece el modelo lineal. Se describieron así los modelos catenario simétrico y asimétrico (Janisch 1925), el exponencial (Belehradek 1935) y el logístico (Davidson 1944), ampliamente utilizados (sobre todo los dos últimos), pero también con problemas en los ajustes en las zonas de temperaturas altas y bajas. En 1974, Stinner *et al*. describieron el modelo sigmoide modificado, cuya aportación es la de corregir 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 y DeMichele formularon un complejo modelo biofísico que lleva su nombre y que es ampliamente aceptado y utilizado dado que describe correctamente la relación tasa de desarrollo-temperatura en todo el rango de desarrollo de la especie de insecto considerada.

Sin embargo, diferentes investigadores siguieron proponiendo modelos intentando, sobre todo, mejorar el cálculo del umbral mínimo de desarrollo. Así, en 1983, Hilbert y Logan describieron el modelo de Logan tipo III, cuya expresión matemática es combinación de dos funciones. La primera cubre la parte ascendente de la tasa de desarrollo y la segunda 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; 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, aspecto corregido en el modelo de Lactin.

Posteriormente, se siguieron estudiando modelos cuyo objetivo principal pasó a ser el de reducir el número de parámetros utilizados por los mismos. Así, en 1999, Brière *et al*. propusieron un modelo con sólo tres parámetros, que consigue muy buenos ajustes y permite seguir obteniendo el umbral mínimo de desarrollo.

En la presente tesis, se utilizaron el modelo lineal y los modelos no lineales de Logan tipo III (Hilbert y Logan 1983), Lactin (Lactin *et al*. 1995) y Brière (Brière *et al.* 1999).

i. Modelo lineal.

En el modelo lineal, la relación entre temperatura (T) y tasa de desarrollo *r* (1/día) es la reflejada por la expresión matemática:

$$r(\mathrm{T}) = a + b\mathrm{T};$$

donde *a* y *b* son constantes estimadas por el método de regresión de mínimos cuadrados. El umbral mínimo de desarrollo (T_0) y los requerimientos en grados-día (*DD*) se estiman mediante las ecuaciones: $T_0 = -a/b$ y $DD = 1/b$.

ii. Modelo de Logan tipo III.

Este modelo proviene de la combinación de dos funciones (Hilbert y 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 fórmula del modelo es la siguiente:

$$r(T) = \Psi\left(\left((T - T_b)^2 / \left((T - T_b)^2 + D^2\right)\right) - e^{-((T_m - (T - T_b))/\Delta T)}\right)$$

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 predice el modelo); T_m es el umbral de temperatura letal máximo, expresado en ºC sobre T_b, 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 (Logan *et al.* 1976).

iii. Modelo de Lactin

Lactin *et al.* (1995) modificaron el modelo no lineal propuesto por Logan *et al.* (1976) para incluir una estimación de un umbral mínimo de temperatura. Para ello utilizaron la siguiente expresión:

$$r(T) = e^{\rho T} - e^{\left(\rho T_{\max} - (T_{\max} - T)/\Delta\right)} + \lambda$$

donde T es la temperatura; $r(T)$ es la tasa de desarrollo a la temperatura T; T_{max} es la temperatura supraóptima a la cual $r(T) = \lambda$; 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.

iv. Modelo de Brière

El modelo de Brière (Brière *et al.* 1999) es una modelo de desarrollo simplificado basado únicamente en tres parámetros. Su expresión matemática es la siguiente:

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

donde T es la temperatura; $r(T)$ es la tasa de desarrollo a la temperatura T y cuyo valor es 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.

3. JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA

Probablemente, de todas las herramientas de control incorporables al Manejo Integrado de Plagas, es el control biológico y su interacción con el resto de técnicas, la que ha alcanzado una mayor progresión. También es muy probable que esta progresión continúe de forma importante y sostenida en el futuro. No solo tiene gran interés su aplicación de acuerdo a las estrategias inoculativa e inundativa, sino que el control biológico por conservación debe incorporarse como una práctica habitual en el manejo de los agroecosistemas para potenciar en ellos la presencia de enemigos naturales y, por tanto, su capacidad intrínseca de amortiguar las poblaciones de las plagas. Así, la generación de conocimientos sobre los diferentes enemigos naturales, su comportamiento, su cría masiva o la interacción con sus presas diana, resulta fundamental en este contexto.

Dentro de esos conocimientos que es imprescindible generar, en la presente tesis se han abordado los relativos a la evolución en función de la temperatura tanto de la velocidad de desarrollo como de la mortalidad, para tres heterópteros depredadores de importantes plagas agrícolas. El motivo fundamental de esta decisión es el convencimiento de que esta información constituye una herramienta poderosa, tanto para mejorar notablemente la cría masiva de los depredadores como para optimizar su manejo en campo (en estrategias inundativas y de conservación) aumentando de este modo su eficiencia. Los tres enemigos naturales se han seleccionado de acuerdo a las experiencias documentadas hasta ahora, que ofrecen un alentador presente y futuro para el control en diversos cultivos importantes de plagas tan perjudiciales como moscas blancas, araña roja, polillas o trips. Se trata de los míridos *Nesidiocoris tenuis* y *Macrolophus pygmaeus* y del antocórido *Orius (Heterorius) majusculus*.

Más concretamente: se ha analizado la mortalidad de cada uno de los estados y estadios inmaduros de los depredadores en un rango suficientemente amplio de temperaturas; se ha comprobado la posible influencia de la variación intradiaria de la temperatura en la duración del desarrollo; se han obtenido, también para cada estado y estadio inmaduro, funciones que relacionan su tasa de desarrollo con la temperatura utilizando diferentes modelos; y se han validado estas funciones obtenidas en experimentos de laboratorio, en condiciones de exterior, donde los enemigos naturales o ya están presentes o van a ser liberados y van a desarrollar su potencial depredador. Igualmente, se ha perseguido optimizar la cría masiva y su evolución en el cultivo, es decir, la predicción del comportamiento de los insectos a partir de las condiciones ambientales a las que son sometidos. Entender cuál es el estado de desarrollo del insecto en el que

es más conveniente realizar las liberaciones y las temperaturas ambientales más propicias para su desarrollo, provocar una óptima sincronía con sus especies presa, conocer los umbrales térmicos mínimo y máximo y la temperatura óptima o poder prever su evolución en el tiempo con el menor coste posible, son los objetivos esenciales para una aplicación eficiente del control biológico (Tobin *et al.* 2001). Si se generan modelos matemáticos capaces de predecir el comportamiento de los enemigos naturales en función de las condiciones térmicas a las que se ven sometidos, será posible hacer un seguimiento preciso de su evolución (Logan 1988) y, por tanto, conseguir los objetivos anteriores.

Por todo ello, se puede concluir que la presente tesis, estructurada como compendio de publicaciones, constituye una unidad temática que gira en torno a la generación de información imprescindible para la correcta incorporación del control biológico mediante tres depredadores en el manejo integrado de importantes plagas de zonas de clima mediterráneo o similar, válidos tanto para cultivos al aire libre como para invernadero.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se van a exponer la metodología y los materiales utilizados en los bioensayos realizados. Aunque ambos aspectos ya aparecen en los artículos incluidos en el compendio con el suficiente nivel de concreción como para que los experimentos sean reproducibles, se considera interesante ampliar algunos detalles por su interés en lo que concierne tanto a la cría masiva de los tres depredadores, como al proceso de obtención de los modelos que permiten calcular la tasa de desarrollo en función de la temperatura y las gráficas que relacionan este último parámetro con la mortalidad.

4.1 CRÍA MASIVA DE LOS DEPREDADORES

Las poblaciones de partida utilizadas para los tres depredadores estudiados en la presente tesis fueron de origen comercial. Se decidió que así fuera puesto que, al ser enemigos naturales comercializados y empleados habitualmente en control biológico por inundación, es la situación que más se ajusta a la realidad.

Todos los depredadores fueron suministrados por la empresa Biobest® (Westerlo, Bélgica). Concretamente, los productos adquiridos fueron Nesidiocoris-system®, Macrolophus-System® y Majusculus-System®. Se trata de envases que contienen 500 míridos y 1.000 antocóridos, según sea el caso, mezclados con vermiculita, todos ellos en su último estadio ninfal o en estado adulto. A partir de dichos ejemplares, se efectuó el siguiente programa de cría masiva cuyo fin era proporcionar los individuos necesarios para el adecuado desarrollo de los diferentes bioensayos.

La cría masiva se llevó a cabo en cámaras climatizadas bajo las siguientes condiciones ambientales controladas: temperatura constante de 24±1 ºC; humedad relativa del 60±5%; y fotoperiodo de 16:8 (L:O). Cuando los bioensayos exigían utilizar una temperatura distinta, se adaptaba previamente la población a dicho parámetro durante un periodo mínimo de 24 horas.

Aunque basado en la metodología propuesta por Shakya *et al.* (2009), se aplicó el sistema utilizado para *O. laevigatus* por Román-Fernández (2017). Para el buen manejo de los ejemplares se usaron cajas prismáticas de plástico transparente, de 23,5 x 21,5 x 5,5 cm (largo x ancho x alto). Con objeto de conseguir una adecuada ventilación del interior, se efectuaron en la tapa cuatro orificios circulares de 2 cm de diámetro, que se cubrieron con papel de filtro para evitar la fuga de los insectos. En la base de las cajas se colocaron pliegos de papel de filtro doblados en zig-zag,

con el fin de ofrecer refugio, así como evitar una excesiva condensación de humedad y, con ello, la incidencia de hongos sobre el sustrato de puesta y la mortalidad de los individuos. Sobre el papel, se depositaban dos vainas frescas de judía (*Phasaelus vulgaris* L.), que proporcionaban la humedad necesaria para la supervivencia de los depredadores, además de servir como sustrato de oviposición (Figura 14). Como fuente de alimentación se utilizó el preparado comercial Nutrimac®, de la empresa Biobest, consistente en huevos de *E. kuehniella* congelados (Lepidoptera: Pyralidae), que se suministraba *ad libitum* cada dos días.

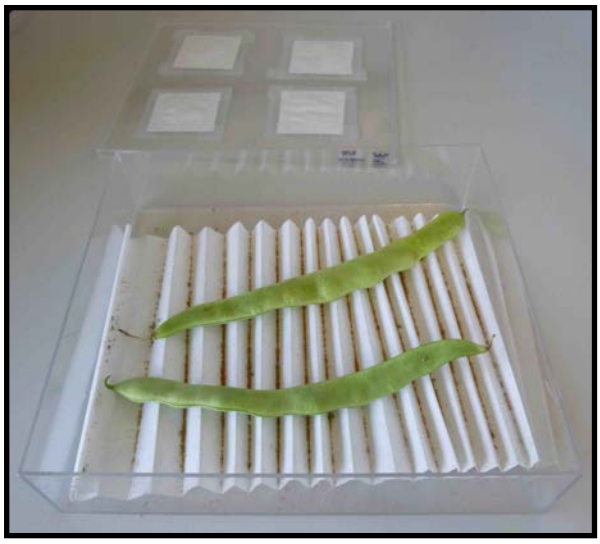


Figura 14. Detalle de las cajas utilizadas para la cría masiva de los enemigos naturales estudiados.

