



Universidad
Politécnica
de Cartagena



Universidad
Politécnica
de Cartagena

Campus
de Excelencia
Internacional

Variabilidad genética y resistencia a
insecticidas en *Orius laevigatus*
(Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae)
para mejorar su eficacia en el
control de plagas

Técnicas Avanzadas en Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario

Virginia Balanza Martínez

Cartagena 2021



Universidad
Politécnica
de Cartagena

Campus
de Excelencia
Internacional

Variabilidad genética y resistencia a
insecticidas en *Orius laevigatus* (Fieber)
(Hemiptera: Anthocoridae) para mejorar su
eficacia en el control de plagas

Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo
Agrario y Alimentario

Autora: Virginia Balanza Martínez

Director: Pablo Bielza Lino

Cartagena 2021

A mis hijos José y Virginia

AGRADECIMIENTOS

Al final nada ha salido según mis planes, pero lo importante de llegar a la meta, es lo que aprendes y vives en el camino. Este camino ha sido largo, con muchas dificultades, pero también con alegrías. Desde que empecé a trabajar en el laboratorio 3 de la finca Tomás Ferro hasta hoy, han sucedido muchas cosas en mi vida, pero las más importantes han sido los nacimientos de mis hijos. Estos hechos, que no cambio por nada en el mundo, me han llevado a retrasar mi meta, pero al final lo he conseguido. Lo importante es no rendirse. En las siguientes líneas quiero dar las gracias a todas esas personas que han sido para mí un apoyo fundamental durante todo este tiempo:

En primer lugar, quiero agradecer a mi director Pablo Bielza, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y poder realizar esta tesis. Él ha sido mi “maestro”, me ha enseñado, aconsejado, ayudado y animado cada vez que lo he necesitado.

A mi compañero y amigo Enrique, con el que he trabajado todos estos años codo con codo. Ha sido un pilar fundamental en la realización de esta tesis, sin él no hubiera sido posible. Me ha ayudado muchísimo y siempre me ha apoyado emocionalmente en los momentos complicados. Nunca sabré como agradecerle tanto.

A Amador, porque es un gran compañero, amigo y alguien en quien se puede confiar. Hemos formado también un buen equipo. Gracias por animarme y estar ahí.

A Carolina, Inma y Nerea, muchas gracias, porque sois geniales, siempre nos hemos llevado muy bien y me habéis animado y aconsejado cuando lo he necesitado. Sois un haz de energía positiva.

A Javi, por haber estado siempre dispuesto a echar una mano en la realización de los ensayos.

A Estefanía, aunque la conozco poco tiempo, pero hemos simpatizado, y está escuchando sin condición todo el proceso necesario para depositar la tesis. Espero no aburrirla mucho.

A todas las personas que pasaron por el laboratorio 3 de la finca Tomás Ferro, donde empezó todo este trabajo. En especial a Mariela, Eli, María Inglés, Francisco y Edo, de todos he aprendido algo y hemos pasado muy buenos momentos juntos.

A Ana, por todos esos momentos que hemos pasado desde que la conocí el primer año de carrera y por todo su cariño y su apoyo. Te quiero Amiga.

A mis padres, quiero darles las gracias por su sacrificio y su ayuda incondicional, gracias a ellos he llegado hasta aquí y ha sido posible escribir esta tesis. Han cuidado de mis hijos a diario y siempre han estado ahí para escucharme y ayudarme en todos los sentidos. Papá y mamá gracias, os quiero.

A Vicente, aunque siempre le decía que no lo iba a poner en los agradecimientos, pero también me ha soportado y apoyado en todo momento. Sin él, los pilares de nuestra familia no se sostendrían. Te quiero, gracias.

A mis hijos, José y Virginia por ser el motor que me ha empujado a seguir. Ahora sí que voy a poder disfrutar plenamente de ellos.

A mi hermana Julia, porque siempre me ha apoyado, escuchado y por supuesto, ha estado ahí cuando la he necesitado.

A mi cuñada María Dolores, que siempre ha soportado mis largos audios de WhatsApp hablándole de mis planes de tesis, entre otras cosas, y siempre me ha animado a seguir hacia adelante.

Por último, quiero agradecer a mis suegros por haber cuidado de mis niños mientras yo estaba trabajando.

RESUMEN

La gestión integrada de plagas (GIP) está basada en el desarrollo de una estrategia dirigida al uso racional de los productos fitosanitarios, mediante la puesta en marcha conjunta de una serie de medidas orientadas a la producción de cultivos saludables con bajo impacto en los agroecosistemas, y la utilización de métodos biológicos para el control de plagas. Los programas de GIP basados en el control biológico se han puesto en práctica con éxito en muchos cultivos hortícolas de invernadero para controlar las plagas. Generalmente, se utiliza el control biológico aumentativo, que se dirige a plagas clave como la mosca blanca y los trips, ya que sus poblaciones son más estables y los agentes de control biológico (ACB) pueden mantener su población durante toda la temporada de cultivo.

Aunque las principales plagas generalmente se controlan por medios no químicos, incluido el control biológico, en ocasiones pueden volverse incontrolables y los ACB no ser suficientes. También pueden aparecer en los cultivos plagas secundarias que no pueden ser controladas mediante métodos biológicos. En estos casos sería necesario utilizar algún tipo de compuesto sintético o natural y preferentemente selectivo hacia los ACB para equilibrar el complejo de plagas y que no surgieran problemas de compatibilidad. La cuestión es que estos compuestos no siempre funcionan o no hay disponibilidad de ellos, por lo que se interrumpe la estrategia de biocontrol.

Orius laevigatus (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) es un depredador polífago, pero se utiliza principalmente como ACB de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) en los cultivos de invernadero. Como la mayoría de los enemigos naturales, es muy susceptible a los insecticidas. Por tanto, es importante una integración efectiva entre este enemigo natural y los insecticidas para evitar incompatibilidades. Así pues, en esta tesis se ha realizado una mejora genética de *O. laevigatus* en la tolerancia a algunos insecticidas que se utilizan habitualmente en los cultivos. Los insecticidas que se han estudiado son: los neonicotinoides tiametoxam e imidacloprid, el piretroide lambda-cihalotrín y el spinosad.

No se puede generalizar sobre el efecto que tiene un insecticida basándose únicamente en analizar a una sola población, ya que el resultado puede ser impreciso y es muy probable la existencia de una variación intraespecífica. A causa de esto, en esta tesis se han hecho estudios más profundos para determinar la tolerancia en varias poblaciones silvestres de *O. laevigatus* hacia los distintos insecticidas estudiados.

Los neonicotinoides son insecticidas que se usan sobre todo en aplicaciones puntuales cuando aparece una plaga secundaria en el cultivo y que carece de enemigos naturales para su control. Por lo que es interesante obtener una población de *O. laevigatus* resistente a estos plaguicidas a la que no le afecten esas aplicaciones. Para empezar, investigamos la variabilidad de la toxicidad a tiametoxam e imidacloprid en diferentes poblaciones silvestres de *O. laevigatus* de la cuenca mediterránea y en 4 poblaciones comerciales. Posteriormente, se seleccionó artificialmente una población de *O. laevigatus* resistente a cada uno de los neonicotinoides.

Los piretroides como el lambda-cihalotrin, son compuestos sintéticos que también se utilizan para controlar varias plagas secundarias en cultivos de hortalizas, y también son tóxicos para los insectos beneficiosos. Para los cultivos ecológicos se utilizan también las piretrinas naturales, que se ha demostrado en algunos estudios que igualmente son tóxicas para los ACB. En relación con lo anterior se pensó en obtener una población de *O. laevigatus* resistente a piretroides para que pueda sobrevivir en el cultivo cuando se apliquen éstos. Para ello, se estudió en primer lugar, la variabilidad intraespecífica en la susceptibilidad a los piretroides en distintas poblaciones silvestres y 4 comerciales de *O. laevigatus*. En segundo lugar, se seleccionó una población resistente a piretroides y de esta población se estudió: la resistencia en los diferentes estadios, la resistencia cruzada con otros compuestos, y los mecanismos de detoxificación.

El spinosad se considera de bajo riesgo para la mayoría de los enemigos naturales y está autorizado para su uso en GIP. No obstante, existe controversia en algunos estudios sobre su selectividad hacia las especies de *Orius*, que se ha atribuido a variaciones en diferentes aspectos de la metodología de bioensayo o a la variación en la susceptibilidad de las poblaciones ensayadas a los insecticidas. Así pues, se investigó igualmente la variación intraespecífica en la susceptibilidad a este insecticida en las poblaciones silvestres y comerciales de *O. laevigatus*. Posteriormente, se obtuvo una población

resistente a spinosad, de la que se estudió la estabilidad, los niveles de resistencia en los diferentes estadios, la resistencia cruzada con otros insecticidas y los mecanismos de detoxificación. En el último capítulo se estudia la respuesta funcional de la población resistente a spinosad sobre ninfas de *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) y larvas de *F. occidentalis*.

Nuestros resultados han establecido que existe una variación genética en la susceptibilidad a todos los insecticidas ensayados en poblaciones silvestres y comerciales de *O. laevigatus*, y que tal variación puede explotarse con éxito para seleccionar poblaciones con mayor resistencia a los insecticidas.

Por consiguiente, se consiguieron poblaciones resistentes a los neonicotinoides tiametoxam e imidacloprid ($CL_{50} = 149,2$ y $309,9$ mg L⁻¹, respectivamente), lambda-cihalotrín ($CL_{50} = 331,7$ mg L⁻¹) y spinosad ($CL_{50} = 2110,0$ mg L⁻¹). Nuestras poblaciones resistentes podrían dar lugar a una adopción más amplia del control biológico al permitir aplicaciones puntuales de estos insecticidas para controlar las plagas principales y secundarias, sin perturbar la acción beneficiosa de *O. laevigatus*. Así pues, por ejemplo, la población resistente a lambda-cihalotrín permitiría la aplicación de piretroides y piretrinas naturales para el control de plagas, tanto en cultivos ecológicos como en los que se aplica la GIP.

Además, se demostró que la población resistente al spinosad posee también resistencia cruzada con spinetoram, que la resistencia conseguida persiste en el tiempo y que es suficiente para permitir la supervivencia de adultos y ninfas de *O. laevigatus* durante toda la temporada de cultivo. También se comprobó que esta población, además de ser resistente a spinosad, no pierde la capacidad de depredación y muestra una respuesta funcional hacia las larvas de trips mejor que el control.

Por consiguiente, los resultados del presente trabajo han demostrado que la GIP, basada en el empleo de ACB pueden verse muy reforzada mediante la incorporación de nuestras poblaciones resistentes a insecticidas.

ABSTRACT

Integrated pest management (IPM) is based on the development of a strategy directed towards the rational use of phytosanitary products, through the joint implementation of a series of measures oriented to the production of healthy crops with low impact on agroecosystems, and the use of biological methods for pest control. IPM programs based on biological control have been successfully implemented in many horticultural greenhouse crops to control pests. Generally, augmentative biological control is used, which targets key pests such as whiteflies and thrips, as their populations are more stable and biological control agents (BCAs) can maintain their populations throughout the growing season.

Although the main pests are generally controlled by non-chemical means, including biological control, they can sometimes become uncontrollable, and BCAs may not be sufficient. Secondary pests that cannot be controlled by biological methods may also appear in crops. In these cases, it would be necessary to use synthetic or natural compounds, preferably selective towards BCAs, to balance the pest complex and avoid compatibility problems. The problem is that these compounds do not always work or are not always available, thus disrupting the biocontrol strategy.

Orius laevigatus (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) is a polyphagous predator but, is mainly used as a BCA of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) in greenhouse crops. Like most natural enemies, it is very susceptible to insecticides. Therefore, an effective integration between this natural enemy and insecticides is important to avoid incompatibilities. Thus, in this thesis, a genetic improvement of *O. laevigatus* in tolerance to some insecticides commonly used in crops has been carried out. The insecticides studied are: the neonicotinoids thiamethoxam and imidacloprid, the pyrethroid lambda-cyhalothrin and spinosad.

It is not possible to generalize about the effect of an insecticide based only on the analysis of a single population, because the result may be imprecise and the existence of intraspecific variation is very likely. Because of this, in this thesis, more in-depth

studies have been carried out to determine the tolerance in various wild populations of *O. laevigatus* to the different insecticides studied.

Neonicotinoids are insecticides used mainly in specific applications when a secondary pest appears in the crop and lacks natural enemies for its control. Therefore, it is interesting to obtain a population of *O. laevigatus* resistant to these pesticides that is not affected by these applications. First of all, we investigated the variability of toxicity to thiamethoxam and imidacloprid in different wild Mediterranean populations of *O. laevigatus* and 4 commercial populations. Subsequently, a population of *O. laevigatus* resistant to each of the neonicotinoids was artificially selected.

Pyrethroids, such as lambda-cyhalothrin, are synthetic compounds that are also used to control several secondary pests in vegetable crops, and are also toxic to beneficial insects. For organic crops, natural pyrethrins are also used, which have been shown in some studies to be equally toxic to BCAs. In relation to the above, the idea was to obtain a pyrethroid-resistant population of *O. laevigatus* in order that it can survive in the crop when pyrethroids are applied. For this purpose, first, intraspecific variability in susceptibility to pyrethroids was studied in different wild and commercial populations of *O. laevigatus*. Secondly, a pyrethroid resistant population was selected and from this population we studied: resistance at different stages, cross-resistance with other compounds, and detoxification mechanisms.