4.2 BIOENSAYOS REALIZADOS PARA LA MODELIZACIÓN A TEMPERATURAS CONSTANTES

El procedimiento que se describe a continuación fue el utilizado para cada una de las diferentes temperaturas estudiadas y para cada una de las tres especies de enemigos naturales modelizadas.

Los bioensayos se iniciaron con la preparación de una caja similar a las utilizadas para la cría masiva, pero que solo contenía adultos jóvenes que ya habían superado el periodo de preoviposición. Dichos adultos se sometían a un periodo de aclimatación térmica a la temperatura de cada ensayo. Una vez superado este periodo, se extraían las vainas de judía y se incorporaban dos vainas frescas, permitiendo la puesta de los adultos durante 24 horas. Tras ese tiempo, la vainas se trasladaban a otra caja y a las mismas condiciones ambientales (temperatura correspondiente en cada caso, 60±10% de humedad relativa y 16:8 (L:O) de fotoperiodo) (Figura 15).

Figura 15. Disposición del conjunto de cajas con ejemplares individualizados en una cámara de ambiente controlado.

En el caso de *O. majusculus*, se procedía a contar los huevos depositados en el interior de las vainas para poder calcular el porcentaje de eclosión, ya que son claramente visibles desde el exterior. Este paso no se efectuó en el caso de las dos especies de míridos debido a la dificultad y alto grado de imprecisión que supone localizar la ubicación de los mismos dentro del tejido vegetal. Las vainas aisladas se analizaban diariamente bajo la lupa binocular en busca de las ninfas emergidas, las cuales se individualizaban en cajas cilíndricas de plástico transparente, de 3 cm de diámetro y 1,5 cm de altura, cuya tapa estaba provista de un pequeño orificio circular de 8 mm de diámetro que permitía la ventilación. Para evitar la fuga de los insectos, dicho orificio se cubría con esparadrapo de tejido sin tejer Codix®. Además, se incorporaba un pequeño fragmento de vaina de judía, de 10 x 10 mm, como fuente de humedad y complemento alimentario, así como huevos de *E. kuehniella* suministrados *ad libitum* (Figura 16). Cada uno o dos días, vaina y huevos eran renovados. Diariamente se anotaba la mortalidad, así como los cambios de estadio ninfal, y se extraía la exuvia, si procedía (Figura 17).

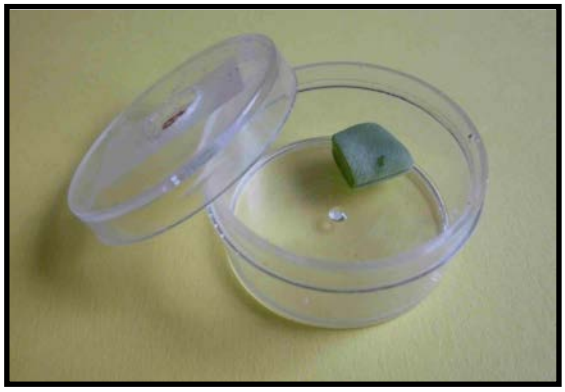


Figura 16 y 17. Izquierda: detalle de las cajas utilizadas para los bioensayos. Derecha: ninfa N2 de *N. tenuis* junto a su exuvia.

Las temperaturas estudiadas se seleccionaron en función del comportamiento de cada especie a las mismas, especialmente en lo que a sus extremos térmicos se refiere. Como norma general, se utilizaron intervalos térmicos de tres grados, por considerarse que ello permitiría disponer de datos observados suficientes para obtener modelos con buenos ajustes. Los valores concretos utilizados en cada caso fueron los siguientes:

- *N. tenuis*: 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 35 y 36 ± 1 °C.

- *M. pygmaeus*: 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 31, 32, y 33 ± 1 °C.

- *O. majusculus*: 10, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 34 y 35 ± 1 °C.

4.3 Bioensayos realizados para la determinación de la influencia de la variación intradiaria de la temperatura en el tiempo de desarrollo de los depredadores

Con el fin de establecer las posibles diferencias en el tiempo de desarrollo medido a temperaturas constantes y a temperaturas variables intradiarias, se programó un día-tipo de primavera-verano en un clima mediterráneo, en el que la temperatura fluctuaba cada hora, siendo la media diaria de 24 ºC, la temperatura mínima de 17º C y la máxima de 31 ºC (Figura 18).

Utilizando 50 individuos aislados para cada una de las tres especies de depredadores, se realizaron bioensayos similares a los especificados bajo el régimen de temperaturas constantes (Apartado 4.2). Se compararon las medias de los tiempos de desarrollo obtenidos a 24 ºC constantes y a temperatura variable intradiaria (media de 24 ºC) para determinar la posible influencia de la variación de la temperatura dentro del día.

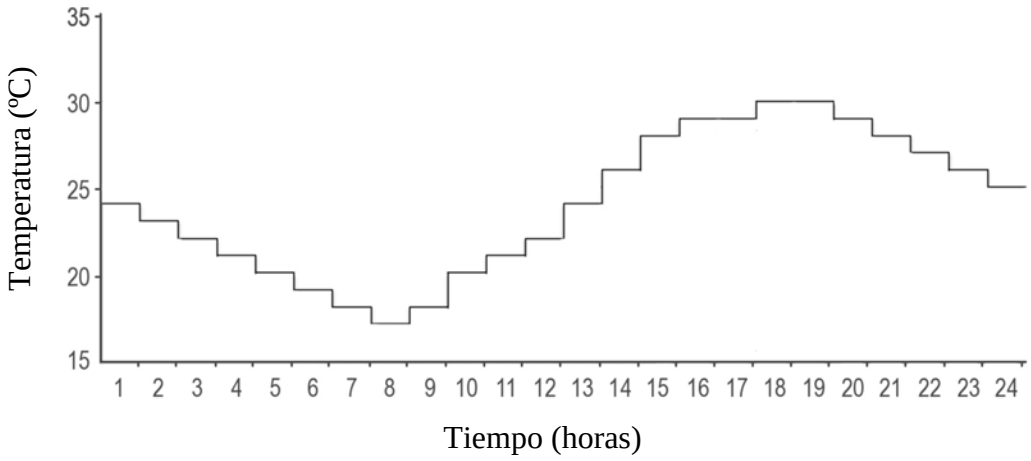


Figura 18. Variación intradiaria de la temperatura utilizada en los bioensayos para determinar la duración del desarrollo a temperatura variable.

4.4 VALIDACIÓN DE LOS MODELOS EN CONDICIONES DE EXTERIOR Y DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LA PREDICCIÓN

La optimización de modelos matemáticos requiere de un último paso: su validación en condiciones de exterior. Se trata de comprobar, con datos reales obtenidos en condiciones experimentales de campo, la calidad de predicción de los modelos obtenidos y, con ello, poder establecer cuál de ellos es el más recomendable. Los diferentes modelos utilizados en la predicción presentan características intrínsecas. Así, el modelo lineal no permite calcular el valor de la temperatura óptima ni el del umbral máximo, y su validez se limita a las temperaturas centrales del rango en que el desarrollo del insecto es viable. En ese intervalo, la relación temperatura-tasa de desarrollo se comporta de una forma casi lineal. Por su parte, diferenciar entre los modelos no lineales exige una mayor concreción. Para ello, se realiza un último bioensayo para cada especie en el que se evalúa la duración del desarrollo bajo condiciones de exterior, a la vez que se mide la temperatura ambiental a la que está sometida. Esos datos se comparan con los predichos por los modelos establecidos bajo las temperaturas constantes, obteniendo así el grado de precisión de cada uno de ellos.

Para validar en el exterior los modelos obtenidos en laboratorio se siguió el mismo procedimiento que en los ensayos de temperaturas constantes (Apartado 4.2) con la salvedad de que, en este caso, tanto la aclimatación térmica como el resto del bioensayo se realizó al aire libre, sin control de la temperatura, humedad relativa ni fotoperiodo (la fecha de realización del mismo fue en los meses de julio y agosto). Sí se consideró proteger los recintos de la exposición solar directa y de las precipitaciones por medio de una estructura metálica dotada de una cubierta resistente y opaca, a modo de tejado (Figura 19). Junto a los recintos se colocó un data-logger (Testostor® 175; Testo Inc., Sparta, NJ, USA), que registraba la temperatura ambiental en intervalos de media hora (Figura 20). Al igual que se hizo a temperaturas constantes, cada día se contabilizaban los huevos eclosionados, los individuos que mudaban entre estadios ninfales y la mortalidad. También se procedía a renovar el fragmento de judía o a suministrar *ad libitum* huevos de *E. kuehniella*.

Los resultados obtenidos permitieron determinar la calidad de la predicción de los diferentes modelos por comparación entre los valores reales y los predichos por cada uno de ellos. Esa calidad se representó a través del porcentaje de ajuste entre el valor predicho por cada modelo y el observado bajo las condiciones de campo.

Figura 19 y 20. Detalle de la estructura y del data-logger Testostor 175 utilizados en los bioensayos de exterior.

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para cada uno de los tres depredadores, se compararon las medias de los tiempos de desarrollo por sexos, así como por régimen térmico (a temperatura constante de 24 ºC y variable con media de 24 ºC) usando el test *t* para muestras independientes. Cuando las medias de la mortalidad y de los tiempos de desarrollo de los dos regímenes térmicos se compararon con las obtenidas en condiciones de exterior, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del test de comparaciones múltiples no paramétrico de Dunn. Con el fin de obtener las medias de mortalidad de huevos (solo en el caso de *O. majusculus*) y ninfas (para los tres depredadores), así como sus errores estándar, el total de individuos por cada régimen térmico (constante, variable y de exterior) se agruparon en cinco subpoblaciones, de entre 10 y 15 individuos cada una. En todos los casos se utilizó un nivel de significación del 5% (α=0.05) y el software estadístico SPSS (versión 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

El ajuste de los modelos, tanto lineal como no lineales, y la estimación de los diferentes parámetros asociados se realizaron por medio del programa Tablecurve 2D (Jandel Scientific 1994) usando un método de mínimos cuadrados. La estimación inicial de los parámetros para los modelos no lineales Logan tipo III y Lactin se realizó siguiendo las indicaciones de Logan (1988).

5. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis es ampliar conocimientos y proporcionar herramientas útiles para optimizar el manejo de tres importantes enemigos naturales de plagas clave, como son las moscas blancas, *B. tabaci* y *T. vaporariorum*, la polilla del tomate *T. absoluta* o el trips de las flores *F. occidentales*, entre otras.