Spinosad is considered a low risk pesticide for most natural enemies and is approved for use in IPM. However, there is controversy in some studies about its selectivity towards *Orius* species, which has been attributed to variations in different aspects of the bioassay methodology or variation in the susceptibility of the tested populations to the insecticides. For this purpose, intraspecific variation in susceptibility to this insecticide in wild and commercial populations of *O. laevigatus* was also investigated. Subsequently, a spinosad-resistant population was obtained. Resistance levels in the different stages, cross-resistance with other insecticides and detoxification mechanisms were studied from the resistant population. In the last chapter, the functional response of the spinosad-resistant population on *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) nymphs and *F. occidentalis* larvae was studied.

Our results have established that there is genetic variation in susceptibility to all insecticides tested in wild and commercial populations of *O. laevigatus*, and this variation can be exploited to select populations with increased insecticide resistance.

In addition, resistant populations to the neonicotinoids thiamethoxam and imidacloprid (LC_{50} = 149.2 and 309.9 mg L⁻¹, respectively), lambda-cyhalothrin (LC_{50} = 331.7 mg L⁻¹) and spinosad (LC_{50} = 2110.0 mg L⁻¹) were obtained. Our resistant populations could improve biological control in IPM, allowing specific applications of these insecticides to control main and secondary pests, without disturbing the beneficial action of *O. laevigatus*. Thus, for example, the lambda-cyhalothrin resistant population would allow the application of natural pyrethroids and pyrethrins for pest control in organic and IPM crops.

In addition, it was shown that the spinosad-resistant population also has cross-resistance with spinetoram. The resistance persists over time, and it is sufficient for survival of *O. laevigatus* adults and nymphs during the growing season. It was also found that this population, in addition to being resistant to spinosad, does not lose predation capacity and shows a better functional response to thrips larvae than the control.

Therefore, the results of the present work have shown that IPM, based on the use of BCA, can be greatly enhanced by the incorporation of our insecticide-resistant populations.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 <i>Orius laevigatus</i>	1
1.1.1 Orden taxonómico.....	1
1.1.2 Hábitat y distribución geográfica en Europa	1
1.1.3 Morfología y biología	2
1.1.3.1 Ciclo biológico.....	2
1.1.3.2 Influencia de la temperatura en el desarrollo de <i>Orius laevigatus</i>	5
1.1.3.3 Influencia de la diapausa en el desarrollo de <i>Orius laevigatus</i>	6
1.1.3.4 Tipo de alimentación (zoofitofagia)	7
1.2 IMPORTANCIA DE <i>Orius laevigatus</i> EN EL CONTROL DE TRIPS.....	8
1.2.1 Comportamiento de ataque	9
1.2.2 Capacidad depredadora	9
1.2.3 Control efectivo en campo de <i>Frankliniella occidentalis</i>	10
1.3 PRODUCCIÓN INTEGRADA DE PRODUCTOS HORTÍCOLAS	11
1.3.1 Gestión integrada de plagas (GIP)	11
1.3.2 Importancia del control biológico dentro de la GIP	12
1.3.3 Control biológico de <i>Orius laevigatus</i> en pimiento.....	13
1.3.4 Productos fitosanitarios y GIP	16
1.4 COMPATIBILIDAD DE <i>Orius laevigatus</i> CON INSECTICIDAS	17
1.4.1 Estado del problema.....	17
1.4.2 Variación intraespecífica como mejora de la compatibilidad de <i>Orius laevigatus</i> con insecticidas	19
1.5 INSECTICIDAS	20

1.5.1 Resistencia a insecticidas	20
1.5.2 Tipos de resistencia a insecticidas.....	21
1.5.3 Modo de acción de los insecticidas	22
1.5.4 Clasificación de los insecticidas ensayados según su grupo químico y modo de acción	22
1.5.5 Mecanismos de resistencia a insecticidas en insectos	23
1.6 BIBLIOGRAFÍA.....	25
2. OBJETIVO GENERAL.....	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....	40
3.1 POBLACIONES DE <i>Orius laevigatus</i>	40
3.1.1 Poblaciones silvestres.....	40
3.1.2 Poblaciones comerciales	42
3.2 CRÍA Y MANTENIMIENTO DE POBLACIONES DE <i>Orius laevigatus</i>	42
3.3 INSECTICIDAS UTILIZADOS PARA LOS BIOENSAYOS	44
3.4 MÉTODOS DE BIOENSAYO DE INSECTICIDAS.....	45
3.4.1 Bioensayos de toxicidad	45
3.4.1.1 Preparación de las dosis	46
3.4.1.2 Montaje y lectura de los bioensayos.....	47
3.4.2. Bioensayos de selección	48
3.4.2.1 Preparación de las dosis	48
3.4.2.2 Montaje y lectura de los bioensayos.....	49
3.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS	50
3.5.1 Análisis <i>probit</i>	50
3.5.2 Mortalidad a la dosis de campo (MDC).....	50
3.5.3 Factor de resistencia (FR)	50

3.5.4 Clases de toxicidad	50
3.5.5 Mortalidad en las selecciones	51
3.6. BIBLIOGRAFÍA.....	51
4. VARIACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD Y SELECCIÓN PARA LA RESISTENCIA A IMIDACLOPRID Y TIAMETOXAM EN POBLACIONES MEDITERRÁNEAS DE <i>Orius laevigatus</i>.....	52
4.1 INTRODUCCIÓN.....	52
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
4.2.1 Insectos.....	54
4.2.2 Insecticidas	54
4.2.3 Bioensayos.....	54
4.2.4 Selecciones para conseguir una población resistente.....	54
4.2.5 Análisis de datos.....	55
4.3 RESULTADOS	55
4.3.1 Variación entre poblaciones.....	55
4.3.2 Selección para la resistencia.....	57
4.4 DISCUSIÓN.....	59
4.5 CONCLUSIONES	63
4.6 BIBLIOGRAFÍA.....	64
5. SELECCIÓN PARA LA RESISTENCIA A PIRETROIDES EN EL DEPREDADOR <i>Orius laevigatus</i>.....	68
5.1 INTRODUCCIÓN.....	68
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
5.2.1 Insectos.....	71
5.2.2 Insecticidas	71
5.2.3 Variación entre poblaciones.....	72

5.2.4 Selección para resistencia	72
5.2.5 Caracterización de la resistencia.....	72
5.2.6 Análisis de datos.....	73
5.3 RESULTADOS	73
5.3.1 Variación entre poblaciones.....	73
5.3.2 Selección para la resistencia.....	75
5.3.3 Caracterización de la resistencia.....	75
5.4 DISCUSIÓN.....	77
5.4.1 Variación entre poblaciones.....	78
5.4.2 Selección de la resistencia	80
5.4.3 Resistencia cruzada	81
5.4.4 Efecto del insecticida en los estadios ninfales.....	81
5.5 CONCLUSIONES	82
5.6 BIBLIOGRAFÍA.....	83
6. MEJORA GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A SPINOSAD EN <i>Orius laevigatus</i>.....	88
6.1 INTRODUCCIÓN.....	88
6.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	90
6.2.1 Insectos.....	90
6.2.2 Insecticidas	90
6.2.3 Variación entre poblaciones.....	91
6.2.4 Selección de la resistencia	91
6.2.5 Caracterización de la resistencia.....	91
6.2.6 Análisis de los datos	92
6.3 RESULTADOS	92
6.3.1 Variación entre poblaciones.....	92

6.3.2 Selección para la resistencia	94
6.3.3 Caracterización de la resistencia	95
6.4 DISCUSIÓN.....	97
6.4.1 Selección para la resistencia	99
6.4.2 Caracterización de la resistencia	100
6.5 CONCLUSIONES	102
6.6 BIBLIOGRAFÍA	103
7. RESPUESTA FUNCIONAL DE LA POBLACIÓN RESISTENTE A SPINOSAD EN <i>Myzus persicae</i> Y <i>Frankliniella occidentalis</i>.....	109
7.1 INTRODUCCIÓN	109
7.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	110
7.2.1 Cría de insectos.....	110
7.2.2 Capacidad de depredación y respuesta funcional.....	111
7.2.3 Análisis estadístico.	111
7.3 RESULTADOS	113
7.3.1 Capacidad de depredación y respuesta funcional.....	113
7.4 DISCUSIÓN.....	117
7.5 CONCLUSIONES	119
7.6 BIBLIOGRAFÍA	120
8. CONCLUSIONES GENERALES.....	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Distribución de <i>Orius laevigatus</i> en Europa (fuente: Fauna Europaea 2020).	2
Figura 1.2. (a) Huevos de <i>Orius laevigatus</i> en judía y ninfas naciendo; (b) opérculos de <i>Orius laevigatus</i> al microscopio electrónico (fuente: Schuldiner-Harpazi <i>et al.</i> , 2012).....	3
Figura 1.3. Ciclo de <i>Orius</i> sp. (fuente: www.rionegro.com).....	3
Figura 1.4. Hembra adulta de <i>Orius laevigatus</i>	4
Figura 1.5. (a) Dimorfismo sexual en <i>Orius laevigatus</i> ; (b) parámero.....	5
Figura 1.6. Hembra de <i>Orius laevigatus</i> atacando a un trips	9
Figura 3.1. Material necesario para la recolección de <i>Orius laevigatus</i>	40
Figura 3.2. Los números corresponden a la localización en el mapa de las poblaciones silvestres de <i>Orius laevigatus</i> de la Tabla 3.1.....	42
Figura 3.3. Material necesario para la cría de <i>Orius laevigatus</i>	43
Figura 3.4. Botes de cría de una población de <i>Orius laevigatus</i>	44
Figura 3.5. Formato comercial de los insecticidas utilizados (de izquierda a derecha: Confidor®, Spintor®, Actara® y KarateZeon®).....	45
Figura 3.6. Distintas dosis de insecticidas en un agitador magnético.....	46
Figura 3.7. (a) Salsera correspondiente a una repetición de un ensayo sin cerrar, con el material necesario y los individuos; (b) repeticiones cerradas.....	47
Figura 3.8.(a) Aspirador entomológico; (b) tamizado y aspiración de individuos.....	48
Figura 3.9. (a y b) Bioensayos de insecticidas.....	48
Figura 3.10. Ejemplo de un ensayo de selección.....	49
Figura 7.1. Respuesta funcional de Agrobío (izquierda) y RSPI38 (derecha) de hembras de <i>Orius laevigatus</i> a diferentes densidades de presa. Los puntos de datos y las	

líneas sólidas ajustadas representan el número de presas muertas y las predicciones del modelo de Holling (1959), respectivamente.....116

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Taxonomía de <i>Orius laevigatus</i>	1
Tabla 3.1. Poblaciones silvestres de <i>Orius laevigatus</i>	41
Tabla 3.2. Insecticidas utilizados en los bioensayos de <i>Orius laevigatus</i>	45
Tabla 4.1. Datos de susceptibilidad a tiametoxam en poblaciones silvestres de <i>Orius laevigatus</i>	56
Tabla 4.2. Datos de susceptibilidad a imidacloprid en poblaciones silvestres de <i>Orius laevigatus</i>	58
Tabla 4.3. Datos de susceptibilidad a tiametoxam e imidacloprid de la población más sensible y la más resistente de <i>Orius laevigatus</i>	59
Tabla 5.1. Datos de susceptibilidad a lambda-cihalotrín en poblaciones de <i>Orius laevigatus</i>	74
Tabla 5.2. Datos de susceptibilidad en adultos y estadios ninfales de la población susceptible de referencia (Mezcla) y de las poblaciones seleccionadas RLCH18 y RLCH49 de <i>Orius laevigatus</i>	75
Tabla 5.3. Resistencia cruzada con diferentes insecticidas en la población susceptible de referencia (Mezcla) y la población seleccionada RLCH18 de <i>Orius laevigatus</i>	76
Tabla 5.4. Datos de susceptibilidad para lambda-cihalotrín solo y en mezcla con PBO en adultos de la población susceptible de referencia (Mezcla) y la población seleccionada RLCH18 de <i>Orius laevigatus</i>	77
Tabla 6.1. Susceptibilidad a spinosad en poblaciones silvestres y comerciales de <i>Orius laevigatus</i>	93
Tabla 6.2. Datos de susceptibilidad al spinosad en adultos y estadios ninfales de la población comercial y resistente (RSPI38).....	94
Tabla 6.3. Datos de susceptibilidad de la población resistente a spinosad (RSPI38) de <i>Orius laevigatus</i> tras varias generaciones sin aplicar el insecticida.....	95

Tabla 6.4. Resistencia cruzada con diferentes insecticidas en la población comercial (Agrobío) y la población seleccionada RSPI38 de <i>Orius laevigatus</i>	96
Tabla 6.5. Datos de susceptibilidad para spinosad con inhibidores de enzimas de detoxificación en adultos de la población seleccionada RSPI38 de <i>Orius laevigatus</i>	96
Tabla 7.1. Tamaño medio de las poblaciones de <i>Orius laevigatus</i> ensayadas.....	114
Tabla 7.2. Diferentes presas y densidades de presa consumidas por hembras adultas de <i>Orius laevigatus</i>	114
Tabla 7.3. Estimaciones de máxima verosimilitud de regresiones logísticas de la proporción de presas diferentes, atacadas por <i>Orius laevigatus</i> , en función de la densidad de presa.....	115
Tabla 7.4. Parámetros de la respuesta funcional (RF) de <i>Orius laevigatus</i>	117

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 *Orius laevigatus*

1.1.1 Orden taxonómico

El orden taxonómico en el que se encuentra *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) según la actualización de la base de datos de la Fauna Europaea (2020a) se describe en la Tabla 1.1:

Tabla 1.1. Taxonomía de *Orius laevigatus*.