Con este propósito, la tesis se ha desarrollado respondiendo a los siguientes objetivos concretos:

1. Obtener, en base a bioensayos con temperaturas constantes, las funciones matemáticas que relacionan la tasa de desarrollo de *Nesidiocoris tenuis*, *Macrolophus pygmaeus y Orius majusculus* con la temperatura.

2. Determinar la influencia de la variación intradiaria de la temperatura en la duración del desarrollo de cada una de estas tres especies.

3. Evaluar la mortalidad a lo largo del desarrollo de *N. tenuis*, *M. pygmaeus* y *O. majusculus* en función de la temperatura.

4. Obtener los valores del umbral mínimo de desarrollo, del umbral máximo de desarrollo y de la temperatura óptima, para cada estado y estadio inmaduro de cada especie.

5. Validar los modelos ajustados para cada uno de los estados y estadios inmaduros de *N. tenuis*, *M. pygmaeus* y *O. majusculus* comparando los resultados por ellos predichos con la duración del desarrollo real observada en condiciones de exterior.

6. COMPENDIO DE PUBLICACIONES

6.1 PUBLICACIÓN 1

"Optimizing *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae) as a biological control agent: mathematical models for predicting its development as a function of temperature"

Título	Optimizing *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae) as a biological control agent: mathematical models for predicting its development as a function of temperature.
Título traducido	Optimización de *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae) como agente de control biológico: modelos matemáticos para la predicción de su desarrollo en función de la temperatura.
Autores	Héctor Martínez-García, Luis R Román-Fernández, María G Sáenz-Romo, Ignacio Pérez-Moreno y Vicente S Marco-Mancebón
Revista	Bulletin of Entomological Research
Año de publicación	2016
Factor de impacto (JCR)	1.758 (año 2016). Q1 (22/93), Entomology.
DOI	10.1017/S0007485315000978

Nesidiocoris tenuis es un enemigo natural consolidado en el control biológico de moscas blancas, tanto *B. tabaci* como *T. vaporariorum*. Pero además es un prometedor depredador de huevos y larvas de la polilla del tomate, *T. absoluta*, que desde 2007, año en que se detectó en España procedente de Sudamérica, causa graves daños en cultivos mediterráneos, especialmente tomate, pero también berenjena, pimiento y patata. Desde la llegada de este pequeño lepidóptero, el interés por esta especie ha sido muy alto. Algunos estudios comparan la tasa de depredación de los adultos de *N. tenuis* con la de otros enemigos naturales importantes en protección de cultivos, como son *A. nemoralis* y *O. laevigatus*, encontrando mayor capacidad de consumo por parte del mírido sobre presas como *Spodoptera exigua* (Aragón 2017).

El control de plagas, en general, y de las que son presa de *N. tenuis*, en particular, exige un enorme conocimiento del propio fitófago, pero también de sus enemigos naturales. Por ejemplo, ser capaces de coordinar dentro de un cultivo el momento en el que la plaga va a alcanzar el Umbral Económico, con el momento de suelta del enemigo natural será clave en la estrategia de control biológico por inundación. Por otro lado, conseguir una coordinación entre los estados fenológicos de ambos, permitirá optimizar el nivel de depredación del enemigo natural. Así, por ejemplo, se podrá buscar la presencia simultánea de sus estados o estadios más voraces con la fase

de desarrollo más adecuada de su presa (por ejemplo, aquella que es más apetecible o aquella que es consumida en cantidades mayores).

Algunos programas de IPM actuales son optimizados inoculando los enemigos naturales ya desde el propio vivero, antes de la plantación definitiva. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se utiliza *N. tenuis* para el control biológico de plagas en cultivo de tomate. En este caso, conocer la evolución del desarrollo del mírido en función de la temperatura permitirá inocularlo en el vivero en el momento en el que se considere oportuno para que alcance el máximo grado de eficacia posible frente a las posibles plagas diana.

Por otra parte, resulta totalmente necesario disponer de un conocimiento amplio y completo del comportamiento de *N. tenuis* en las biofábricas en las que tiene lugar su cría masiva. Su alto rendimiento como enemigo natural posiciona a este depredador polífago como uno de los principales agentes de control biológico de diversas plagas. Por tanto, poder llevar a cabo su cría masiva de un modo efectivo y tener la capacidad de programarla temporalmente, resulta vital para responder a las necesidades de mercado. Como ya se ha comentado en apartados anteriores, dicho conocimiento es ofrecido por modelos matemáticos que relacionan la temperatura con la tasa de desarrollo, complementado con conocimientos sobre la influencia de la temperatura sobre la mortalidad. En base a esta información, se podrá seleccionar la temperatura de cría a la que someter al insecto en cada momento para obtener la velocidad de desarrollo deseada, sin perder de vista la mortalidad que se produce a dicha temperatura.

En el presente trabajo, se han obtenido cuatro funciones (cada una asociada a su correspondiente modelo) que relacionan la tasa de desarrollo de cada estado y estadio inmaduro de *N. tenuis* con la temperatura. Estas funciones han sido validadas bajo condiciones térmicas variables a lo largo del día y en condiciones de exterior. Además, se ha determinado la mortalidad de cada una de esas fases de desarrollo en función de la temperatura. Todo este conjunto de conocimientos ha permitido la obtención de los umbrales mínimo y máximo y de la temperatura óptima de desarrollo, así como los valores térmicos en los que la mortalidad es mayor o, por el contrario, es más baja. Estas funciones y estos datos permitirán conseguir un óptimo manejo de *N. tenuis* como agente de control biológico de plagas y, por tanto, su óptima integración en el IPM.

El autor de la tesis contribuyó en todas las fases necesarias para la ejecución y la publicación del estudio. El resto de autores colaboraron, en mayor o menor medida, en las fases de diseño de experimentos, análisis estadístico, escritura del primer borrador del manuscrito, y corrección de sus sucesivas versiones. Se quiere agradecer a Eduardo Sáenz de Cabezón Irigaray

por su colaboración en la generación y puesta a punto del algoritmo matemático que permite la conversión de los valores de la temperatura en avances en el desarrollo del mírido, que fue utilizado en la validación de las funciones en condiciones de exterior.

6.2 PUBLICACIÓN 2

"Temperature-dependent development of *Macrolophus pygmaeus* and its applicability to biological control"

Título	Temperature-dependent development of *Macrolophus pygmaeus* and its applicability to biological control.
Título traducido	Desarrollo de *Macrolophus pygmaeus* en función de la temperatura y su aplicabilidad para el control biológico.
Autores	Héctor Martínez-García, María G. Sáenz-Romo, Miguel Aragón-Sánchez, Luis R. Román-Fernández, Eduardo Sáenz-de-Cabezón, Vicente S. Marco-Mancebón e Ignacio Pérez-Moreno
Revista	BioControl
Año de publicación	2017
Factor de impacto (JCR)	1.918 (año 2016). Q1 (15/93), Entomology.
DOI	10.1007/s10526-017-9798-8

Macrolophus pygmaeus es un depredador polífago, pero que destaca por su efectivo control de moscas blancas (tanto *B. tabaci* como *T. vaporariorum*), pulgones (como *M. persicae*) y algunas polillas (como *T. absoluta*).

El interés que suscita esta especie por su potencial depredador es muy alto, ya que, aunque algunos de los estudios analizados previamente no informan de tasas de consumo mayores que las que muestra *N. tenuis*, en el caso de *M. pygmaeus* no se han evidenciado daños en el cultivo ocasionados por su fitofagia facultativa. Este hecho es especialmente importante en circunstancias de baja densidad de presa y en cultivos sensibles a los efectos derivados de la alimentación fitófaga de estos enemigos naturales.

Además de todo lo anteriormente expuesto para *N. tenuis*, referido a la utilidad de conocer la relación entre la temperatura y la tasa de desarrollo y la mortalidad de los enemigos naturales para optimizar su empleo como agentes de control biológico de plagas, otro aspecto de gran interés es obtener información que permita comparar los rangos térmicos de ambos míridos. Dicha información es útil para evaluar la idoneidad del uso de una u otra especie en zonas con climas distintos o en diferentes épocas del año, para un mismo lugar.

El autor de la tesis contribuyó en todas las fases que exigía la ejecución del estudio y su publicación. El resto de autores colaboraron, en mayor o menor medida, en las fases de diseño experimental, análisis estadístico, escritura del primer borrador del manuscrito y corrección de sus sucesivas versiones. Eduardo Sáenz de Cabezón Irigaray colaboró con la generación y puesta a punto del algoritmo matemático que permite la conversión de los valores de la temperatura en avances en el desarrollo del mírido, que fue utilizado en la validación de los modelos en condiciones de exterior.

6.3 PUBLICACIÓN 3

"Mathematical models for predicting development of *Orius majusculus* and its applicability to biological control"

Título	Mathematical models for predicting development of *Orius majusculus* and its applicability to biological control.
Título traducido	Modelos matemáticos para la predicción del desarrollo de *Orius majusculus* y su aplicabilidad en control biológico.
Autores	Martínez-García, Héctor; Aragón-Sánchez, Miguel; Sáenz-Romo, María; Román-Fernández, Luis; Veas-Bernal, Ariadna; Marco-Mancebón, V. y Pérez-Moreno, Ignacio
Revista	Journal of Economic Entomology
Año de publicación	2018
Factor de impacto (JCR)	1.824 (año 2016). Q1 (17/93), Entomology.
DOI	10.1093/jee/toy127

Orius majusculus es un depredador que suele aparecer espontáneamente en un buen número de cultivos en el área mediterránea. Es un reconocido consumidor de trips, como *F. occidentalis*, si bien su rango de presas potenciales es muy amplio.

Su interés como enemigo natural es similar al de otros antocóridos, como *O. laevigatus* y *O. insidiosus*, y muestra un muy buen comportamiento en condiciones de ambiente controlado y, por lo tanto, para la cría masiva. Es por ello que, como en el caso de los dos depredadores anteriores, obtener un buen conocimiento sobre la duración de su desarrollo y mortalidad en función de la temperatura resulta altamente interesante para mejorar su efectividad como enemigo natural de importantes plagas agrícolas.

El autor de la tesis contribuyó en todas las fases necesarias para ejecutar el estudio y conseguir la publicación. El resto de autores colaboraron, en mayor o menor medida, en las fases de diseño de experimentos, análisis estadístico, escritura del primer borrador del manuscrito y corrección de sus sucesivas versiones. Se quiere agradecer a Eduardo Sáenz de Cabezón Irigaray por su colaboración en la generación y puesta a punto del algoritmo matemático que permite la conversión de los valores de la temperatura en avances en el desarrollo del antocórido, que fue utilizado en la validación de los modelos en condiciones de exterior.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Si bien pueden encontrarse de forma completa en los artículos anteriormente expuestos, en este capítulo se resumen y discuten algunos de los resultados más destacados obtenidos en las publicaciones asociadas a esta tesis.

Se ha dividido el capítulo en cuatro subsecciones de forma coincidente con la estructura organizativa expuesta en los artículos científicos: (i) supervivencia; (ii) tiempo de desarrollo; (iii) modelos ajustados; y, finalmente, (iv) evaluación de los modelos a tenor de los datos obtenidos en condiciones de exterior.

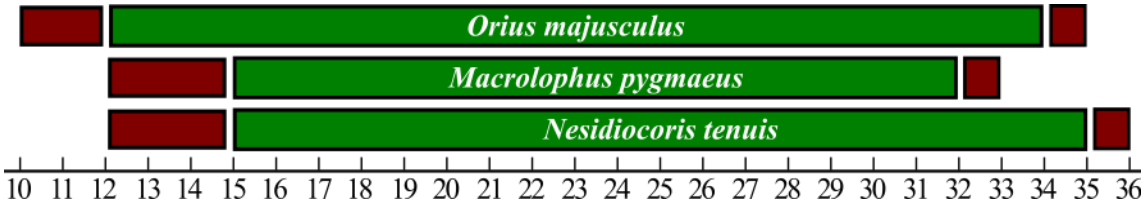
7.1 SUPERVIVENCIA

El análisis de la supervivencia resulta clave para cualquier estrategia que maneje insectos. En los trabajos llevados a cabo, se ha analizado este parámetro y su relación con las diferentes temperaturas y regímenes térmicos a los que se ha sometido a los tres enemigos naturales.

En un primer momento, el interés se centró en analizar el intervalo de temperaturas constantes dentro del cual las especies eran capaces de completar su desarrollo. Considerando que el resto de factores permanecían constantes, las diferencias encontradas en los porcentajes de supervivencia eran debidas a la temperatura a la que se sometía al enemigo natural. Así, partiendo de 24 ºC, y a intervalos de 3 ºC, se fue avanzando hacia ambos extremos térmicos para cada uno de los insectos. En aquellos casos en que esos tres grados parecían superar los límites en los que la supervivencia es nula, se buscó una mayor precisión con diferencias incluso de un solo grado, para poder encontrar los umbrales. El umbral mínimo de desarrollo, por la tendencia progresiva a ser alcanzado, resultó más sencillo de establecer que el umbral máximo de desarrollo, debido a la abrupta caída de la supervivencia que tiene lugar por encima de la temperatura óptima.

Considerando que se trata de enemigos naturales nativos de zonas climáticas similares, no se esperaban grandes diferencias en sus intervalos de supervivencia. Si se comparan las tres especies analizadas se puede observar como los dos míridos, especies adaptadas a climas mediterráneos o similares, tienen un umbral mínimo de desarrollo superior al del antocórido, que se encuentra presente en toda Europa. Sus valores concretos son 15 ºC para los míridos y 12 ºC para el antocórido. Esta diferencia puede ser significativa a la hora de realizar liberaciones tempranas en primavera, donde *O. majusculus* se demuestra como un depredador más adaptado al frío. Con respecto al umbral máximo de desarrollo, se observa que *N. tenuis* muestra una mayor adaptación a temperaturas muy elevadas típicas de los cultivos de campo e invernadero de la zona

mediterránea, teniendo *M. pygmaeus*, por el contrario, una mayor sensibilidad a las altas temperaturas (Figura 21, para el estado de huevo). Muy similar espectro térmico al de dichas especies encontró Román-Fernández (2017) para otro antocórido con importantes implicaciones en control biológico como es *O. laevigatus;* concretamente, definió como sus umbrales térmicos los 12 y los 33 ºC.



Rango de temperaturas ensayadas en las que se llega a completar el desarrollo embrionario y se produce la eclosión.

Rango de temperaturas ensayadas en las que no se completa el desarrollo embrionario y la eclosión no tiene lugar.

Figura 21. Comparación de los rangos de temperatura en los que tiene lugar el desarrollo embrionario completo de *O. majusculus*, *M. pygmaeus* y *N. tenuis*.

Respecto a las gráficas que relacionan la mortalidad y la temperatura, con los valores constantes de este último factor ensayados para la obtención de los modelos que lo relacionan con la tasa de desarrollo, no siempre se ha obtenido para los tres depredadores y para todas las etapas de su desarrollo una curva en forma de "U", típica en los insectos sometidos a un rango suficientemente amplio de temperaturas constantes (Wagner *et al.* 1984). La zona de valle se aprecia de forma clara dentro del rango de temperaturas intermedias (entre los 20 y los 30 ºC), donde la mortalidad es muy baja (inferior al 20%). Fuera de esa franja intermedia, propia de cada especie, la mortalidad se incrementa de forma notable (Li 1995; Marco *et al.* 1997; Sánchez-Ramos *et al.* 2015). Considerando las diferentes fases de desarrollo, la mortalidad en el estado de huevo solo pudo ser valorado en el caso de *O. majusculus*, por ser el único enemigo natural en el que los huevos pueden observarse de forma fiable. En este caso, se aprecia claramente la curva en forma de "U", con una mortalidad que crece rápidamente según se acercan las temperaturas a sus umbrales mínimo y máximo de desarrollo. Bajo temperaturas intermedias, 20-30 ºC, se obtienen mortalidades inferiores al 34%. Mortalidades inferiores se encontraron para *O. laevigatus*, que parece soportar mejor las temperaturas más bajas y el intervalo medio-alto (entre los 30 y los 35 ºC) (Román-Fernández 2017). Es necesario mencionar que el sustrato de puesta utilizado, en este caso vainas de alubia verde, se va deteriorando con el tiempo, lo que puede afectar negativamente al huevo inserto en su tejido. Concretamente, cuando los bioensayos se realizan a temperaturas

muy bajas (lo que alarga considerablemente la duración del desarrollo del embrión) o muy elevadas, la vaina puede deteriorarse antes de la eclosión y, por lo tanto, afectar a la viabilidad del huevo (Figura 22).

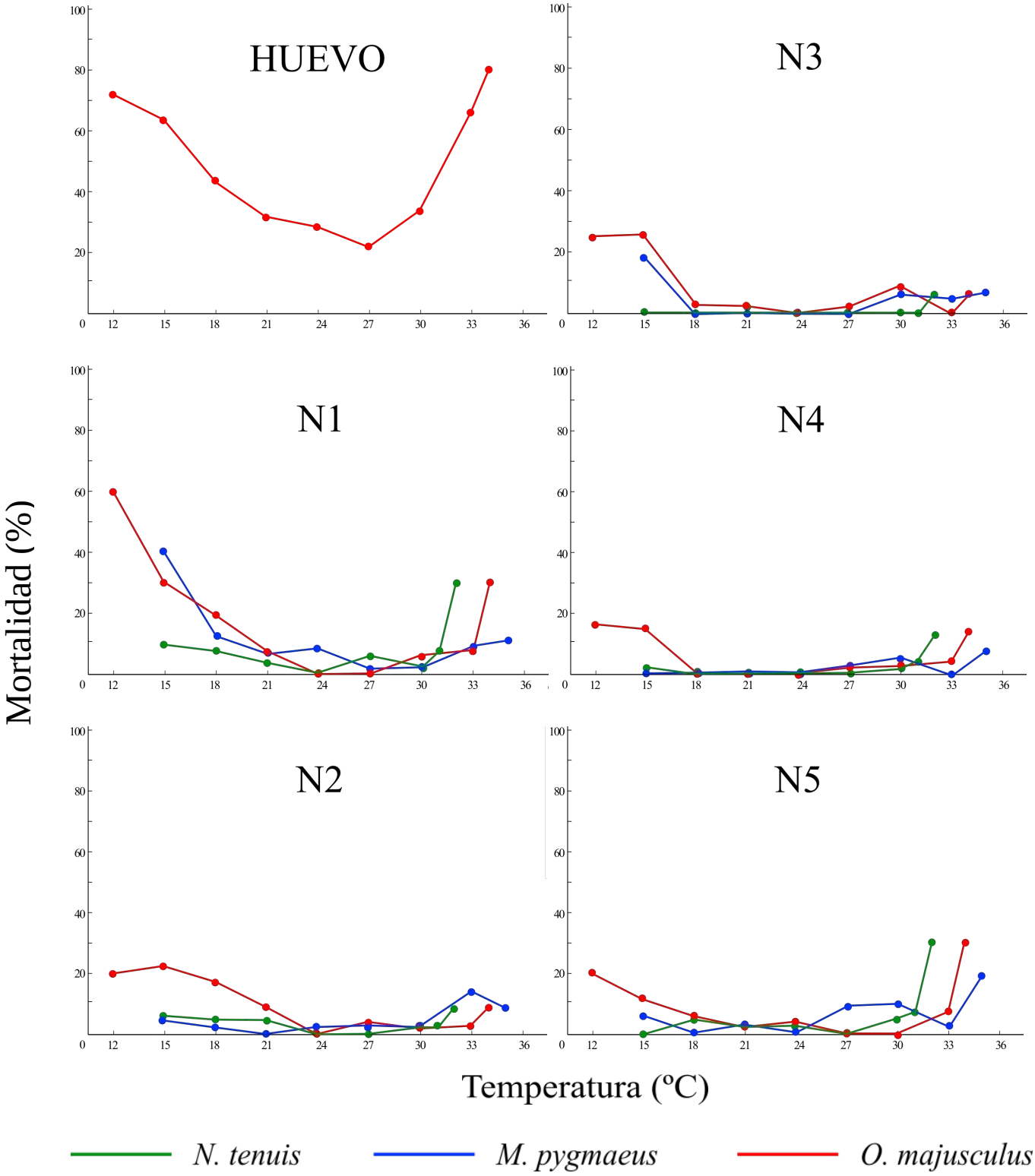


Figura 22. Mortalidades en función de la temperatura para todos los estados y estadios analizados de *N. tenuis*, *M. pygmaeus* y *O. majusculus*.

Los estadios ninfales ofrecen, en su mayor parte, mortalidades muy bajas, típicas de la zona valle de la "U", en los tres depredadores estudiados. Las temperaturas más altas y bajas estudiadas, apenas ofrecen mortalidades superiores al 20%. En casos muy concretos, como el estadio N1 de *N. tenuis* y *O. majusculus*, se observa un claro incremento de la mortalidad en las temperaturas más bajas, presentando la gráfica una forma de "J" invertida. Por el contrario, la N1 y N5 de *M. pygmaeus*, así como la N5 de *O. majusculus*, muestran una tendencia hacia forma de "J", con subidas bruscas de la mortalidad a las temperaturas más elevadas estudiadas. En el resto de estadios, como ya se ha mencionado, las mortalidades son muy pequeñas, propias de la zona de valle de la "U". Finalmente, cuando se considera el conjunto del estado ninfal, se aprecia una clara forma de "U" para *N. tenuis* y *O. majusculus*, mientras que en el caso de *M. pygmaeus* se puede observar una gráfica en forma de "J". Se aprecia una mayor mortalidad, para las tres especies, en los estadios N1 y N5, probablemente debido a la mayor fragilidad de las ninfas neonatas, en el primer caso, y a la mayor complejidad metabólica que supone el cambio de estado entre N5 y adulto, en el segundo. Esto se ha constatado igualmente en otros heterópteros depredadores, como *O. laevigatus* (Román-Fernández 2017).