Regnum	Animalia
Subregnum	Eumetazoa
Phyllum	Arthropoda
Subphyllum:	Hexapoda
Clase	Insecta
Orden	Hemiptera
Suborden	Heteroptera
Infraorden	Cimicomorpha
Superfamilia	Cimicoidea
Familia	Anthocoridae
Subfamilia	Anthocorinae
Tribu	Oriini
Género	<i>Orius</i> Wolff, 1811
Subgénero	<i>Orius</i> Wolff, 1811
Especie	<i>Orius laevigatus</i> (Fieber, 1860)

1.1.2 Hábitat y distribución geográfica en Europa

Según los datos de la Fauna Europaea (2020b), el área de distribución de *O. laevigatus* abarca toda la cuenca del Mediterráneo, islas de la Macaronesia, Francia, las islas

británicas y algunos países del centro de Europa (Figura 1.1). Ferragut y González Zamora (1994), ya citaron estos países europeos como puntos en los que se podía encontrar el depredador. En España se encuentra ampliamente repartido, siendo una de las especies más abundantes y frecuentes, asociada a una gran cantidad de especies de plantas (Lacasa y Llorens, 1998b). Ferragut y González Zamora (1994) llevaron a cabo un estudio sobre las especies de *Orius* peninsulares y su distribución en la Comunidad Valenciana, Murcia, Extremadura y Andalucía. Muestrearon distintos cultivos y algunas plantas silvestres y observaron que el 47% de los ejemplares encontrados fueron de *O. laevigatus*, siendo ésta la especie más abundante.

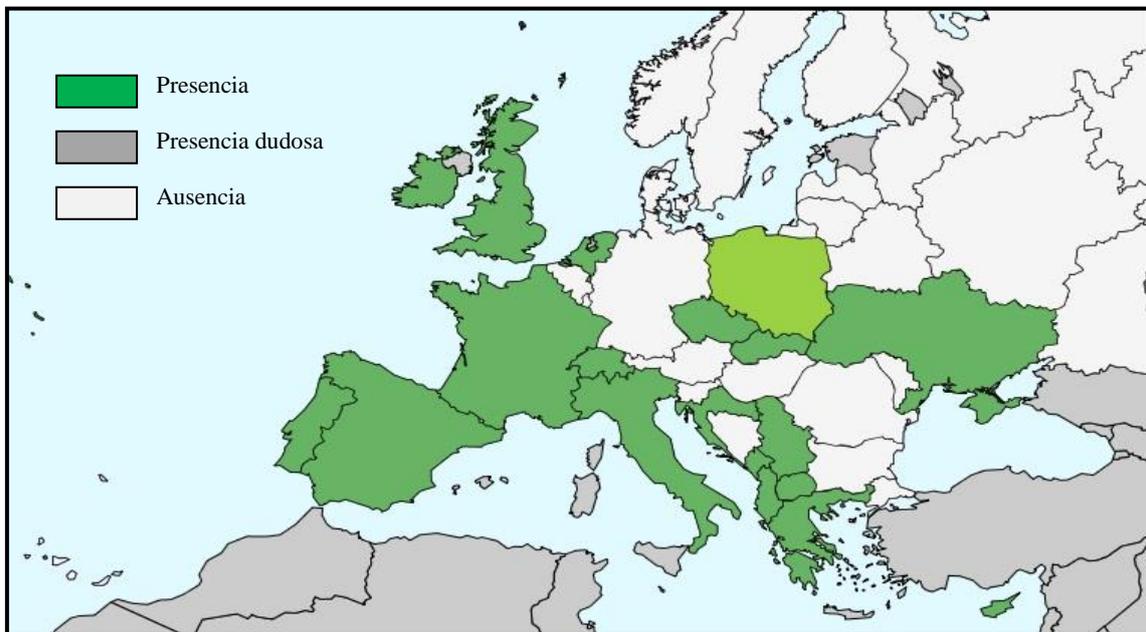


Figura 1.1. Distribución de *Orius laevigatus* en Europa (Fuente: Fauna Europaea 2020).

1.1.3 Morfología y biología

1.1.3.1 Ciclo biológico

Los antocóridos son hemimetábolos. *O. laevigatus* pasa por los siguientes estados de desarrollo: huevo, cinco estadios ninfales (N1-N5), y adulto.

Huevos: los huevos (Figura 1.2a) miden 0,3-0,4 mm de longitud y 0,13 mm de ancho, son transparentes inicialmente, tienen forma oval alargada y presentan un opérculo característico. Pueden ser puestos en grupos o en solitario. Conforme se acerca la eclosión se tornan de un color más amarillento, característico de la ninfa que se está

formando en su interior e incluso se aprecian los dos puntos rojos que corresponden a los ojos (Malais y Ravensberg, 2006; Hernando, 2009). Las hembras insertan los huevos en los tejidos blandos de la planta (tallos o peciolo tiernos o limbos carnosos o consistentes), de modo que sólo el opérculo sobresale y, por lo tanto, es visible y fácil de detectar, así que la forma del opérculo podría utilizarse para distinguir entre distintas especies de *Orius* (Figura 1.2b) (Schuldiner-Harpaz y Coll, 2012).

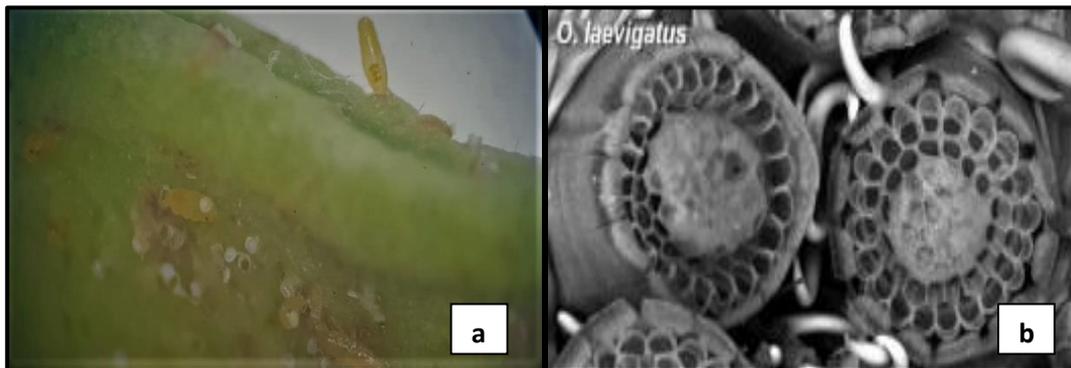


Figura 1.2. (a) Huevos de *Orius laevigatus* en judía y ninfas naciendo; (b) opérculos de *Orius laevigatus* al microscopio electrónico (Fuente: Schuldiner-Harpaz y coll, 2012).

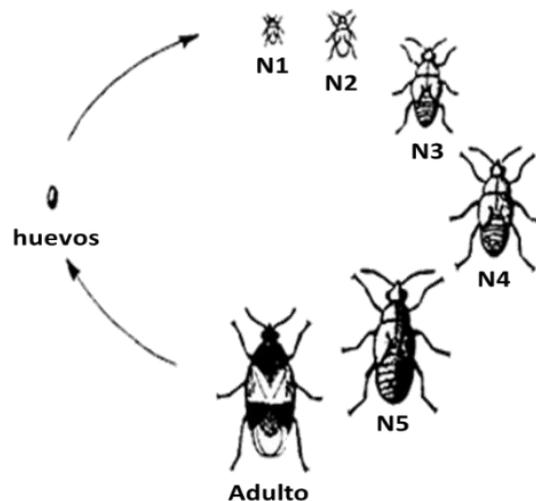


Figura 1.3. Ciclo de *Orius* sp. (Fuente: www.rionegro.com).

Ninfas: las ninfas pasan por 5 estadios (N1-N5) (Figura 1.3). Cuando emergen de los huevos son brillantes y casi sin color, pero se van tornando anaranjadas hasta llegar a una coloración castaña. Su longitud varía entre 0,7 mm (N1) y 2,1 mm (N5) (Lacasa y

Llorens, 1998b). No presentan hemiélitros, pero sí se observan con claridad los esbozos alares en el cuarto y quinto estadio (N4-N5), que se tornan más oscuros cuando la ninfa está a punto de mudar a adulto (Román, 2017). Los ojos son rojos, sobresalientes y fácilmente visibles en todos los estadios (Malais y Ravensberg, 2006).



Figura 1.4. Hembra adulta de *Orius laevigatus*.

Adultos: según el estudio de Ferragut y González Zamora (1994), los adultos de esta especie están dotados de una gran plasticidad en algunos de sus caracteres morfológicos externos, como el tamaño y la coloración (Figura 1.4). El tamaño varía de 1,4 a 2,4 mm de longitud y la coloración más común es la marrón oscura. Los ojos, de color rojo, se sitúan a ambos lados de la cabeza. Ésta y el pronoto presentan tegumentos brillantes y los hemiélitros son casi transparentes, exceptuando el cúneo que es muy oscuro. La parte membranosa de los hemiélitros caracteriza a esta especie (Figura 1.4), siendo la mitad basal de esta membrana transparente, mientras la mitad apical es oscura y la separación entre ambas zonas es rectilínea. La coloración de las antenas también es variable, presentando el primer segmento más oscuro y el último más rojizo. Las patas son amarillentas, pudiendo presentar el tercer par más oscuro que los precedentes. Posee una serie de quetas marginales en los últimos segmentos abdominales. El abdomen está formado por 9 segmentos y posee un dimorfismo sexual que permite distinguir a machos de hembras (Figura 1.5a). En las hembras es simétrico y termina en un ovipositor, mientras que en los machos es asimétrico y está desplazado hacia el lado

izquierdo, quedando dentro el parámero, que en *O. laevigatus* tiene dos flagelos de distinta longitud y carece de diente (Figura 1.5b).



Figura 1.5. (a) Dimorfismo sexual en *Orius laevigatus*; (b) parámero.

1.1.3.2 Influencia de la temperatura en el desarrollo de *Orius laevigatus*

En *O. laevigatus*, la temperatura afecta a la mayoría de su ecología reproductiva: los períodos de oviposición, la fecundidad, la duración de los tiempos de incubación del huevo y la tasa intrínseca de crecimiento de la población (Ambrose, 1999; Tommasini *et al.*, 2004; Baniameri *et al.*, 2005; Bahşi y Tunç, 2008). Para cada especie, hay un umbral distinto de temperatura alta y baja que influye en los procesos biológicos normales. Dentro de este rango de temperaturas, generalmente las temperaturas cálidas aceleran los procesos de maduración, como el período de pre-oviposición o los tiempos de incubación del huevo. También dentro de este rango, a menudo hay una temperatura óptima bajo la cual los procesos reproductivos funcionan mejor. Algunos estudios sobre cómo afecta la temperatura al tiempo de desarrollo y la vida útil de *O. laevigatus*, como el realizado por Alauzet *et al.* (1994), estudiaron a *O. laevigatus* a 15, 20, 25 y 30 °C, concluyendo que, a 30 °C, el desarrollo de *O. laevigatus* fue rápido, pero su vida útil fue corta y la fecundidad resultó ser más baja. Sin embargo, a temperaturas un poco más bajas (20, 25 °C), la especie mostró ser más eficiente. Para 18, 25 y 32 °C, Tavella *et al.* (1996) llegaron a las mismas conclusiones.

También existen umbrales térmicos específicos de esta especie que afectan a las tasas de desarrollo, actividad y temperatura críticas para la movilidad y el vuelo. En otros estudios, se mostró que a 15 °C el desarrollo embrionario de *O. laevigatus* requirió 11 días (Cocuzza *et al.*, 1997a). Estos datos están de acuerdo con los de Alauzet *et al.* (1994), quienes informaron que los huevos de *O. laevigatus* se desarrollan en 11,7 y 4,6 días a 15 y 25 °C, respectivamente, alimentados con huevos de *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidóptera: Pyralidae). Otro estudio realizado por Tommasini y Nicoli (1995) menciona un tiempo de desarrollo total de aproximadamente 2 días más que nuestro valor cuando *O. laevigatus* fue alimentado con *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) a 26 °C. Sánchez y Lacasa (2002), observaron resultados similares al estudiar *O. laevigatus* a 4 temperaturas (20, 25, 30 y 35 °C) y encontraron el umbral de desarrollo térmico inferior a 11,3 °C, mientras que el umbral reproductivo superior se estimó en 35,5 °C.

Estos resultados indican una clara influencia de la temperatura en la biología y la actividad de depredación de *O. laevigatus*. También indican que *O. laevigatus* está bien adaptado a bajas temperaturas. Este hallazgo sugiere que la introducción de este depredador en invernaderos fríos en el Mediterráneo puede realizarse en la primavera, cuando las temperaturas promedian los 15 °C. Una liberación temprana del depredador puede ser más efectiva para controlar las poblaciones de *F. occidentalis* durante la temporada de crecimiento. Por el contrario, la falta de adaptación a 35 °C puede reducir su presencia en cultivos protegidos durante el período más cálido.

1.1.3.3 Influencia de la diapausa en el desarrollo de *Orius laevigatus*

La diapausa tiene un fuerte efecto en la dinámica poblacional de los enemigos naturales y, por lo tanto, en la regulación de la abundancia de plagas objetivo en los cultivos dentro de los programas de agricultura integrada y de control biológico de plagas (Nylin, 2001). La diapausa en enemigos naturales se ha considerado generalmente negativa porque limita el establecimiento y crecimiento de la población, y por lo tanto su eficacia como agentes de control de plagas (Gillespie y Quiring, 1993; Musolin *et al.*, 2004; Bahsi y Tunç, 2008).

Una característica importante que diferencia a *O. laevigatus* de otras especies de *Orius* es la falta de diapausa típica de algunas cepas de este enemigo natural en el sur de

Europa, que se considera un rasgo biológico importante relacionado con su eficacia en el campo (Tommasini y Nicoli, 1996). Se ha observado que los machos y hembras de *O. laevigatus*, sobreviven al invierno en muchas zonas del sur de Europa, en contraste con otras especies de antocóridos de distintas partes del mundo de los que se ha estudiado su diapausa (Van den Meiracker, 1994; Ito y Nakata, 1998; Ruberson *et al.*, 2000; Shimizu y Kawasaki, 2001; Musolin *et al.*, 2004). Por ejemplo, en Italia se descubrió que las cepas de *O. laevigatus* del norte tienden a entrar en la diapausa reproductiva, mientras que las cepas del sur se pueden usar para el control de los trips en otoño e invierno. De este modo, las cepas de baja latitud podrían ser de gran valor para el control biológico en regiones de alta latitud (Van den Meiracker, 1994; Tommasini y Nicoli, 1996).

1.1.3.4 Tipo de alimentación (zoofitofagia)

O. laevigatus, tiene una alimentación zoofitófaga, ya que suplementa su nutrición alimentándose de las plantas. Por tanto, la alimentación sobre las plantas es común y ecológicamente relevante para estos insectos (Bouagga *et al.*, 2017). De hecho, se ha estudiado que pasa un 38% de su tiempo alimentándose sobre las plantas de pimiento (Bouagga *et al.*, 2017). Los depredadores zoofitófagos pueden utilizar recursos vegetales como el néctar y la savia de la planta, aumentando la supervivencia, pero generalmente solo el polen, nutricionalmente más rico, permite el desarrollo y la reproducción (Biondi *et al.*, 2016).

Además, para facilitar y apoyar el rendimiento de los depredadores, se pueden proporcionar alimentos suplementarios artificialmente (Van de kerkhove y De Clercq, 2010; Brenard *et al.*, 2019), especialmente en cultivos con baja cantidad o calidad de polen, como el pepino (Oveja *et al.*, 2016) o muchos ornamentales (rosas, crisantemos) (Leman y Messelink, 2015). Por ejemplo, el polen de *Thypha angustifolia* (L.) para apoyar a las poblaciones de ácaros fitoseidos (Messelink *et al.*, 2014) y *E. kuehniella* para *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae) y *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Heteroptera: Miridae) (Calvo *et al.*, 2012b; Brenard *et al.*, 2019). Esta estrategia de suplementar alimentos alternativos para promover las poblaciones de depredadores se usa cada vez más en cultivos protegidos (Leman y Messelink, 2015).

Sin embargo, muchos autores notaron una disminución sustancial en la aptitud reproductiva cuando se alimentan exclusivamente con estos alimentos alternativos

(Cocuzza *et al.*, 1997). Esta es una de las principales limitaciones para lograr un establecimiento a largo plazo en los cultivos, especialmente en aquellos con disponibilidad reducida de polen o bajo valor nutricional (Bielza *et al.*, 2020). Esta limitación se ha señalado recientemente como uno de los desafíos clave a los que se enfrenta el control biológico en los cultivos protegidos (Bielza *et al.*, 2020).

Por otra parte, *O. laevigatus*, tiene un comportamiento de "matanza excedente", es decir, es capaz de matar más presas de las que se puede comer. Este comportamiento se ha observado en varios artrópodos, incluidos los antocóridos (Meyling *et al.*, 2003; Helgadóttir *et al.*, 2017). Desde una perspectiva de control biológico, no tiene importancia si el agente de control biológico se come o simplemente mata la plaga, siempre que haya una reducción en la población de plagas.

Como herramienta de control biológico, la importancia del estado nutricional de la hembra es muy importante y queda bien ilustrada por estudios que examinan la aptitud relativa de las hembras alimentadas con diferentes tipos de alimentos, especialmente especies de presas. La duración del período previo a la oviposición, el total de huevos producidos y la tasa de eclosión se ven afectados por el tipo de alimento (Tomassini *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2006; Sengonça *et al.*, 2008). Algunos estudios de fecundidad realizados en hembras de *O. laevigatus* mostraron una fecundidad más alta al ser alimentados con huevos de *E. kuehniella* que con otros alimentos (Tawfik y Ata, 1973; Zaki, 1989).

1.2 IMPORTANCIA DE *Orius laevigatus* EN EL CONTROL DE TRIPS

O. laevigatus es un depredador polífago, enemigo natural de muchas plagas de insectos, pero principalmente ha sido usado para un control biológico aumentativo de trips (Chambers *et al.*, 1993; Lattin, 1999). Se utiliza principalmente en los invernaderos de pimiento, siendo el principal depredador de *F. occidentalis* y *Thrips tabaci* (Lindeman) (Thysanoptera: Thripidae), los cuales ocasionan en el cultivo daños directos e indirectos, como la transmisión del tospovirus *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) (Arnó *et al.*, 2008; Bosco *et al.*, 2008; Van der Blom, 2010).

1.2.1 Comportamiento de ataque

Cocuzza *et al.* (1997) realizaron observaciones en el laboratorio sobre el comportamiento de ataque de *O. laevigatus* hacia sus presas, y concluyeron que este enemigo natural no realiza una intensa actividad de búsqueda, sino que localiza a su presa de manera casual. También observaron que los depredadores percibían la presa solo a una distancia de 0,5-1 cm, se acercaban a ella y establecían un contacto inicial con sus estiletes. Después de esto, la capturaban con las patas delanteras y chupaban el contenido de su cuerpo con el estilete (Figura 1.6). El tiempo requerido para completar la alimentación, dependía del tamaño de los trips, y osciló entre 7 y 16 minutos. Estos investigadores vieron que el número de trips muertos aumentó con la edad del *Orius* y su actividad de búsqueda aumentó con la temperatura.



Figura 1.6. Hembra de *Orius laevigatus* atacando a un trips.

1.2.2 Capacidad depredadora

La capacidad depredadora de *O. laevigatus* ha sido estudiada a lo largo de los años por numerosos investigadores, obteniendo valores altos de depredación: autores como Riudavets *et al.* (1993) midieron la capacidad depredadora de *O. laevigatus* a 25 °C,

utilizando diferentes tipos de presas. Concluyeron que, a esta temperatura, las ninfas de *O. laevigatus* mataban 4 larvas de *F. occidentalis* por día. Tommasini y Nicoli (1993) investigaron también la actividad de depredación y encontraron que un adulto de *O. laevigatus* criado en laboratorio a 26 °C podría matar a un total de 96 adultos de *F. occidentalis*. Un año más tarde, estos mismos investigadores demostraron que *O. laevigatus* en el periodo de ninfa consumió un total de 42,6 adultos de *F. occidentalis* y que el primer y segundo estadio del antocórido podían llegar a matar a un promedio de 5,4 y 7,7 adultos de trips, respectivamente (Tommasini y Nicoli, 1994). Otro estudio realizado por Bonte y De Clercq (2010), observó que una hembra adulta de *O. laevigatus* fue capaz de matar 20 ninfas en segundo estadio de *F. occidentalis* en 24 horas, estos resultados coincidieron con otros mostrados por Riudavets y Castañé (1998) y Monserrat *et al.* (2000).

1.2.3 Control efectivo en campo de *Frankliniella occidentalis*

Chambers *et al.* (1993), descubrió que la suelta de un individuo de *O. laevigatus* por planta de pimiento podría garantizar el control de la población de trips. La mayoría de los autores coinciden que para un control efectivo de *F. occidentalis* dentro del invernadero, debe de soltarse 1 adulto/ m² de *O. laevigatus* (Tavella *et al.*, 1996; Tommasini y Maini, 2001; Bosco *et al.*, 2008). Otros estudios corroboran los resultados anteriores, pero insisten en que una segunda suelta, además del control de trips, garantizaría la instalación de *O. laevigatus* en el invernadero (Sánchez *et al.*, 1997; Weintraub *et al.*, 2011; Elinem *et al.*, 2018). Si aparece el depredador después de cada suelta, se confirma que se ha establecido bien la especie en el cultivo (Tommasini y Maini, 2001), por lo que es necesario planificar un calendario de sueltas y llevar un control de los trips y los *Orius* los días después de realizarlas para ver si el control es efectivo y si el enemigo natural es capaz de reproducirse y establecerse (Weintraub *et al.*, 2011). Según Hansen *et al.* (2003) y Ship *et al.* (1992), las muestras de trips y *Orius* deben cogerse en las flores, ya que es el lugar donde ambos se encuentran y resulta el método más fácil y fiable.

1.3 PRODUCCIÓN INTEGRADA DE PRODUCTOS HORTÍCOLAS

La producción integrada se puede definir como la obtención por parte de los agricultores de productos agrícolas de calidad y saludables para el consumidor, utilizando al máximo los recursos y los mecanismos de producción naturales que aseguran a largo plazo una agricultura sostenible, introduciendo en ella métodos biológicos y químicos de control, y otras técnicas que compatibilicen las exigencias de la sociedad, la rentabilidad del cultivo, la protección del medio ambiente y la productividad agrícola, así como las operaciones realizadas para la manipulación, envasado, transformación y etiquetado de productos vegetales acogidos al sistema. Estos objetivos pueden alcanzarse mediante las técnicas de manejo integrado (MAPA, 2020).

En España, actualmente se cumple el Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, por el que se estableció el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios, este documento fue dictaminado por la Unión Europea (UE) en 2012 y se va actualizando constantemente. El objetivo de este Real Decreto es establecer el marco de acción para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios, el fomento de la gestión de plagas y planteamientos o técnicas alternativas, tales como los métodos no químicos. También tiene como finalidad la aplicación y el desarrollo reglamentario de ciertas pautas relativas a la comercialización, la utilización y el uso racional y sostenible de los productos fitosanitarios, establecidos por la Ley 43/2002, de 20 de noviembre, de sanidad vegetal.

1.3.1 Gestión integrada de plagas (GIP)

La GIP, es una parte muy importante dentro de la producción integrada, siendo de obligado cumplimiento desde el 1 de enero de 2014 en toda la UE (Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre). Combina una variedad de métodos de control, entre los que se encuentran: el uso y la conservación de los enemigos naturales, la rotación de cultivos, los cultivos mixtos y el uso de variedades resistentes a las plagas. Los plaguicidas pueden seguir utilizándose de manera selectiva, pero en cantidades mucho menores (FAO 2020).

1.3.2 Importancia del control biológico dentro de la GIP

El uso del control biológico está considerado un pilar fundamental en cualquier programa de GIP (Zalom *et al.*, 2010). El término control biológico fue definido por primera vez por Smith (1919) como la acción de los enemigos naturales (depredadores, parasitoides y patógenos), necesaria para mantener la densidad de la población de plaga a unos niveles bajos, lo cual no sería posible si hubiera ausencia de los enemigos naturales. Años más tarde, otros autores lo definieron como el uso de organismos vivos o enemigos naturales para suprimir el impacto de una plaga específica, haciéndola menos abundante o dañina (Crump *et al.*, 1999). Una última definición más práctica dada por Jacas y Urbaneja (2008), sería el uso de un ser vivo con el fin de reducir la densidad de otro por debajo del umbral económico de daños. Es necesario un conocimiento de las plagas primarias y secundarias que aparecen en el cultivo y los enemigos naturales y organismos entomopatógenos asociados a las distintas plagas, con el fin de conservar la fauna útil que de manera espontánea aparece (Gabarra, 2005). Los agentes de control biológico (ACB) pueden ser depredadores, parasitoides y entomopatógenos (bacterias, virus, hongos y nematodos) (Urbaneja y Jacas, 2008). Existen factores importantes que influyen en la efectividad de estos agentes, tales como, su adaptabilidad, especificidad del hospedador, capacidad de devorar, su desarrollo sincronizado con la presa, su dispersión temporal y espacial en el cultivo, su capacidad de multiplicarse, su ciclo de vida corto y con múltiples generaciones, su capacidad de búsqueda, y la resistencia a patógenos y parásitos (Rao y Tanweer, 2011).

Los enfoques ecológicos y aplicados del control biológico pueden ser clasificados según los siguientes métodos:

- 1) Control biológico **clásico**: podría ser definido como la introducción intencionada de un agente de control biológico exótico para que se establezca permanentemente y controle a largo plazo las plagas (Coombs y Hall, 1998). Estas plagas suelen ser invasoras, por lo que hay que investigar a sus enemigos naturales en su lugar de origen e introducirlos si es posible (Naranjo *et al.*, 2015).
- 2) Control biológico **augmentativo**: este tipo es el que ahora mismo está en auge en los cultivos hortícolas protegidos. Consiste en la liberación de los enemigos naturales criados en masa para el control de las plagas y enfermedades (Van

Lenteren y Bueno, 2003). Para el complemento de este tipo de control biológico se pueden hacer cambios en el medio ambiente que pueden reducir los factores que afectan al crecimiento de los ACB, como usar bajas dosis de plaguicidas o proporcionar fuentes de recursos para incrementar las poblaciones (comidas alternativas como polen o néctar, presas alternativas, refugios, cubiertas en los cultivos, etc.) (Naranjo *et al.*, 2015). El control biológico aumentativo, se divide en:

- a. **Inoculativo:** se define como la suelta intencionada de un organismo vivo como ACB con las expectativas de que se multiplicará y controlará la plaga por un extenso periodo, pero no permanentemente (Crump *et al.*, 1999). La suelta inoculativa es planeada, por lo que el crecimiento de los ACB debe de mantenerse después de una suelta inicial y soportar una segunda o tercera generación, al menos hasta que se elimine el cultivo (a medio plazo) (Eilenberg *et al.*, 2001).
 - b. **Inundativo:** se define como el uso de organismos vivos intencionadamente, en un momento puntual, para controlar las plagas de manera inmediata y el control tiene que ser logrado exclusivamente por los organismos liberados en ese momento (Van Driesche y Bellows, 1995). El control biológico inundativo debe ser capaz de matar a un suficiente número de la población plaga o reducir los daños a niveles que no repercutan económicamente al cultivo antes de que se dispersen o inactiven los ACB. Sus descendientes ya no realizan el control de la plaga (Eilenberg *et al.*, 2001).
- 3) Control biológico conservativo:** consiste en la modificación de las prácticas culturales, el manejo y la conservación del hábitat para para proteger y aumentar la abundancia y eficiencia de las poblaciones de ACB (insectos y ácaros beneficiosos) y así reducir el efecto de las plagas (Van Driesche *et al.*, 2007).