No se encontraron diferencias significativas entre la mortalidad obtenida en los bioensayos realizados a temperatura constante de 24 ºC y a temperatura variable dentro de un día y con media de 24 ºC, para ninguno de los tres enemigos naturales. Este dato era el esperado, puesto que los valores térmicos utilizados para definir el día tipo no incluyeron temperaturas que provocan mortalidades elevadas en los bioensayos de temperaturas constantes. Por lo tanto, se confirma que las fluctuaciones térmicas dentro de un día, no afectaron a la mortalidad de estas especies. Por el contrario, al comparar las mortalidades de los bioensayos de laboratorio, tanto de temperaturas constantes como de variables dentro del día, con los bioensayos de exterior (obteniendo medias próximas a 24 ºC), se apreciaron diferencias significativas en el caso de *M. pygmaeus*. Analizando los registros térmicos recogidos por el data-logger en las condiciones de exterior, se puede observar que *M. pygmaeus* sufrió picos de temperatura que superaron los umbrales máximos de desarrollo en varios momentos. Este hecho no se produjo en los otros dos depredadores y, por lo tanto, se puede plantear que las diferencias observadas en condiciones de exterior son debidas a valores puntuales extremos alcanzados por la temperatura en dichas condiciones. Por todo lo anteriormente expuesto, y tal y como se refrenda en los datos obtenidos, las mortalidades obtenidas en condiciones de temperaturas variables dentro del día y de exterior, fueron muy bajas. Si bien no hay muchos datos en la bibliografía a este respecto, se encuentran similares conclusiones para *O. laevigatus* (Román-Fernández 2017).

7.2 TIEMPO DE DESARROLLO

La evolución de la tasa de desarrollo de los insectos en función de la temperatura muestra una forma característica, tanto para plagas como para enemigos naturales (Figura 13). Efectivamente, la tasa de desarrollo crece de modo casi asintótico a temperaturas bajas, para pasar hacerlo de acuerdo a un modelo lineal en gran parte del rango térmico de desarrollo del insecto. Una vez que las temperaturas se aproximan al valor óptimo, el crecimiento de la tasa de desarrollo se frena fuertemente, para, pasado dicho óptimo decaer bruscamente hasta el umbral máximo de desarrollo.

En el caso de *N. tenuis*, el tiempo total de desarrollo desciende desde 76,74 días, a 15 °C, hasta alcanzar un valor mínimo de 12,67 días, a los 33 °C para, a continuación, volver a incrementarse hasta 13,98 días, a 35 °C. Para *M. pygmaeus*, ese valor decrece desde 68,48 días, a 15 °C, hasta un mínimo de 18,69 días, a 30 °C. Desde ese valor, la duración del desarrollo vuelve a incrementarse hasta 23,44 días, a 32 °C. Finalmente, en el caso de *O. majusculus*, se parte de una duración máxima de 90,75 días, a 12 °C, que va descendiendo hasta un mínimo de 11,34 días, a 30 °C, y vuelve a incrementarse hasta 13,50 días, a 34 ºC.

Un aspecto que puede resultar de interés es la posible diferencia en la duración del desarrollo por sexos. Si bien en la bibliografía se reportan algunos casos en los que se presentan diferencias significativas entre machos y hembras (Jafari *et al.* 2012), esto no parece darse en el caso de los tres depredadores estudiados. Así, con la excepción de dos de las temperaturas ensayadas con *M. pygmaeus*, concretamente 15 y 18 ºC, no se han encontrado diferencias significativas entre sexos, tanto a temperaturas constantes, como variables dentro del día y en los bioensayos efectuados en el exterior.

Analizando las diferentes fases inmaduras, se puede observar cómo la duración del desarrollo es claramente mayor en el estado embrionario que en los estadios ninfales en el caso de los dos míridos. Dentro de los estadios ninfales, los intermedios (N2, N3 y N4) son los de menor duración, mientras que N1 y, especialmente, N5 son los de mayor duración. Este último caso probablemente se deba al cambio morfológico que debe sufrir para alcanzar el estado adulto. En el caso del antocórido *O. majusculus*, el estado de huevo y el estadio N5 también requieren más tiempo para completar su desarrollo, seguido de N1, mientras que los estadios N2, N3 y N4 son fases de desarrollo más breves. Este mismo patrón de comportamiento hallado en la duración del desarrollo de *O. majusculus*, es descrito por Román-Fernández (2017) para *O. laevigatus*.

7.3 MODELOS AJUSTADOS

Todos los modelos obtenidos han mostrado ajustes elevados a los datos observados. El modelo lineal, más sencillo y con importantes limitaciones en los extremos térmicos, ha mostrado buenos ajustes para el rango térmico intermedio, con valores del coeficiente de correlación (R^2_a) superiores a 0,86 en el caso de *N. tenuis*, de 0,97 para *M. pygmaeus*, y de 0,77 en el caso de *O. majusculus*. Su utilización, habitual durante muchos años, puede tener vigencia exclusivamente en casos en los que el insecto solo vaya a soportar temperaturas situadas en valores intermedios o en los que no sea necesaria precisión, sino tan solo orientación (Fan 1992). Sin embargo, dado que en muchas ocasiones las temperaturas saldrán de ese rango intermedio (por ejemplo, en el caso de insectos presentes en la cuenca mediterránea y en climas similares, en primavera y verano) y que en los modernos programas de control biológico se cuenta ya con herramientas matemáticas e informáticas que permiten un sencillo manejo de los modelos no lineales, resulta más recomendable utilizar estos últimos. Como han constatado otros autores, como Campbell *et al*. (1974), los modelos no lineales, considerando todo el rango de temperatura, ofrecen un mejor coeficiente de ajuste que el modelo lineal. En el presente estudio, los valores de la R^2_a para los modelos no lineales fueron superiores a 0,96 para *N. tenuis*, a 0,89 para *M. pygmaeus*, y a 0,92 para *O. majusculus*.

Los modelos no lineales, además, permiten el cálculo del umbral máximo de desarrollo y de la temperatura óptima de cada enemigo natural y para cada estado y estadio de desarrollo, datos que no pueden ser obtenidos con el modelo lineal. Los valores del UmD, de la $T_{ópt}$ y del UMD que ofrece el modelo de Logan tipo III se presentan en la Tabla 1. Se ha elegido este modelo por ser el que muestra una mayor calidad de predicción global en condiciones de exterior para los tres depredadores, si bien la diferencia con Lactin es mínima. Este modelo, a diferencia de los de Lactin y Brière, muestra una tendencia más asintótica hacia el eje de abscisas en su aproximación al umbral mínimo de desarrollo, arrojando valores de este generalmente más bajos. Así, se puede observar como esos mínimos, siempre inferiores a 10 ºC, se llegan a aproximar a 2 ºC en alguno de los depredadores y fases de desarrollo. La temperatura óptima oscila entre los 29,2 y los 35 ºC, siendo *N. tenuis* la especie que parece ofrecer mayores valores de la tasa de desarrollo a altas temperaturas, algo que se vuelve a apreciar para los valores del umbral máximo de desarrollo. Estos últimos, para las tres especies estudiadas, oscilan desde 33,1 hasta 40,4 ºC. Si bien no se

encuentra mucha información respecto a umbrales en la bibliografía, Román-Fernández (2017) obtuvo valores similares para otro antocórido como es *O. laevigatus*.

Estado / Estadio	Umbral mínimo de desarrollo (T_0)			Temperatura óptima ($T_{ópt}$)			Umbral máximo de desarrollo (T_{max})		
	Nt	Mp	Om	Nt	Mp	Om	Nt	Mp	Om
Huevo	5,9	5,2	7,8	35,0	29,2	30,7	35,1	33,1	36,9
N1	7,2	4,6	8,0	31,9	29,2	30,7	39,5	34,7	38,1
N2	6,8	3,2	9,6	33,1	29,8	31,1	40,3	33,8	35,0
N3	7,1	2,3	4,4	33,0	29,3	31,3	40,4	33,7	39,8
N4	6,7	1,9	5,5	32,8	30,0	31,0	36,3	34,3	33,1
N5	6,2	1,8	4,5	32,3	30,8	30,9	38,6	33,4	33,1

Tabla 1. Umbrales de desarrollo y temperaturas óptimas de *N. tenuis* (Nt), *M. pygmaeus* (Mp) y *O. majusculus* (Om) según el modelo de Logan tipo III.

Tanto las gráficas que son representación de los modelos ajustados, como los parámetros que los definen, se encuentran en los artículos presentados en el apartado de compendio de publicaciones. Con el objetivo de poder comparar la evolución de cada fase de desarrollo entre los tres enemigos naturales, sus gráficas comparadas se presentan en la Figura 23. Se puede apreciar como *M. pygmaeus* muestra un desarrollo claramente más lento que *N. tenuis* y *O. majusculus*. Se observa que, para los tres enemigos naturales, la fase de huevo y el estadio ninfal N5 son claramente más lentos, posiblemente debido a la complejidad de las transformaciones fisiológicas que implican. En general, *N. tenuis* y *O. majusculus* presentan tasas de desarrollo similares para todas las fases inmaduras, excepto en el estado de huevo, en el que *N. tenuis* tiene una tasa menor, y en el estadio N5, en el que ocurre lo contrario. Las fases más veloces son N2, N4 y especialmente N3, con duraciones de poco más de un día para completar su desarrollo a la temperatura óptima. En todas las especies se aprecia que en estas tres fases de desarrollo de menor duración, la caída de la curva, tras la temperatura óptima, es más brusca, por lo que la diferencia entre esta y el umbral máximo de desarrollo es menor.