1.3.3 Control biológico de *Orius laevigatus* en pimiento

En el apartado 1.3, ya se hizo referencia a *O. laevigatus* y su utilización como agente de control de trips en pimiento. A lo largo de los años se han realizado numerosos estudios

científicos que subrayan la importancia de este depredador como agente de control biológico en pimiento, ya sea en solitario o combinado con otros enemigos naturales.

Años atrás no había una estrategia clara de control biológico en pimiento hasta que Lacasa y Sánchez (2002) y Urbaneja *et al.* (2003) descubrieron que la introducción del ácaro depredador *Neoseiulus cucumeris* (Oudemans) (Acari: Phytoseiidae) al inicio del cultivo, junto con la liberación de *O. laevigatus* una vez que se iniciaba la floración, posibilitaban un control eficaz de los trips. Debido a esta estrategia, a que en años atrás *F. occidentalis* generó resistencias a multitud de agentes de control químico (Zhao *et al.*, 1995; Jensen, 2000; Espinosa *et al.*, 2002a; Bielza, 2008; Fernández *et al.*, 2009), a la disminución de las materias activas autorizadas por los gobiernos y la demanda creciente por parte de los mercados marcados por los consumidores de productos libres de residuos químicos, se realizó la implantación de programas de control biológico en cultivos de pimiento (Castañé, 2002; Van der Blom, 2002). Estos resultados fueron satisfactorios en invernaderos de pimiento, y no solo eso, sino que esta combinación resultó más limpia ya que se redujo considerablemente el uso de plaguicidas (Calvo *et al.*, 2012a).

Entre la Región de Murcia y Almería surgieron desigualdades al principio en cuanto a la aplicación de las técnicas de control biológico. En el campo de Cartagena se utilizaba ya en 2002 en un 60% de la superficie de pimiento y en Almería solo en un 5% en el año 2005 (Van der Blom, 2002, 2005). Esto era debido a que en el campo de Cartagena el ciclo de cultivo se inicia a finales de año y termina en verano. De este modo la densidad poblacional de las plagas al inicio es reducida, lo que unido a unas condiciones climáticas benignas (alta humedad relativa), favorecía el establecimiento de los enemigos naturales y el éxito del control biológico. En Almería, no se produjo una introducción masiva hasta el final de la campaña 2006-2007, ya que antes no había sido posible porque los ciclos de plantación del pimiento no eran los adecuados, ya que la época de trasplante se realizaba en julio y agosto, bajo una alta presión de plagas y unas condiciones ambientales extremas (altas temperaturas y bajas humedades relativas), por lo que a los enemigos naturales les costaba adaptarse (Van der Blom y Crisol, 2021). Sin embargo, en la actualidad hay en Almería 11000 ha de cultivo bajo invernadero en las que se aplica el control biológico (Van der Blom y Crisol, 2021).

El efecto que ha tenido el control biológico en pimiento, también se observa en la comercialización. Entre 2004 y 2007, se produjo una fuerte bajada en las exportaciones a Alemania, como consecuencia de intolerables concentraciones de residuos de plaguicidas (Van der Blom, 2008). A partir del 2008, cuando se produjo el cambio al control biológico, se observó una recuperación, seguida de un aumento considerable a partir de 2012 (Van der Blom y Crisol, 2021).

Después de la implementación del control biológico, que como se ha dicho anteriormente, es la base de la producción integrada, el sistema sigue evolucionando en muchos sentidos. No solo ha aumentado la oferta comercial y la diversidad de los ACB, sino que en los últimos años se ha producido un cambio de concepto, creándose importantes avances en algunos aspectos medioambientales, tales como, el incremento de la humedad dentro del invernadero para mejorar la reproducción de los ACB y la creación de plantas reservorio tanto fuera como dentro del invernadero. Estos avances suponen un camino hacia la sostenibilidad en el control de plagas (Van der Blom y Crisol, 2021).

La consejería de agricultura de la CARM (Comunidad Autónoma de la Región de Murcia), hace una serie de recomendaciones fitosanitarias importantes para las plantaciones de pimiento de invernadero entre las que se encuentra el control de los trips mediante *O. laevigatus*. Las instrucciones que se deben seguir actualmente según la CARM son las siguientes: el proceso de suelta de *O. laevigatus* actualmente en pimiento se realiza con las primeras flores y con temperaturas mínimas en la parcela, superiores a 10 °C. En un principio, se realizarán una o dos introducciones de *O. laevigatus*, a una dosis total de 1,5 a 3 individuos/m², dependiendo de las poblaciones de trips alcanzadas y del momento de la campaña en la que se inicien las sueltas. Las sueltas se localizarán, preferentemente, sobre las plantas con más flores abiertas para facilitar su instalación, pudiendo reforzarse un poco las bandas y zonas de mayor riesgo de introducción de la plaga. La presencia de ninfas de *Orius* a las dos o tres semanas de la primera introducción, indica que se está instalando bien. Los niveles de ocupación entre las 6 y 9 semanas después de realizar las primeras introducciones de *Orius* pueden llegar al 70% de las flores, con las típicas fluctuaciones. De producirse una pérdida acusada de flores en la plantación, puede ser conveniente realizar una suelta para compensar la

disminución de población del depredador que pueda producirse. En el caso de detectarse niveles de trips importantes antes de haber iniciado las sueltas (más de un 10-15% de flores u hojas con presencia), puede ser recomendable realizar una aplicación previa contra trips, con un fitosanitario que no interfiera excesivamente la posterior instalación de los insectos auxiliares. Los productos químicos que se pueden utilizar son: el spinosad “Spintor” (dejando un mínimo de 2 semanas hasta la introducción de *Orius*), aceite de parafina “Sunspray Ultrafine”, aceite de parafina “Agrofit” (incompatible con los tratamientos de azufre), azadiractina (varios productos comerciales, con una secuencia de 2-3 aplicaciones y cadencias de 4-6 días) o lufenurón “Match”, en este último caso, dejando un mínimo de 3-4 semanas hasta la introducción de *Orius*. Una vez instalados los *Orius* es fundamental conservarlos hasta el levantamiento de la plantación, evitando cualquier intervención fitosanitaria que pueda eliminar sus poblaciones. De lo contrario, podrían repuntar las poblaciones de cualquiera de las especies de trips que pueden afectar al pimiento, complicando la situación fitosanitaria de la plantación y del resto de parcelas de hortalizas de la zona a medio y largo plazo (CARM 2020).

1.3.4 Productos fitosanitarios y GIP

La Directiva 2009/128/EC pretende la consecución del uso sostenible de productos fitosanitarios reduciendo sus riesgos y efectos para la salud humana y el medioambiente, y la promoción de la GIP y los métodos y técnicas alternativas, como los medios de control no químicos.

La Directiva fue transpuesta al ordenamiento nacional a partir de los Reales Decretos 1702/2011 de inspecciones periódicas de los equipos de aplicación de productos fitosanitarios, y el Real Decreto 1311/2012 por el que, como ya se ha descrito anteriormente, se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios.

Además, se elaboró un Plan de Acción Nacional que englobaba todas las actuaciones realizadas para la consecución de los objetivos de la Directiva por los organismos competentes. Su periodo de vigencia finalizó el 31 de diciembre de 2017, por lo que fue necesaria su revisión y actualización

Se realizó un nuevo Plan de Acción Nacional 2018-2022 sobre el uso sostenible de los productos fitosanitarios que ha sido elaborado teniendo en consideración los resultados del anterior Plan 2013-17, los informes anuales y sus indicadores, las recomendaciones de la Comisión Europea y, por supuesto, los comentarios del sector. Fue aprobado por la Comisión Sectorial de Agricultura y Desarrollo Rural de 23 de noviembre de 2017 y sus objetivos generales son:

- 1- Fomentar la GIP, para preservar un sector agrícola, forestal y alimentario próspero, que asegure una contribución positiva al medio ambiente, mediante un modelo sostenible de producción compatible con la utilización racional de productos fitosanitarios.
- 2- Reducir los riesgos y efectos derivados de la utilización de productos fitosanitarios, especialmente en el ámbito de la salud humana y del medio ambiente.

1.4 COMPATIBILIDAD DE *Orius laevigatus* CON INSECTICIDAS

1.4.1 Estado del problema

A pesar de la efectividad del control biológico, en muchos cultivos protegidos aún se utilizan una amplia gama de químicos que presentan un gran problema de toxicidad para los artrópodos beneficiosos (Desneux *et al.*, 2007). Por supuesto, todo esto a largo plazo, afecta a la sostenibilidad agrícola (Wilson y Tisdell, 2001). Como ya se ha explicado anteriormente, una alternativa al uso indiscriminado de plaguicidas es la GIP, que reduce las plagas a niveles tolerables, utilizando métodos efectivos, ecológicamente sensatos y económicamente sostenibles (Van Lenteren y Woets, 1988).

Los insecticidas modernos son más selectivos y menos dañinos para los organismos beneficiosos, aun así, algunos de los insecticidas utilizados en GIP pueden ser no selectivos para ciertas especies de enemigos naturales (Medina *et al.*, 2008). Esto es debido a que todavía en algunos cultivos y áreas se siguen utilizando insecticidas de amplio espectro (Sayed *et al.*, 2010). Se han realizado algunos estudios de insecticidas y enemigos naturales que prueban la toxicidad antes de su uso conjunto en los programas de GIP y determinan un umbral de valores de mortalidad y los efectos subletales que los plaguicidas tienen en estos insectos (Hassan *et al.*, 1985). Sin

embargo, los plaguicidas no solo pueden afectar a los enemigos naturales a través de una intoxicación que les provoque la muerte, sino también por alteraciones en el comportamiento y la forma física (Desneux *et al.*, 2007). Los ACB deben ser capaces no solo de sobrevivir a la fumigación con insecticidas, sino también de realizar su actividad beneficiosa (depredadora o parasitismo) bajo la exposición a plaguicidas (Bielza, 2016).

En esta tesis se estudian algunos insecticidas (tiametoxam, imidacloprid, lambda-cihalotrín y spinosad), que están autorizados para el control de algunas plagas comunes en los cultivos pero que presentan una dudosa selectividad a *O. laevigatus*.

Los neonicotinoides son insecticidas que se utilizan en el control de plagas de hemípteros, coleópteros y lepidópteros (Nauen *et al.*, 2003). En 2013, la UE restringió el uso de los neonicotinoides en aplicación del principio de precaución, por sus presuntos efectos sobre las abejas. En febrero de 2018, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) confirmó el riesgo que ya se suponía que tenían estos compuestos para los insectos polinizadores y en abril de este mismo año, la UE decidió prohibir totalmente su uso al aire libre, pudiéndose utilizar únicamente en invernaderos permanentes, en algunos cultivos después de la floración y en algunos cereales de invierno (Ansedo, 2018). Varios autores, a lo largo de los años, han estudiado la toxicidad de los neonicotinoides en *O. laevigatus* y han observado que los adultos de este depredador son altamente susceptibles a imidacloprid (Delbeke *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2018). Van de Veire y Tirry (2003), también han visto su efecto en ninfas, concluyendo que son tóxicos para ellas, con un efecto persistente. En otro trabajo, Angeli *et al.* (2005) observaron que el imidacloprid era muy tóxico por contacto para ninfas, pero ligeramente tóxico por ingestión para adultos. La toxicidad hacia *O. laevigatus* del imidacloprid y el tiametoxam se muestra en el capítulo 4.

El lambda-cihalotrín es uno de los insecticidas piretroides más usados contra las plagas de lepidópteros y coleópteros (Ruberson y Tillman, 1999). Aparte de tener una alta toxicidad, causa cambios de comportamiento y efectos subletales en los enemigos naturales (Ferreira *et al.*, 2013). No existen publicaciones de ensayos de toxicidad sobre lambda-cihalotrín y *O. laevigatus*. En el capítulo 5 de este documento se hace un amplio estudio de este insecto depredador y el lambda-cihalotrín.

El spinosad es un insecticida que se puede utilizar en agricultura integrada, debido a que según Copping (2001), tiene alta efectividad sobre insectos plaga y baja toxicidad a ciertos enemigos naturales. Williams *et al.* (2003) hizo una revisión sobre la información disponible en cuanto al impacto del spinosad en los enemigos naturales y clasificó la respuesta a la mortalidad con spinosad usando la escala de la OILB (Organización Internacional de Lucha Biológica). Concluyó que, para los depredadores, spinosad representaba una de las opciones más recomendadas, pero no así para los parasitoides. Sin embargo, otros estudios previos muestran que tiene un efecto tóxico de moderado a alto en adultos de *O. laevigatus* (Van de Veire *et al.*, 2002; Bielza *et al.*, 2009; Biondi *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2018) y que también es tóxico para las ninfas (Van de Veire *et al.*, 2002; Van de Veire y Tirry, 2003). La toxicidad de spinosad hacia *O. laevigatus* se discutirá en el capítulo 6.

1.4.2 Variación intraespecífica como mejora de la compatibilidad de *Orius laevigatus* con insecticidas

Como puede verse en el apartado anterior, la mayoría de las publicaciones coinciden en que estos insecticidas son tóxicos para *O. laevigatus*. Por lo que, aunque la resistencia a los insecticidas en las plagas tiene graves consecuencias negativas, puede usarse como un rasgo positivo para los enemigos naturales. Se puede tomar como una oportunidad para mejorar el uso simultáneo de dos herramientas muy valiosas en el manejo de plagas: el control químico y biológico (Bielza, 2016), ya que el aspecto más difícil de la integración efectiva de los plaguicidas y los enemigos naturales es superar su incompatibilidad (Rodrigues *et al.*, 2013a). El problema surge cuando en sistemas bien establecidos y que funcionan favorablemente pueden producirse algunos cambios, como la aparición de una nueva plaga o enfermedad, o un cambio en la incidencia de una plaga secundaria, que podrían desestabilizar el sistema. En tales casos, los compuestos químicos que se utilizan tienen un impacto negativo hacia los enemigos naturales o no hay disponibilidad de ellos, por lo que se interrumpe la estrategia de biocontrol (Bielza, 2016).

Para ver la compatibilidad de los plaguicidas con los enemigos naturales, se han hecho estudios que prueban la toxicidad antes de su uso conjunto en los programas de GIP (Bielza, 2016). Lo que ocurre es que la mayoría de los estudios sobre la compatibilidad

de los enemigos naturales con insecticidas se centran en una sola población, generalmente una población comercial, sin tener en cuenta la variación natural en la susceptibilidad a los insecticidas entre las poblaciones, como ocurre en las especies de plagas (Guillén y Bielza, 2015; Grávalos *et al.*, 2015). Por lo tanto, no se puede generalizar sobre el beneficio de un insecticida basándose en la prueba de una o muy pocas poblaciones, ya que el resultado puede ser inexacto (Roush *et al.*, 1990). De esta manera, un compuesto podría clasificarse como no compatible con un determinado ACB, mientras que otras poblaciones de ese enemigo natural podrían ser tolerantes. Así pues, sería conveniente estudiar la variabilidad genética de la susceptibilidad a los insecticidas de un ACB, haciendo un estudio de diferentes poblaciones de este enemigo natural, ya que este estudio definiría la capacidad de respuesta que tiene a los cambios que se producen en su entorno (Aguilar-Fenollosa y Jacas, 2014).

La idea de la selección de enemigos naturales para la resistencia a los plaguicidas no es nueva (Hoy, 1986, 1990; Johnson y Tabashnik, 1993), pero ha tenido poca o ninguna implementación en el campo debido a varias razones. Una de las razones principales fue que los protocolos de biocontrol no estaban completamente desarrollados y estaban mal implementados entre los productores (Hoy, comunicación personal). Sin embargo, hoy en día las condiciones son apropiadas para un avance importante, con sistemas de GIP bien establecidos y, lo que es más importante, se tiene acceso a una infraestructura de suministro de agentes de control de alta calidad. Tener enemigos naturales más tolerantes a los insecticidas será clave para la perpetuación de los programas de GIP basados en el control biológico.

1.5 INSECTICIDAS

1.5.1 Resistencia a insecticidas

Según IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) (2020), la definición más precisa y práctica de cara a los agricultores y productores sobre la resistencia a insecticidas sería: “un cambio heredable en la sensibilidad de la población de una plaga que se refleja en repetidos fallos de un producto para alcanzar los niveles de control esperados al ser usado de acuerdo con las recomendaciones de la etiqueta para esa plaga”. A este estado

puede llegarse por el “uso abusivo” o “mal uso” de un insecticida o acaricida en el control de una plaga. Los individuos más resistentes se seleccionan y después de varias generaciones la población llega a ser resistente.

Crow (1960), determinó que la resistencia a plaguicidas es el cambio genético que se produce en respuesta a una selección. Años después, Leclant (1988), consideró que la resistencia viene determinada genéticamente y que se produce cuando en algunos individuos existe una menor sensibilidad a la sustancia tóxica. Scott (1995), consideraba la resistencia como una expresión fenotípica de un determinado rasgo existente en una población. Este rasgo lo presentaban algunos individuos, antes de la exposición al tóxico. El desarrollo de una menor susceptibilidad al tóxico dentro de la población era debido a una selección específica de estos individuos pre-adaptados, a menudo durante varias generaciones, por exposiciones a cantidades del tóxico que eran subletales para ellos, pero no para otros individuos de la población.

1.5.2 Tipos de resistencia a insecticidas

Existen varios tipos de resistencia a los insecticidas:

- **Resistencia cruzada positiva:** según Monge (1986), puede ser definida como “la resistencia que se genera en los insectos a un determinado plaguicida y a otros que no se han aplicado, pero que tienen forma de acción o de detoxificación similares”. Esto es debido a que se involucra el mismo mecanismo de resistencia para dos tipos de insecticidas diferentes, pero con el mismo modo de acción (Najera y Zaim, 2002).
- **Resistencia cruzada negativa:** se presenta cuando en una población que ha adquirido resistencia a un insecticida, se aplica otro insecticida toxicológicamente diferente y como consecuencia, esa población regresa a una susceptibilidad cercana a la original (Lagunes, 1980).
- **Resistencia múltiple o multiresistencia:** cuando una población resistente a un insecticida se hace resistente a otros insecticidas de diferente grupo químico o modo de acción. Por lo tanto, varios mecanismos de resistencia están actuando en el mismo insecto (Bisset, 2002).

1.5.3 Modo de acción de los insecticidas

Según IRAC (2020), la resistencia afecta negativamente al compuesto sobre el que se genera y confiere resistencia cruzada a otros compuestos químicamente relacionados. Esto es debido a que productos de un mismo grupo químico suelen afectar a un punto de acción común, por lo que se considera que comparten un mismo **modo de acción** (MdA). De este modo, hay un alto riesgo de que la resistencia en el punto de acción existente o desarrollada confiera automáticamente resistencia cruzada a todos los compuestos del mismo grupo.

El punto de acción primario puede estar situado en el sistema nervioso y muscular, crecimiento y desarrollo, respiración o aparato digestivo del insecto IRAC (2020).

1.5.4 Clasificación de los insecticidas ensayados según su grupo químico y modo de acción

Permanentemente se están incorporando nuevos agroquímicos al mercado, de diversos grupos químicos, lo cual hace sumamente compleja una clasificación completa basada en este criterio. IRAC (2020) hace una clasificación detallada de todos los grupos químicos, modos de acción y materias activas que se pueden utilizar en cada país. A continuación, se definen los modos de acción de los grupos químicos a los que pertenecen los insecticidas que se han ensayado en esta tesis:

- **Piretroides:** los piretroides actúan sobre la membrana nerviosa, ocasionando interferencias que provocan cambios conformacionales de las proteínas en la interfase lípido-proteína. Estas alteraciones originan un retardo en el cierre de los canales de Na⁺ después de ocurrido el impulso nervioso (Zerva, 1988). En este grupo se encuentra el lambda-cihalotrin. Según la clasificación de los modos de acción de IRAC, pertenece al grupo 3, moduladores del canal de sodio.
- **Neonicotinoides:** el modo de acción de los neonicotinoides es similar al de los insecticidas derivados de la nicotina, que actúa en el sistema nervioso central. Son agonistas del receptor nicotínico de la acetilcolina. Actúan por despolarización de la célula post-sináptica debido a la entrada de iones sodio y calcio. Activan el receptor nicotínico de la acetilcolina, pero lo hacen de manera persistente, ya que no son sensibles a la acción degradativa de la

acetilcolinesterasa (Sánchez, 2003). En este grupo se encuentran el imidacloprid y tiametoxam. Según la clasificación de los modos de acción de IRAC, pertenece al grupo 4, agonistas del receptor nicotínico de la acetilcolina.

- **Spinosines:** activan alostéricamente los receptores nicotínicos de la acetilcolina, provocando hiperexcitación del sistema nervioso. La acetilcolina es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central del insecto (IRAC, 2020). Según la clasificación de los modos de acción de IRAC, pertenece al grupo 5, activadores del receptor alostérico nicotínico de la acetilcolina.

1.5.5 Mecanismos de resistencia a insecticidas en insectos

Según Barberá (1989) los mecanismos por los que un organismo se vuelve resistente a un tóxico pueden ser de tipo genético y no genético.

- Uno de los **mecanismos genéticos** de resistencia, se produce por una mutación genética en una población debido al uso insistente del plaguicida, que durante cambios genéticos perpetuados darían lugar a individuos resistentes. También se puede dar el caso de que los individuos de una población presenten diversos grados de sensibilidad al plaguicida, y al verse sometidos a la presión selectiva (selección) de éste, la proporción de genes resistentes en la población aumente, originando nuevas generaciones resistentes. Si la presión del insecticida prosigue en nuevas generaciones, se originará una población resistente con tendencia a perpetuar este carácter por ser el más favorable a la conservación de la especie, habiendo así una evolución positiva hacia individuos resistentes. Este sería el mecanismo genético de selección y es el que se considera más importante.
- Los **mecanismos no genéticos** de resistencia se basan en comportamientos adquiridos por instinto contra el insecticida o en desarrollar sistemas de defensa, ya presentes en el insecto, contra el tóxico al ingerirlo.

Según Miller (1988), los mecanismos de resistencia a insecticidas se clasifican en 4 categorías: 1) resistencias por comportamiento, 2) resistencia a la penetración, 3) sitio insensible y 4) resistencia metabólica. Estos mecanismos se detallan a continuación:

1. **Resistencia por comportamiento:** en este caso, el insecto no entra en contacto con el depósito del insecticida. Según Bielza (2010) este mecanismo, en realidad

no se puede considerar una resistencia como tal porque consiste en un cambio en el comportamiento de los insectos. Éstos evitan entrar en contacto con el insecticida y sobreviven a diferencia de los susceptibles. Por tanto, esta resistencia es llamada pseudoresistencia debido a que, si los insectos resistentes tuvieran contacto directo con el insecticida en vez de esquivar el producto, morirían.

2. **Resistencia a la penetración o mecanismo físico:** la composición del exoesqueleto llega a ser modificada inhibiendo la penetración del insecticida. La velocidad de penetración depende de las características moleculares del insecticida y de las propiedades del tegumento del insecto, que varían considerablemente entre los estadios de vida y de una especie a otra.
3. **Sitio insensible (resistencia en el punto de acción):** es considerada la resistencia más importante, ya que le da al insecto un elevado nivel de resistencia y está referida al cambio en la estructura del punto de acción o al número de puntos donde el plaguicida causa toxicidad sobre el insecto. Los insecticidas actúan en un sitio específico del insecto, habitualmente en el sistema nervioso del insecto. Según explicó Bielza (2010), los insectos que poseen este tipo de resistencia tienen modificado el punto de acción, es un cambio genético que evita que la molécula del insecticida se acople y por tanto no se da ningún efecto del insecticida.

Existen tres puntos de acción principales donde actúan los insecticidas:

- La acetilcolinesterasa (AChE): es una enzima que cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina y tiene un papel importante en la terminación de impulsos nerviosos. La AChE es el principal punto de acción de organofosforados y carbamatos, que provocan la caída del sistema nervioso central y la muerte del insecto (Corbett, 1974).
- Los receptores GABA (ácido γ -aminobutírico): están localizados en los canales de los iones de cloro en la membrana nerviosa y controlan el flujo de iones a través ésta. Estos receptores son punto de unión de algunos tóxicos como la picrotoxina e insecticidas derivados del ciclodieno, los

cuales bloquean la acción fisiológica normal del GABA. (Ffrench-Constant *et al.*, 1993).

- Produciendo alteraciones en los canales de sodio (Na⁺): los canales de (Na⁺) dependientes del voltaje son el punto de acción del DDT y piretroides. La alteración del canal de sodio provoca insensibilidad nerviosa al insecto (Soderlund y Bloomquist, 1989).

4. **Resistencia metabólica:** la resistencia metabólica corresponde al mecanismo típico expresado por los insectos, rompiendo la estructura de los plaguicidas mediante el sistema enzimático pudiendo degradar un amplio espectro de plaguicidas. Es decir, las enzimas detoxificadoras son utilizadas para romper la invasión del plaguicida (toxina) en el cuerpo del insecto. El primer caso de resistencia metabólica citado correspondió al detectado en mosca doméstica con el uso de DDT (Wiesmann, 1947).

Existen tres sistemas enzimáticos principales responsables de la resistencia a insecticidas (Li *et al.*, 2007): las **P-450 monooxigenasas** que metabolizan la materia activa del insecticida mediante oxidaciones, las **esterasas** mediante hidrólisis y las **glutación S-transferasas** mediante conjugaciones.

Según Bielza (2010), la resistencia metabólica y la del punto de acción son las más importantes y la alternancia de insecticidas con diferentes modos de acción, pueden evitar el desarrollo de estos tipos de resistencias.

1.6 BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Fenollosa, E., Jacas, J.A., 2014. Can we forecast the effects of climate change on entomophagous biological control agents? *Pest Management Science* 70: 853-859.

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

Ambrose, D.P., 1999. *Assassin Bugs*. Science Publishers, Inc., New Hampshire.