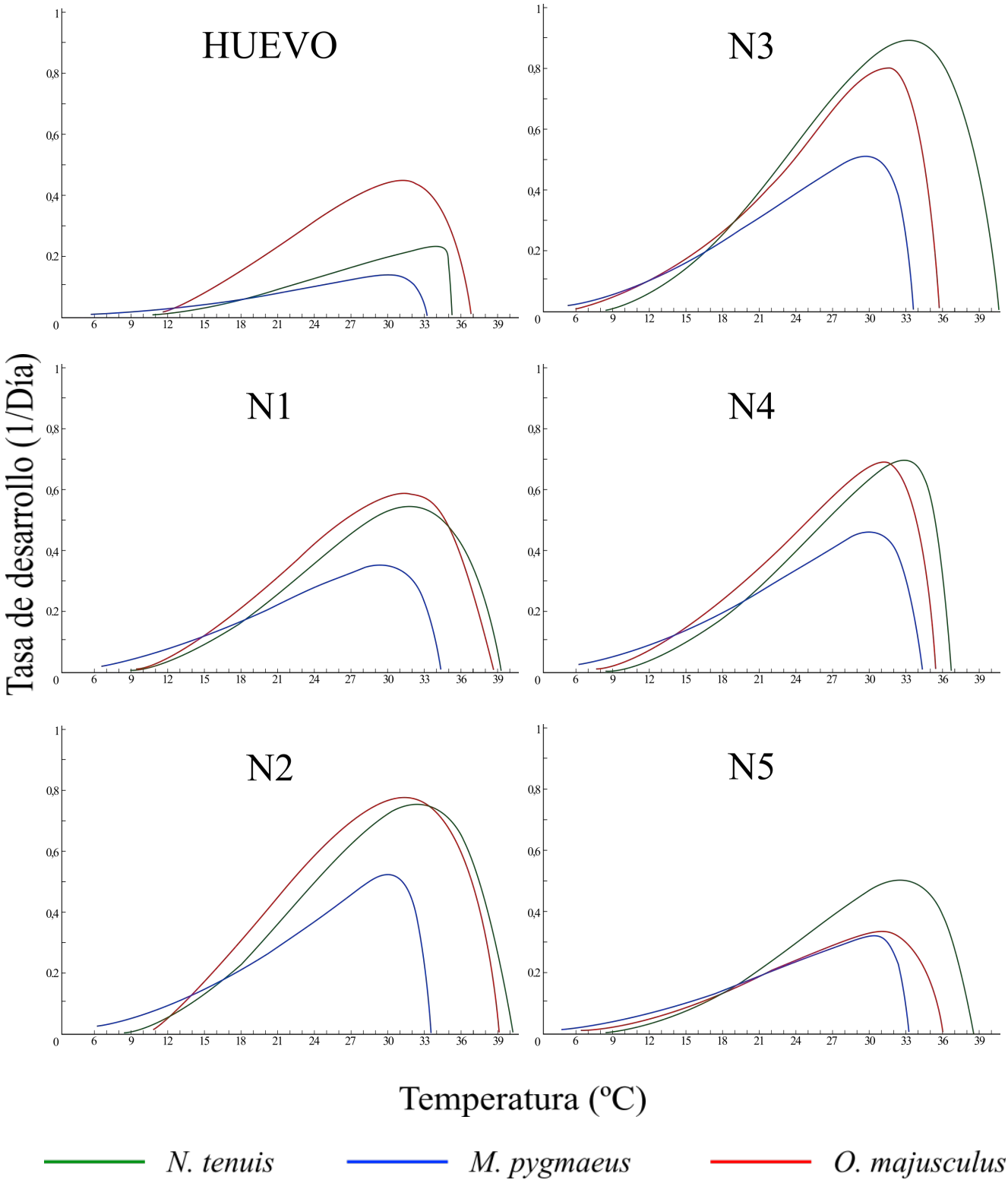


Figura 23. Comparación de los ajustes del modelo Logan tipo III para las diferentes fases de desarrollo de *N. tenuis*, *M. pygmaeus* y *O. majusculus*.

7.4 EVALUACIÓN DE LOS MODELOS

Antes de evaluar los modelos en condiciones de exterior, se comprobó si la variación intradiaria de la temperatura afectaba a la tasa de desarrollo. Para ello, se analizaron posibles diferencias entre las tasas obtenidas a la temperatura constante de 24 ºC y las obtenidas a una temperatura variable dentro de un día cuya media era de 24 ºC. Si bien para *N. tenuis* sí que se encontraron diferencias significativas, estas fueron de menos de un día (23,16 frente a 22,20 días, respectivamente) y, posiblemente, detectadas como significativas por la muy reducida varianza de la variable duración del desarrollo. Por su parte, las diferencias no fueron significativas para *M. pygmaeus* (27,69 frente a 27,98 días), ni para *O. majusculus* (15,02 frente a 15,25 días). Esta situación es la que ha sido encontrada con más frecuencia, si bien, se han citado casos excepcionales, como ocurre con el desarrollo embrionario de *Xylotrechus arvicola* Olivier (Coleoptera: Cerambycidae) (García Ruiz *et al*. 2011). En otros heterópteros, como *O. laevigatus*, tampoco se constatan diferencias (Román-Fernández 2017). La ausencia de las mismas, o en el caso de *N. tenuis* lo exiguo de ellas, permite la validación en condiciones de exterior de los modelos obtenidos con temperaturas constantes.

La validación en condiciones de exterior se lleva a cabo comparando las duraciones del desarrollo predichas por los modelos con las obtenidas empíricamente en esas condiciones de exterior. La observación de los resultados obtenidos permite apreciar que el modelo lineal es el que ofrece valores más diferentes, penalizado por los errores en la predicción de la tasa de desarrollo a temperaturas bajas y, sobre todo a las más altas (desviación que es más acusada cuanto más se acerquen y superen al óptimo de desarrollo). Si bien, los porcentajes de ajuste que indican la calidad de la predicción de los modelos lineales obtenidos en el presente trabajo (Tabla 2) son bastante altos, esto puede ser debido a que las temperaturas alcanzadas en condiciones de exterior no fueron muy elevadas.

Estado / Estadio	Lineal		
	Nt	Mp	Om
Huevo	77,23	95,83	78,30
N1	90,74	75,57	95,96
N2	91,20	92,16	92,82
N3	81,42	70,74	83,86
N4	83,01	98,91	94,86
N5	98,43	98,90	89,07

Tabla 2. Porcentajes de ajuste entre la duración del desarrollo de las fases inmaduras de *N. tenuis* (Nt), *M. pygmaeus* (Mp) y *O. majusculus* (Om) predichas por los modelos lineales y los valores empíricos obtenidos en condiciones de exterior.

En cuanto a la calidad de la predicción ofrecida por los modelos no lineales, se puede afirmar que es muy elevada en los tres casos, presentando, en conjunto, porcentajes de ajuste mayores, el modelo de Logan tipo III en ambos míridos. También es destacable la elevadísima calidad de predicción que todos los modelos ofrecen para la duración del desarrollo de *O. majusculus* (Tabla 3). Si bien el modelo de Logan tipo III es el más complejo matemáticamente hablando (al disponer de 5 parámetros, frente a los 4 del de Brière y los 3 del de Lactin), las actuales herramientas matemáticas e informáticas de que se dispone, capaces de convertir valores de la temperatura en tasa de desarrollo de forma sencilla e inmediata independientemente de la complejidad de la función con la que se trabaje, invitan a su uso.

Estado / Estadio	Logan tipo III			Lactin			Brière		
	Nt	Mp	Om	Nt	Mp	Om	Nt	Mp	Om
Huevo	98,52	98,71	97,01	100,00	99,27	97,71	74,22	98,59	97,01
N1	95,03	80,92	91,35	94,12	78,60	90,31	84,12	73,56	91,35
N2	97,01	90,08	99,76	98,81	90,08	99,76	97,02	92,25	99,76
N3	81,43	76,60	97,60	81,20	77,96	93,72	81,24	75,25	98,90
N4	90,74	99,61	93,34	90,14	99,74	91,14	76,00	97,13	95,53
N5	91,42	94,07	97,22	90,92	97,36	97,80	91,84	99,34	97,80

Tabla 3. Porcentajes de ajuste entre las predicciones de los modelos no lineales para la duración del desarrollo de las fases inmaduras de *N. tenuis* (Nt), *M. pygmaeus* (Mp) y *O. majusculus* (Om) y los valores empíricos obtenidos en condiciones de exterior.

La mayor calidad en la predicción por parte del modelo de Logan tipo III puede verse relacionada precisamente con su mayor complejidad matemática y ese mayor número de parámetros. Así, en trabajos similares, dicho modelo igualmente presentó la calidad de predicción más elevada (Román-Fernández 2017), si bien también es posible encontrar resultados que muestran al modelo de Lactin, que tiene un parámetro menos que el anterior, como el de mayor calidad predictiva cuando compara temperaturas constantes con variables, no en validación exterior (Sánchez-Ramos *et al.* 2015). Común en todos los casos es que el modelo Brière, el más sencillo, no redunda en una mejor aproximación a la duración del desarrollo de los insectos en el exterior.

8. CONCLUSIONES

De los trabajos realizados se pueden extraer las siguientes conclusiones principales desglosadas por especies.

Conclusiones en relación con *Nesidiocoris tenuis*

1. *N. tenuis* es capaz de completar su desarrollo en un rango de temperaturas constantes comprendido entre 15 y 35 ºC.
2. La tasa de supervivencia fue superior al 88% a temperaturas comprendidas entre 18 y 30 ºC, mientras que la mortalidad se incrementó a 16 y 35 ºC, especialmente a la temperatura más baja, donde alcanzó valores superiores al 50%. A 12 y 36 ºC no se produjo la eclosión de los huevos.
3. A las temperaturas constantes ensayadas, la duración del desarrollo osciló entre 12,67 días, a 33 ºC, y 76,74 días, a 15 ºC.
4. Teniendo en cuenta la tasa de desarrollo y el porcentaje de mortalidad, las condiciones de temperatura más favorables para la cría masiva de este depredador están comprendidas entre 27 y 30 ºC.
5. La variación intradiaria de la temperatura afectó ligeramente a la duración del desarrollo del estado de huevo y a los estadios ninfales N2, N3 y N4 respecto al tiempo de desarrollo bajo condiciones de temperatura constante. Esta ligera diferencia significativa puede ser explicada por la muy reducida variación intragrupos propia de la variable duración del desarrollo.
6. Los umbrales térmicos de desarrollo predichos por los diferentes modelos variaron entre 5,9 ºC, según el modelo de Logan tipo III, y 43,4 ºC, según el modelo de Brière, ambos para el estado de huevo.
7. La validación de los modelos en condiciones de exterior mostró que el de Logan tipo III es el modelo matemático que con mayor exactitud predice el conjunto de eventos fenológicos de *N. tenuis*, ofreciendo porcentajes de predicción siempre superiores al 81%.

Conclusiones en relación con *Macrolophus pygmaeus*

8. *M. pygmaeus* completa su desarrollo en un rango de temperaturas contantes comprendido entre 15 y 32 ºC.

9. Las tasas de supervivencia fueron superiores al 80% entre 15 y 31 ºC. Fuera de este intervalo la mortalidad aumentaba bruscamente de modo que a 12 y 33 ºC no se completó el desarrollo embrionario.