- Angeli, G., Baldessari, M., Maines, R., Duso, C., 2005. Side-effects of pesticides on the predatory bug *Orius laevigatus* (Heteroptera: Anthocoridae) in the laboratory. *Biocontrol Science and Technology* 15: 745-754.
- Ansele, M., 2018. Una guerra entre mil plagas. El País. https://elpais.com/elpais/2018/04/27/ciencia/1524838796_849579.html
- Arnó, J., Roig, J., Riudavest, J., 2008. Evaluation of *Orius majusculus* and *Orius laevigatus* as predators of *Bemisia tabaci* and estimation of their preference. *Biological Control* 44: 1-6.
- Bahşi, S.U., Tunç, I., 2008. Development, survival and reproduction of *Orius niger* (Hemiptera:Anthocoridae) under different photoperiod and temperature regimes. *Biocontrol Science and Technology* 18: 767-778.
- Baniameri, V., Soleiman-Nejadian, E., Mohaghegh, J., 2005. Life table and age-dependent reproduction of the predatory bug *Orius niger* Wolff (Heteroptera: Anthocoridae) at three constant temperatures: a demographic analysis. *Applied Entomology and Zoology* 40: 545-550.
- Barberá, C., 1989. Plaguicidas agrícolas 4ª edición. Omega. Barcelona, pp. 603.
- Bielza, P., 2008. Insecticide resistance management strategies against the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Pest Management Science* 64: 1131-1138.
- Bielza, P., 2010. "La resistencia a insecticidas en Tuta absoluta (Meyrick)". *Phytoma* 217: 103-106.
- Bielza, P., 2016. Insecticide resistance in natural enemies. En: Horowitz, A.R., Ishaaya, I., (eds.). *Advances in Insect Control and Resistance*. Springer. Cham, Switzerland, pp. 313-339.
- Bielza, P., Balanza, V., Cifuentes, D., Mendoza, J.E., 2020. Challenges facing arthropod biological control: Identifying traits for genetic improvement of predators in protected crops. *Pest Management Science*. <https://doi.org/10.1002/ps.5857>

- Bielza, P., Fernández, E., Grávalos, C., Izquierdo, J., 2009. Testing for non-target effects of spiromesifen on *Eretmocerus mundus* and *Orius laevigatus* under greenhouse conditions. *BioControl* 54: 229-236.
- Biondi, A., Zappalà, L., Di Mauro, A., Garzia, G. T., Russo, A., Desneux, N., Siscaro, G., 2016. Can alternative host plant and prey affect phytophagy and biological control by the zoophytophagous mirid *Nesidiocoris tenuis*? *Biocontrol* 61: 79-90.
- Biondi, A., Desneux, N., Siscaro, G., Zappalà, L., 2012. Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator *Orius laevigatus*. *Chemosphere* 87(7): 803-812.
- Bisset, J., 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 54(3): 202-219.
- Bonte, M., De Clercq, P., 2010. Influence of diet on the predation rate of *Orius laevigatus* on *Frankliniella occidentalis*. *BioControl* 55: 625-629.
- Bosco, L., Giacometto, E., Tavella, L., 2008. Colonization and predation of thrips (Thysanoptera; Thripidae) by *Orius* spp. (Heteroptera; Anthocoridae) in sweet pepper greenhouses in Northwest Italy. *Biological Control* 44: 331-340.
- Bouagga, S., Urbaneja, A., Rambla, J., Granell, A., Pérez-Hedo, M., 2018. *Orius laevigatus* strengthens its role as a biological control agent by inducing plant defenses. *Journal of Pest Science* 91: 55-64.
- Brenard, N., Sluydts, V., Christianen, E., Bosmans, L., De Bruyn, L., Moerkens, R., Leirs, H., 2019. Biweekly supplementation with *Artemia* spp. cysts allows efficient population establishment by *Macrolophus pygmaeus* in sweet pepper. *Entomology Experimentalis et Applicata* 167: 406-414.
- Calvo, F.J., Bolckmans, K., Belda, J.E., 2012b. Release rate for a pre-plant application of *Nesidiocoris tenuis* for *Bemisia tabaci* control in tomato. *BioControl* 57: 809-817.
- Calvo, F.J., Bolckmans, K., Belda, J.E., 2012a. Release rate for a pre-plant application of *Nesidiocoris tenuis* for *Bemisia tabaci* control in tomato. *BioControl* 143(2): 111-119.

- CARM Comunidad Autónoma de la Region de Murcia, 2020. Agricultura. [http://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=488&IDTIPO=140&RASTRO=c80\\$m](http://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=488&IDTIPO=140&RASTRO=c80$m). Consultado en septiembre 2020.
- Castañe, C., 2002. Status of biological and integrated control in greenhouses vegetables in Spain: Successes and challenges. IOBC/WPRS Bulletin 25(1): 49 -52.
- Chambers, R.J., Long, S., 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 Technology 3: 295-307.
- Cocuzza, G.E., De Clercq, P., Lizzo, S., Van de Veire, M., Tirry, L., Degheele, D., Vacante, V., 1997a. Life tables and predation activity of *Orius laevigatus* and at three constant temperatures. Entomology Experimentalis et Applicata 85: 189–198.
- Cocuzza, G.E., De Clercq, P., Van de Veire, M., De Cock, A., Degheele, D., Vacante, V., 1997b. Reproduction of *Orius laevigatus* and *Orius albidipennis* on pollen and *Ephestia kuehniella* eggs. Entomologia Experimentalis et Applicata 82: 101–104.
- Coombs, J., Hall, K.E., 1998. Dictionary of Biological Control and Integrated Pest Management. CPL Press, Newbury, UK, pp. 196.
- Copping, L.G., 2001. The Biopesticide Manual. BCPC Pubs., Bracknell, UK.
- Corbett, J.R., 1974. The Biochemical mode of action of pesticides. Academic Press, London, UK, pp. 102-130
- Crow, J.F., 1960. Genetics of insecticide resistance: general considerations. Miscellaneous Publication of the Entomological Society of America 2: 69-74.
- Crump, N.S, Cothier, E.J, Ash, G.J., 1999. Clarifying the nomenclature in microbial weed control. Biocontrol Science and Technology. 9: 89-97.
- Delbeke, F., Vercruyssen, P., Tirry, L., De Clercq, P., Degheele, D., 1997. Toxicity of diflubenzuron, pyriproxyfen, imidacloprid and diafenthiuron to the predatory bug *Orius laevigatus* (Het.: Anthocoridae). Entomophaga 42: 349-358.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. Annual Review of Entomology 52: 81-106.

- Diario Rionegro, 2012. Pulgones para el desayuno. https://www.rionegro.com.ar/vaquitas-predadoras-XQRN_1027476/
- Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C., 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46: 387-400.
- Elimem, M., Harbi, A., Limem-Sellemi, E., Othmen, S.B., Chermiti, B., 2018. *Orius laevigatus* (Insecta; Heteroptera) local strain, a promising agent in biological control of *Frankliniella occidentalis* (Insecta; Thysanoptera) in protected pepper crops in Tunisia. *Euro-Mediterr Journal for Environmental Integration* 5: 3-6.
- Espinosa, P.J., Bielza, P., Contreras, J., Lacasa, A., 2002a. Insecticide resistance in field populations of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) in Murcia (south-east Spain). *Pest Management Science* 58: 967-971.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), 2020. Manejo integrado de plagas. www.fao.org/farmer-field-schools/ffs.../manejo-integrado-de-plagas/es/. Consultado en septiembre 2020.
- Fauna Europaea 2020a. Sistemática de *Orius laevigatus*. https://fauna-eu.org/cdm_dataportal/taxon/ec28a756-2fb4-448a-8bbd-7f3627709263. Consultado en septiembre 2020.
- Fauna Europaea 2020b. Distribución geográfica de *O. laevigatus* en Europa. https://fauna-eu.org/cdm_dataportal/taxon/ec28a756-2fb4-448a-8bbd-7f3627709263. Consultado en septiembre 2020.
- Fernández, E., Gravalos, C., Haro, P.J., Cifuentes, D., Bielza, P., 2009. Insecticide resistance status of *Bemisia tabaci* Q-biotype in south-eastern Spain. *Pest Management Science* 65: 885-891.
- Ferragut, F., González, J.E., 1994. Diagnóstico y distribución de las especies de *Orius* Wolf 1811, peninsulares (Heteróptera: Anthocoridae). *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* 20: 89-101.
- Ferreira, E.S., Rodrigues, A.R.S., Silva-Torres, C.S.A., Torres, J.B., 2013. Life-history costs associated with resistance to lambda-cyhalotrin in the predatory ladybird beetle *Eriopis connexa*. *Agricultural and Forest Entomology* 15: 168-177.

- Ffrench-Constant, R.H., Rocheleau, J.C., Steichen, T.A., Chalmers, A.E., 1993. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* 363: 449-451.
- Gabarra, R., 2005. Control biológico de plagas en cultivos hortícolas de invernadero. En: Jacas, J.A., y Urbaneja, A., (eds.). *El control biológico de plagas y enfermedades*. Phytoma-España, Valencia, pp. 410-422.
- Gillespie, D., Quiring, D.M.J., 1993. Extending seasonal limits on biological control. *IOBC/WPRS Bull* 16: 43-45.
- Gravalos, C., Fernandez, E., Belando, A., Moreno, I., Ros, C., Bielza, P., 2015. Cross-resistance and baseline susceptibility of Mediterranean strains of *Bemisia tabaci* to cyantraniliprole. *Pest Management Science* 71: 1030-1036.
- Guillen, J., Bielza, P., 2015. Cyantraniliprole: a valuable tool for *Frankliniella occidentalis* (Pergande) management. *Pest Management Science* 71: 1068–1074.
- Hansen, E.A., Funderburk, J.E., Reitz, S.R., Ramachandran, S., Eger, J.E., Mcauslane, H., 2003. Within-plant distribution of *Frankliniella* species (Thysanoptera: Thripidae) and *Orius insidiosus* (Heteroptera: Anthocoridae) in field pepper. *Environmental Entomology*. 32: 1035-1044.
- Hassan, S.A., Bigler, F., Blaisinger, P., Bogenschütz, H., Brun, J., Chiverton, P., *et al.*, 1985. Standard methods to test the side-effects of pesticides on natural enemies of insects and mites developed by the IOBC/WPRS Working Group ‘Pesticides and Beneficial Organisms’. *EPPO Bulletin* 15: 214-255.
- Helgadóttir, F., Toft, S., Sigsgaard, L., 2017. Negative effects of low developmental temperatures on aphid predation by *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae). *Biological Control* 114: 59–64.
- Hernando, S.M., 2009. Supervivencia del chinche depredador *Anthocoris nemoralis* (Fabricius) (Heteróptera: Anthocoridae) tras tratamientos con caolin y dos formulados de cobre utilizados en olivar. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España, pp.175.

- Hoy, M.A., 1986. Use of genetic improvement in biological control. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 15: 109-119.
- Hoy, M.A., 1990. Pesticide resistance in arthropod natural enemies: variability and selection responses. En: Roush, R.T., Tabashnik, B.E., (eds.). *Pesticide Resistance in Arthropods*. Chapman and Hall. NewYork, USA, pp. 203-236.
- IRAC (Insecticide Resistance Action Committee), 2020. Clasificación IRAC. <https://irac-online.org/modes-of-action/>. Consultado en septiembre 2020.
- Ito, K., Nakata, T., 1998. Diapause and survival in winter in two species of predatory bugs, *Orius sauteri* and *O. minutus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 89: 271-276.
- Jacas, J.A., Urbaneja, A., 2008. Origen de las plagas e historia del control biológico. En: Jacas, J.A., Urbaneja, A., (eds.). *Control biológico de plagas agrícolas*. Phytoma-España, Valencia, pp. 3-14.
- Jensen, S.E., 2000. Insecticide resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Integrated Pest Management Reviews* 5: 131-146.
- Johnson, M.W., Tabashnik, B.E., 1993. Laboratory selection for pesticide resistance in natural enemies. En: Narang, S.K., Bartlett, A.C., Faust, R.M., (eds.). *Applications of Genetics to Arthropods of Biological Control Significance*. CRC Press, BocaRaton. FL, USA, pp. 91-106.
- Kim, Y., Ahn, H.G., Ha, P.J., Lim, U.T., Lee, J.H., 2018. Toxicities of 26 pesticides against 10 biological control species. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 21: 1–8.
- Lacasa, A., Sánchez, J.A., 2002. El estado actual del control integrado de los tisanópteros en cultivos de invernadero. La situación del pimiento. *Phytoma-España* 135: 101-105.
- Lacasa, A., Llorens, J.M., 1998b. Trips y su control biológico (II). Ed. Pisa ediciones, Alicante, pp. 311.
- Lagunés, T.A., 1980. Impacto of the use of mixtures and sequences of insecticides in the evolution of resistance in *Culex quinquefasciatus* Say (Díptera: Culicidae). Tesis doctoral. Departament of Entomology. University of California. Riverside, USA.