10. El tiempo de desarrollo total osciló entre un máximo de 66,48 días, a 15 ºC, hasta un mínimo de 18,69 días, a 30 ºC.

11. Considerando la tasa de desarrollo y los porcentajes de mortalidad, las condiciones de temperatura más adecuadas para la cría masiva de *M. pygmaeus* se sitúan entre 27 y 30 ºC.

12. La variación intradiaria de la temperatura no ocasionó diferencias significativas en la duración del desarrollo de ninguno de los estados inmaduros con respecto al tiempo de desarrollo a temperatura constante.

13. Los modelos utilizados predijeron unos umbrales térmicos de desarrollo comprendidos entre 1,8 ºC, según el modelo de Logan tipo III, y 38 ºC, según el modelo de Brière.

14. La validación de los modelos en condiciones de exterior mostró unos niveles muy elevados de predicción (superior al 93% de ajuste) para todos los modelos analizados, siendo el modelo de Logan tipo III el que mejor predijo el desarrollo total del mírido, con un porcentaje de ajuste superior al 96%.

Conclusiones en relación con *Orius majusculus*

15. *O. majusculus* es capaz de completar su desarrollo en un intervalo de temperatura constante comprendido entre 12 y 34 ºC.

16. La duración máxima del desarrollo (90,75 días) ocurrió a 12 ºC, mientras que la mínima se estableció en 11,34 días, a 30 ºC.

17. Salvo para el estado de huevo, la supervivencia fue superior al 80% entre 21 y 33 ºC. A 10 y 35 ºC, los huevos no consiguieron eclosionar.

18. A tenor de los datos obtenidos para las tasas de supervivencia y de desarrollo, el intervalo óptimo de temperatura para la cría masiva de *O. majusculus* se puede establecer entre 24 y 30 ºC.

19. La duración del desarrollo de *O. majusculus* no se vio afectada por la variación intradiaria de la temperatura, salvo para el estadio ninfal N4, que fue ligeramente más largo a temperatura variable.

20. Los umbrales térmicos de desarrollo predichos por los diferentes modelos para *O. majusculus* oscilaron entre 4,4 y 39,8 ºC, ambos valores según el modelo de Logan tipo III.

21. Los modelos no lineales ofrecieron porcentajes de precisión muy elevados (superiores al 90%) en la duración del desarrollo del depredador respecto a la obtenida en condiciones de exterior, resultando ser el modelo de Brière el más preciso.

Conclusiones generales

El conocimiento generado en el presente trabajo sobre cómo afecta la temperatura a la mortalidad y la tasa de desarrollo del estado de huevo y de los estadios ninfales de tres importantes especies de enemigos naturales (*N. tenuis*, *M. pygmaeus* y *O. majusculus*) presenta un elevado interés práctico. Así, resulta obvia la importancia de tales conocimientos para llevar a cabo su cría masiva, bien en laboratorio con fines de investigación, bien en biofábricas para su utilización en estrategias de control biológico por inundación. Por otro lado, el conocimiento de los umbrales mínimo y máximo y de la temperatura óptima de desarrollo puede aplicarse para establecer su fecha de liberación en los momentos más favorables. Finalmente, conocer la evolución de su desarrollo a partir de la simple medición de la temperatura facilita conseguir importantes objetivos que optimicen su utilización como agentes de control biológico: la sincronización de sus sueltas con la fenología de sus presas y la programación de tratamientos fitosanitarios de modo que se minimice la peligrosidad de los mismos para sus poblaciones. En definitiva, la presente tesis genera un conocimiento básico y necesario para la optimización del empleo de los tres depredadores como agentes de control biológico, en el contexto del manejo integrado de importantes plagas agrícolas.

9. FUTUROS TRABAJOS

Las puertas que abren los conocimientos generados en la presente tesis y que han sido mencionadas en las conclusiones, no hacen sino abrir otras muchas tras de sí. Durante el transcurso de las investigaciones y las posteriores disertaciones sobre los resultados de las mismas, han surgido algunas preguntas, planteamientos y temas que, entendemos, podrían ser de un enorme interés para futuros trabajos. Son los siguientes:

1. Generar conocimientos paralelos a los obtenidos en la presente tesis, para las plagas-presa más destacables de los enemigos naturales aquí analizados. Igualmente interesante sería hacer lo mismo con otros enemigos naturales que pudieran estar presentes en el mismo agroecosistema. Con todo ello, se podría optimizar el uso combinado de enemigos naturales en estrategias inundativas de control biológico o en control biológico por conservación considerando la comunidad de enemigos naturales presente en el agroecosistema.
2. Continuar generando conocimientos sobre la peligrosidad de los productos fitosanitarios sobre los diferentes estados y estadios de desarrollo de los enemigos naturales.
3. Elaborar una herramienta informática sencilla y accesible que, en base a datos de la temperatura de una zona determinada, permita conocer en tiempo real la fenología de plagas y enemigos naturales en dicha zona.
4. Mejorar de modo continuo la herramienta anterior ampliando su base de datos con modelos de desarrollo de más plagas y enemigos naturales y validando esos modelos en cada zona geográfica concreta.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Alauzet, C., Dargagnon, D. y Malausa, J.C. 1992. Production d'un Hétéroptère prédateur: *Orius majusculus* (Rt.) (Heteroptera: Anthocoridae). Entomophaga 37: 249–252.

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

Alvarado, P., Baltá, O. y Alomar, O. 1997. Efficiency of four heteroptera as predators of *Aphis gossypii* and *Macrosiphum euphorbiae* (Hom: Aphididae). Entomophaga 42(1,2): 215–226.

Amor, F. 2013. Compatibilidad de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) y *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae), depredadores importantes en cultivos hortícolas protegidos, con nuevas barreras físicas selectivas y modernos plaguicidas. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.

Aragón, M. 2017. Evaluación y manejo de *Orius laevigatus*, *Anthocoris nemoralis* (Hemiptera: Anthocoridae), *Nesidiocoris tenuis* y *Macrolophus pygmaeus* (Hemiptera: Miridae) como agentes de control biológico de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis doctoral. Universidad de La Rioja.

Arnó, J., Ariño, J., Español, R., Martí, M. y Alomar, O. 2000. Conservation of *Macrolophus caliginosus* Wagner (Het. Miridae) in commercial greenhouses during tomato crop-free periods. IOBC/WPRS Bulletin 23: 241–246.

Arnó, J., Castañé, C., Riudavets, J., Roig, J. y Gabarra, R. 2006. Characterization of damage to tomato plants produced by the zoophytophagous predator *Nesidiocoris tenuis*. IOBC/ WPRS Bulletin 29: 249–254.

Arnó, J., Sorribas, R., Prat, M., Matas, M., Pozo, C., Rodríguez, D., Garreta, A., Gomez, A. y Gabarra, R. 2009. *Tuta absoluta*, a new pest in IPM tomatoes in the northeast of Spain. IOBC/WPRS Bulletin 49: 203–208.

Arnó, J. y Gabarra, R. 2011. Side effects of selected insecticides on the *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) predators *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae). Journal Pest Science 84(4): 513–520.

Arnold, C.Y. 1960. Maximum-minimum temperatures as a basic for computing heat units. In Proceedings of the American Society for Horticultural Sciences, Boston, Vol. 76, No. 1. pp. 682-692 .

Avilla, J., Albajes, R., Alomar, O., Castañé, C. y Gabarra, R. 2004. Biological control of whiteflies in protected vegetable crops, in Biological Control of Arthropod Pests in Protected Culture, ed. por Parrella MP y Heinz KM. Ball Publishing, Batavia, IL, pp. 171–184.

Bahşi, Ş.Ü. y Tunc, Í. 2012. The response of a southern strain of *Orius majusculus* (Reuter) (Hemiptera: Anthocoridae) to photoperiod and light intensity: biological effects and diapause induction. Biological Control 63: 157–163.

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

Beck, S.D. 1983. Insect thermoperiodism. Annual Review of Entomology 28: 91-108.

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

Bielza, P. 2010. La resistencia a insecticidas en *Tuta absoluta*. Phytoma Espana. 217: 103–106.

Bosco, L. y Tavella, L. 2008. Collection of *Orius* species in horticultural areas of northwestern Italy. Bulletin of Insectology 61: 209–210.

Brière, J., Pracros, P., Le Roux, A. y Pierre, J. 1999. A novel rate model of temperature-dependent development for arthropods. Environmental Entomology 28: 22-29.

Calvo, J. y Urbaneja, A. 2003. *Nesidiocoris tenuis* (Het: Miridae) en tomate: ¿Amigo o enemigo? Almería en verde 4: 21-23.

Calvo, J. y Urbaneja, A. 2004. *Nesidiocoris tenuis*, un aliado para el control de biológico de la mosca blanca. Horticultura Internacional 44: 20-25.

Calvo, J., Bolckmans, K., Stansly, P.A. and Urbaneja, A. 2009. Predation by *Nesidiocoris tenuis* on *Bemisia tabaci* and injury to tomato. BioControl 54: 237–246.

Calvo, J., Bolckmans, K., y Belda, J.E. 2012. Release rate for a pre-plant application of *Nesidiocoris tenuis* for *Bemisia tabaci* control in tomato. BioControl: 1-9.

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

Candolle, A.P. 1855. Geographique botanique, raisonée. París

Castañé, C., Arnó, J., Gabarra, R. y Alomar, O. 2011. Plant damage to vegetable crops by zoophytophagous mirid predators. Biological Control 59(1): 22–29.

Castañé, C., Agustí, N., Arnó, J., Gabarra, R., Riudavets, J., Comas, J. y Alomar, O. 2013. Taxonomic identification of *Macrolophus pygmaeus* and *Macrolophus melanotoma* based on morphometry and molecular markers. Bulletin of Entomological Research 103(2): 204-215.

Chambers R.J., Long, S. y Helyer, N.L. 1993. Effectiveness of *Orius laevigatus* (Hem.: Anthocoridae) for the control of *Frankliniella occidentalis* on cucumber and pepper in the Uk. Biocontrol Science and Technology 3: 295–307.

Constant, B., Grenier, S. y Bonnot, G. 1994. Analysis of some morphological and biochemical characteristics of the eggs of the predaceous bug *Macrolophus caliginousus* (Het: Miridae) during embryogenesis. Entomophaga 39(2): 189-198.

Cuthbertson, A.G.S., Blackburn, L.F. y Audsley, N. 2014. Efficacy of commercially available invertebrate predators against *Drosophila suzukii*. Insects 5: 952-960.

Davidson, J. 1944. On the relationship between temperature and rate of development of insect at constant temperatures. Journal of Animal Ecology 64: 26-38.

Dolling, W.R. 1991. The Hemiptera. Oxford University Press, New York.

El-Dessouki, S.A., El-Kifl, A.H. y Helal, H.A. 1976. Life cycle, host plants and symptons of damage of the tomato bug, *Nesidiocoris tenuis* Reut. (Heteroptera: Miridae), in Egypt. Journal of Plant Diseases and Protection 83(4): 204-220.

Fauna Europaea. 2016. http://www.faunaeur.org (Consulta realizada el 30/4/2018).

Fan, Y. 1992. Temperature-dependent development of Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae) under constant and variable temperatures. Journal of Economic Entomology 85: 1762–1770.

Franco, K. 2010. Biología de la reproducción de los míridos depredadores *Macrolophus pygmaeus* y *Nesidiocoris tenuis*. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.

Gabarra, R., Alomar, O., Castañé, C., Goula, M. y Albajes, R. 2004. Movement of greenhouses whitefly and its predators between in- and outside of Mediterranean greenhouses. Agriculture, Ecosystems Environment 102: 341-348.

García-Ruiz, E., Marco, V., y 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). Environmental Entomology 40: 939–947.

Gemeno, C., Alomar, O., Riudavets, J. y Castañé, C. 2007. Mating periodicity and post-mating refractory period in the zoophytophagous plant bug *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae). European Journal of Entomology 104: 715-720.

Goula, M y Alomar, O. 1994. Míridos (Heteroptera Miridae) de interés en el control integrado de plagas en el tomate. Guía para su identificación. Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas 20: 131-143.

Hansen, D.L., Brodsgaard, H.F. y Enkegaard, A. 1999. Life table characteristics of *Macrolophus caliginosus* preying upon *Tetranychus urticae*. Entomologia Experimentalis et Applicata 93: 269–275.

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

Jacobsen, S.K., Alexakis, I. y Sigsgaard, L. 2016. Antipredator responses in *Tetranychus urticae* differ with predator specialization. Journal of Applied Entomology 140: 228-231.

Jafari, S., Fathipour, S. y Faraji, F. 2012. Temperature-dependent development of *Neoseiulus barkeri* (Acari: Phytoseiidae) on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) at seven constant temperaturas. Insect Science 19: 220–228.

Jandel Scientific. 1994. Tablecurve 2D User's Manual. San Rafael, CA, Jandel Co.

Janisch, E. 1925. Über die Temperaturabhängigkeit biologischer Vorgange und ihre Kurvenmassige Analyse. Pflügers Archiv. European Journal of Physiology 209: 414-436.

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

Kogan, M. 1998. Integrated Pest Management: Historical perspectives and contemporary developments. Annual Review of Entomology 43(1): 234-270.

Kogan, M. y Shenk, M. 2002. Conceptualización del Manejo Integrado de Plagas en escalas espaciales y niveles de integración más amplios. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 65: 34-42.

Lactin, D.J., Holliday, N.J., Johnson, D.L. y Craigen, R. 1995. Improved rate model of temperature-dependent development by arthropods. Environmental Entomology 24: 68-75.

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

Lenfant, C., Ridray, G. y Schoen, L. 2000. Biopropagation of *Macrolophus caliginosus* (Wagner) for a quicker establishment in southern tomato greenhouses. IOBC/WPRS Bulletin 23: 241–246.

Li, D. 1995. Development and survival of *Erigonidium graminicolum* (Sundevall) (Araneae: Linyphiidae: Erigoninae) at constant temperatures. Bulletin of Entomological Research 85: 79-91.

Logan, J., Wollkind, D., Hoyt, S. y Tanigoshi, L. 1976. An analytic model for description of temperature dependent rate phenomena in arthropods. Environmental Entomology 5: 1133-1140.

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

Madeira, F. y X. Pons. 2015. Effects of weed density on the dispersal of *Orius majusculus* Reuter (Heteroptera Anthocoridae) within maize. Journal of Applied Entomology 139: 712–720.

Malais, M.H. y Ravensberg, W.J. 1992. Conocer y reconocer las plagas de cultivos protegidos y sus enemigos naturales. Koppert Biological Systems.

Marco, V., Taberner, A. y Castañera, P. 1997. Development and survival of immature *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera: Curculionidae) at constant temperatures. Annals of the Entomological Society of America 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. Boletín de la S.E.A 28: 147-150.

Martínez-García, H., Román-Fernández, L.R., Sáenz-Romo, M.G. Pérez-Moreno, I. y 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: 215-224.

Martínez-García, H., Saénz-Romo, M.G., Aragón-Sánchez, M., Román-Fernández, L.R., Sáenz-de-Cabezón, E., Marco-Mancebón, V. y Pérez-Moreno, I. 2017. Temperature-dependent development of *Macrolophus pygmaeus* and its applicability to biological control. BioControl 62: 481-493.

Martínez-García, H., Aragón-Sánchez, M., Sáenz-Romo, M., Román-Fernández, L.R., Veas-Bernal, A., Marco-Mancebón, V. y Pérez-Moreno, I. 2018. Mathematical models for predicting development of *Orius majusculus* and its applicability to biological control. Journal of Economic Entomology 1-11. DOI: 10.1093/jee/toy127.

Mollá, O., Montón, H., Vanaclocha, P., Beitia, F. y Urbaneja, A. 2009. Predation by the mirids *Nesidiocoris tenuis* and *Macrolophus pygmaeus* on the tomato borer *Tuta absoluta*. IOBC/ WPRS Bulletin (49): 209-214.

Mollá, O., González-Cabrera, J. y Urbaneja, A. 2011. The combined use of *Bacillus thuringiensis* and *Nesidiocoris tenuis* against the tomato borer *Tuta absoluta*. BioControl 56: 883–891.

Montserrat, M., Albajes, R. y Castañé, C. 2004. Behavioral responses of three plants inhabiting predators to different prey densities. Biological Control 30: 256–264.

Moreno-Ripoll, R., Gabarra, R., Symondson, W.O.C., King, R.A. y Agustí, N. 2012. Conspecific and heterospecific interactions between two omnivorous predators on tomato. Biological Control 62: 189–196.

Perdikis, D.C. y Lykouressis, D.P. 2000. Effects of various items, host plants, and temperatures on the developmental and survival of *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Heteroptera: Miridae). Biological Control 17: 55–60.

Pérez-Hedo, M. y Urbaneja, A. 2014. Prospects for predatory mirid bugs as biocontrol agents of aphids in sweet peppers. Journal of Pest Science 88: 65–73.

Pericart, J. 1972. Hemipteres Anthocoridae, Cimicidae et Microphysidae de l'Ouest-Palearctique. En Faune de l'Europe et du Bassin Mediterraneen 7. Masson et Cie, Paris, pp. 1-190.

Pumariño, L. y Alomar, O. 2012. The role of omnivory in the conservation of predators: *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae) on sweet alyssum. Biological Control 62: 24–28.

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. Boletín Oficial del Estado, núm. 223, de 15 de septiembre de 2012. 42 pp. https://www.boe.es/buscar/pdf/2012/BOE-A-2012-11605-consolidado.pdf

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

Riudavets, J. 1995. Predators of *Frankliniella occidentalis* (Per.) and *Thrips tabaci* Lind: a review. Wageningen Agricultural University Papers 95: 43–87.

Riudavets, J., y Castañé, C. 1998. Identification and evaluation of native predators of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) in the Mediterranean. Environmental Entomology 27: 86– 93.

Román-Fernández, L.R. 2017. Contribuciones para la optimización del manejo de *Orius* (*Orius*) *laevigatus* y *Anthocoris nemoralis* (Hemiptera: Anthocoridae) como agentes de control biológico de plagas. Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja.

Rozenberg, T., Shaltiel-Harpaz, L. y Coll, M. 2015. Visualizing eggs of *Nesidiocoris tenuis* (Heteroptera: Miridae) embedded in tomato plant tisúes. Entomological Science 18: 400–402.

Sánchez, J.A. 2009. Density thresholds for *Nesidiocoris tenuis* (Heteroptera: Miridae) in tomato crops. Biological Control 51: 493–498.

Sánchez, J.A., Lacasa, A., Arnó, J., Castañé, C. y Alomar, O. 2009. Life history parameters for *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Het., Miridae) under different temperature regimes. Journal of Applied Entomology 133: 125–132.

Sánchez-Ramos, I., Pascual, S., Fernández, C.E., Marcotegui, A. y 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. y Peairs, L.M. 1913. The relation of temperature to insect life. New Hampshire College of Agriculture and the Mechanic Arts. Bulletin Nº 7.

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

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

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

Sharpe, P.J.H. y DeMichele, D.W. 1977. Reaction kinetics of poikilotherm development. Journal of Theoretical Biology 64: 649-670.

Siqueira, H.A.A., Guedes, R.N.C., Fragoso, D.B. y Magalhaes, L.C. 2001. Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). International Journal of Pest Management 47: 247–251.

Stinner, R.E., Gutiérrez, A.P. y Butler, G.D. 1974. An algorithm for temperature-dependent growth rate stimulation. The Canadian Entomologist 106: 519-524.

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

Trottin-Caudal, Y., Grasselly, D., Trapateau, M., Dobelin, H. y Millot, P. 1991. Lutte biologique contre *Frankliniella occidentalis* avec *Orius majusculus* sur concombre. IOBC/WPRS Bulletin 14(5): 50-55

Trottin-Caudal, Y. y Millot, P. 1994. Lutte integrée contre les ravageurs sur tomate sous perspectives en Fiance. IOBC/WPRS Bulletin 17(5): 5–13.

Tommasini, M.G. y Nicoli, G. 1994. Adult activity of four *Orius* species reared on two preys. IOBC/WPRS Bulletin 17: 237–241.

Urbaneja, A. 2003. Influence of the prey on the biology of *Nesidiocoris tenuis* (Hem.: Miridae). Bulletin OILB/SROP 26: 159.

Urbaneja, A., Tapia, G. y Stansly, P. 2005. Influence of host plant and prey availability on developmental time and survivorship of *Nesidiocoris tenius* (Het.: Miridae). Biocontrol Science and Technology 15: 513–518.

Urbaneja, A., González-Cabrera, J., Arnó, J., y Gabarra, R. 2012. Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. Pest Management Science 68: 1215–1222.

Van Driesche, R.G., Hoddle, M.S. y 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. 2003. Commercial availabilty of biological control agents. En: Van Lenteren, J.C. (ed.). Quality control and production of biological control agents: theory and testing producedires. CABI Publishing, UK. pp: 167-179.

Van Lenteren, J.C. 2012. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. BioControl 57: 1-20.

Wagner, T.L., Wu, H., Sharpe, P.J.H., Schoolfield, R.M. y Coulson, R.N. 1984. Modeling insect development rates: a literature review and application of a biophysical model. Annals of the Entomological Society of America 77: 208–225.

Zappalà, L., Siscaro, G., Biondi, A., Mollá, O., González-Cabrera, J. y Urbaneja, A. 2011. Efficacy of sulphur on *Tuta absoluta* and its side effects on the predator *Nesidiocoris tenuis*. Journal applied entomology 136(6): 401-409.