- Leclant, F., 1988. Resistencia a los insecticidas y acaricidas. Información Técnica Económica Agraria 77: 6-29.
- Leman, A., Messelink, G.J., 2015. Supplemental food that supports both predator and pest: a risk for biological control? *Experimental and Applied Acarology* 65:511-524.
- Li, X., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology* 52: 231-253.
- Malais, M.H., Ravensberg, W.J., 2006. Conocer y reconocer las plagas de cultivos protegidos y sus enemigos naturales. Koppert BV y Reed Business Information. Países Bajos, pp. 288.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), 2020. Agricultura. <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/default.aspx>. Consultado en septiembre 2020.
- Medina, P., Adán, A., Del estal, P., Budia, F., Viñuela, E., 2008. Integración del control biológico con otros métodos de control. En: Jacas, A., Urbaneja, A., (eds.). Control biológico de plagas agrícolas. Phytoma-España, Valencia, 469-476.
- Messelink, G.J., Bennison, J., Alomar, O., Ingegno, B.L., Tavella, L., Shipp, L., *et al.* 2014. Approaches to conserving natural enemy populations in greenhouse crops: current methods and future prospects. *BioControl* 59:377-393.
- Meyling, N.V., Enkegaard, A., Brødsgaard, H., 2003. Two *Anthocoris* bugs as predators of glasshouse aphids – voracity and prey preference. *Entomology Experimentalis et Applicata* 108: 59-70.
- Miller, T.A., 1988. Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticides. *Parasitology Today* 4: 8-12.
- Monge, L.A., 1986. Manejo Racional de Insecticidas. Resistencia y rotación. Editorial tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica, pp.74.
- Montserrat, M., Albajes, R., Castañe, C., 2000. Functional Response of Four Heteropteran Predators Preying on Greenhouse Whitefly (Homoptera:

- Aleyrodidae) and Western Flower Thrips (Thysanoptera: Thripidae). *Environmental Entomology* 29(5): 1075-1082.
- Musolin, D.L., Tsytsulina, K., Ito, K., 2004. Photoperiodic and temperature control of reproductive diapause induction in the predatory bug *Orius strigicollis* (Heteroptera: Anthocoridae) and its implications for biological control. *Biological Control* 31: 91-98.
- Najera, J.A., Zaim, M., 2002. Malaria vector control: decision making criteria and procedures for judicious use of insecticides. WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES), World Health Organization. Geneva.
- Naranjo, S.E., Ellsworth, P.C., Frisbold, G.B., 2015. Economic value of biological control in integrated pest management of managed plant systems. *Annual Review of Entomology* 60: 621-645.
- Nauen, R., Ebbinghaus-kintscher, U.L., Salgado, V., Kausmann, M., 2003. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pesticide Biochem. Physiology* 76(2): 55-69.
- Nylin, Sören., 2001. Life history perspectives on pest insects: What's the use? *Austral Ecology*. 26: 507-517.
- Oveja, M.F., Riudavets, J., Arnó, J., Gabarra, R., 2016. Does a supplemental food improve the effectiveness of predatory bugs on cucumber? *BioControl* 61: 47-56.
- Rao, P.N., Tanweer, A., 2011. Concepts and components of integrated pest management. En: Nagaraja, R.P., Dashavantha, R.V., Venkateswara, R.K., (eds.). *Pests and Pathogens: Management Strategies*. BS publications. India, pp.543.
- Riudavets, J., Castañé, C., 1998. Identification and Evaluation of Native Predators of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) in the Mediterranean. *Environmental Entomology* 27(1): 86-93.
- Riudavets, J., Gabarra, R., Castañé, C., 1993. *Frankliniella occidentalis* predation by native natural enemies. *International Organisation for Biological Control, West Palaearctic Regional Section Bulletin* 16(2): 137-140.

- Rodrigues, A.R.S., Ruberson, J.R., Torres, J.B., Siqueira, H.A., Scott, J.G., 2013a. Pyrethroid resistance and its inheritance in a field population of *Hippodamia convergens* (Guerin-Meneville) (Coleoptera: Coccinellidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 105: 135-143.
- Román, L.R., 2017. Contribuciones para la optimización del manejo de *Orius laevigatus* y *Anthocoris nemoralis* (Hemiptera: Anthocoridae) como agentes de control biológico de plagas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad de La Rioja. La Rioja, España, pp.151.
- Roush, R.T., Hoy, C.W., Ferro, D.N., Tingey, W.N., 1990. Insecticide resistance in the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): influence of crop rotation and insecticide use. *Journal of Economic Entomology* 83: 315–319.
- Ruberson, J., Jun Shen, Y., Timothy, J.K., 2000. Photoperiodic Sensitivity and Diapause in the Predator *Orius insidiosus* (Heteroptera: Anthocoridae). *Annals of the Entomological Society of America*. 93: 1123-1130.
- Ruberson, J.R., Tillman, P.G., 1999. Effect of selected insecticides on natural enemies in cotton: a laboratory study. *Proceeding of the Beltwide Cotton conference* 2: 1210-1213.
- Sánchez, H., 2003. Manejo de insecticidas en ambientes urbanos. En: Silva, G., R, Hepp., (eds.). *Bases para el manejo racional de insecticidas*. pp.310.
- Sánchez, J. A., Lacasa, A., 2002. Modelling population dynamics of *Orius laevigatus* and *O. albidipennis* (Hemiptera: Anthocoridae) to optimize their use as biological control agents of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Bulletin of Entomological Research* 92(1):77-88.
- Sayyed, A.H., Pathan, A.K., Faheem, U., 2010. Cross-resistance, genetics and stability of resistance to deltamethrin in a population of *Chrysoperla carnea* from Multan, Pakistan. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98: 325-332.
- Schuldiner–Harpaz, T., Coll, M., 2012. Identification of *Orius* (Heteroptera: Anthocoridae) Females Based on Egg Operculum Structure. *Journal of Economic Entomology* 105(5): 1520-1523.

- Scott, J.A., 1995. The molecular genetics of resistance: Resistance as response to stress. Florida Entomologist 78 (3): 399-414.
- Sengonca, C., Ahmadi, K., Blaeser, P., 2008. Biological characteristics of *Orius similis* Zheng (Heteroptera, Anthocoridae) by feeding on different aphid species as prey. Journal of Plant Diseases and Protection 115: 32–38.
- Shimizu, T., Kawasaki, K., 2001. Geographic variability in diapause response of Japanese *Orius* species. Entomology Experimentalis et Applicata. 98: 303-316.
- Shipp, J.L., Zariffa, N., Ferguson, G., 1992. Spatial patterns of and sampling methods for *Orius* spp. (Hemiptera, Anthocoridae) on greenhouse sweet-pepper. Canadian Entomologist 124: 887-894.
- Smith, H.S., 1919. On some phases of insect control by the biological method. Journal of Economic Entomology 12:288-292.
- Soderlund, D.M., Bloomquist, J.R., 1989. Neurotoxic action of pyrethroid insecticides. Annual Review of Entomology 34: 77-96.
- Tavella, L., Alma, A., Conti, A., Arzone, A., 1996. Evaluation of the effectiveness of *Orius* spp. in controlling *Frankliniella occidentalis*. Acta Horticulturae 431: 499-506.
- Tawfik, M.F.S., Ata, A.M., 1973. The life-history of *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae). Bulletin de la Société Entomologique d’Egypte 57: 145–151.
- Tommasini, M.G., Maini, S., 2001. Thrips control on protected sweet pepper crops: enhancement by means of *Orius laevigatus* releases. En: Marullo, R., Moud, L., (eds.). Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7th international symposium on Thysanoptera, pp. 249-255.
- Tommasini, M.G., Nicoli G., 1995. Evaluation of *Orius* spp. as biological control agents of thrips pest: initial experiments on the existence of diapause in *Orius laevigatus*. Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent. 60(3)a: 901-908.
- Tommasini, M.G., Nicoli, G., 1993. Adult activity of four *Orius* species reared on two preys. IOBC/WPRS Bull., 16(2): 181-184.
- Tommasini, M.G., Nicoli, G., 1994. Pre-imaginal activity of four *Orius* species reared on two preys. IOBC/WPRS Bull., 17(5): 237-241.

- Tommasini, M.G., Nicoli, G., 1996. Evaluation of *Orius* spp. as biological control agents of Thrips pest: further experiments on the existence of diapause in *Orius laevigatus*. IOBC/WPRS Bull., 19 (1): 183-186.
- Tommasini, M.G., Van Lenteren, J.C., Burgio, G., 2004. Biological traits and predation capacity of four *Orius* species on two prey species. Bulletin of Insectology 57: 79–93.
- Urbaneja, A., León, F.J., Giménez, A., Arán, E., Van der Blom, J., 2003. Interacción de *Neoseiulus* (*Amblyseius*) *cucumeris* Oudemans (Acari.: Phytoseiidae) en la instalación de *Orius laevigatus* Fieber (Hem.: Anthocoridae) en invernaderos de pimiento. Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas 29: 347-357.
- Van de kerckhove, B., De Clercq, P., 2010. Pollen as an alternative or supplementary food for the mirid predator *Macrolophus pygmaeus*. Biological Control 53: 238-242.
- Van de Veire, M., Klein, M., Tirry, L., 2002. Residual Activity of Abamectin and Spinosad Against the Predatory Bug *Orius laevigatus*. Phytoparasitica 30(5): 525-528.
- Van de Veire, M., Tirry, L., 2003. Side effects of pesticides on four species of beneficials used in IPM in glasshouse vegetable crops: “worst case” laboratory tests. Pesticides and Beneficial Organisms 26(5): 41-50.
- Van den Meiracker, R.A.F., 1994. Induction and termination of diapause in *Orius* predatory bugs. Entomology Experimentalis et Applicata 73: 127–137.
- Van der Blom, J., 2002. La introducción artificial de la fauna auxiliar en cultivos agrícolas. Boletín Sanidad Vegetal-Plagas 28: 109-120.
- Van der Blom, J., 2005. Control biológico en cultivos bajo abrigo. Horticultura 189: 10-17.
- Van der Blom, J., 2008. Control biológico de plagas en Almería. Revolución verde después de dos décadas. Phytoma 42-47.
- Van der Blom, J., 2010. Control biológico en horticultura en Almería: un cambio radical pero racional y rentable. Cuadernos de estudios agroalimentarios 45-60.
- Van der Blom, J., Crisol, E., 2021. Control biológico en pimiento: primer paso hacia la sostenibilidad fitosanitaria en horticultura bajo cubierta. Phytoma 327: 28-31.

- Van Driesche, R.G., Bellows, T.S., 1995. Biological Control. Chapman and Hall, New York, USA, pp. 539.
- Van Driesche, R.G., Hoddle, M.S., Center, T.D., 2007. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. Biological Control 1: 3-9.
- Van Lenteren, J.C., Woest, J., 1988. Biological and integrated pest control in greenhouses. Annual Review of Entomology 33:239-269.
- Van Lenteren, J.C., Bueno, V.H.P., 2003. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. BioControl 48:123-139.
- Weintraub, P.G., Pivonia, S., Steinberg, S., 2011. How many *Orius laevigatus* are need for effective western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, management in sweet pepper? Crop Protection 30(11): 1443-1448.
- Wiesmann, R., 1947. Untersuchungen über das physiologische Verhalten von *Musca domestica* L. verschiedener Provenienzen. Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft 20: 484-504.
- Williams, T., Valle, J., Viñuela, E., 2003. Is the Naturally Derived Insecticide Spinosad Compatible with Insect Natural Enemies? Biocontrol Science and Technology 13(5): 459-475.
- Wilson, C., Tisdell, C., 2001. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. Ecological Economics 39: 449-462.
- Xu, X., Borgemeister, C., Poehling, H.M., 2006. Interactions in the biological control of western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) and two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch by the predatory bug *Orius insidiosus* Say on beans. Biological Control 36: 57-64.
- Zaki, F.N., 1989. Rearing of two predators, *Orius albidipennis* (Reut.) and *Orius laevigatus* (Fieber) (Hem., Anthocoridae) on some insect larvae. Journal of Applied Entomology 107: 107-109.

Zalom, F.G., 2010. Pesticides use practised in Integrated Pest Magement. En: Krieger, R., (eds.). Haye's Handbook of Pesticide Toxicology. Academy press. Londres, 303-313.

Zerva, E., 1988. Insecticidal activity or pyrethroids in insect of medical importance. Parasit Today 4: 53-7.

Zhao, G., Liu, W., Brown, J.M., Knowles, C.O., 1995. Insecticide resistance in field and laboratory strains of western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). Journal of Economical Entomology 88(6): 1164-1170.

2. OBJETIVO GENERAL

En los últimos años, la gestión integrada de plagas (GIP) se ha impuesto en muchos cultivos, especialmente en cultivos hortícolas bajo invernadero. Este sistema está orientado a la producción de hortalizas saludables con bajo impacto en los agroecosistemas y la utilización de métodos biológicos para el control de plagas. Sin embargo, el control biológico no siempre es suficiente para controlar las poblaciones de plagas y en algunas ocasiones se requieren aplicaciones adicionales de insecticidas. En estos casos, para que haya una integración efectiva hay que superar el problema de incompatibilidad que surge entre los insecticidas y los enemigos naturales. Por lo tanto, la mejora genética de agentes de control biológico que muestren una mayor tolerancia a los plaguicidas es de gran interés en la práctica de la GIP y el biocontrol.

Así pues, el **objetivo general** de esta tesis es la mejora genética del enemigo natural *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) para conseguir poblaciones resistentes a diferentes insecticidas usados habitualmente en GIP: tiametoxam, imidacloprid, lambda-cihalotrín y spinosad. De esta forma, se mejoraría el control de plagas y se conseguiría una integración plena entre enemigos naturales e insecticidas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

3.1 POBLACIONES DE *Orius laevigatus*

3.1.1 Poblaciones silvestres

Para la realización de los bioensayos, se recolectaron entre 2012 y 2019 un total de 36 poblaciones silvestres de *Orius laevigatus* procedentes de distintos países mediterráneos. Estas poblaciones fueron recolectadas en su hábitat natural, lejos (> 10–100 km) de cultivos donde podrían haberse liberado poblaciones comerciales. En la Tabla 3.1 y la Figura 3.2, se detallan todas las poblaciones silvestres que se utilizaron para los bioensayos, y su localización en el mapa.

Los individuos de cada población fueron recolectados manualmente, agitando las plantas sobre una bandeja de cartón blanca y aspirándolos con un aspirador entomológico manual (Figura 3.1). Los individuos recolectados se echaron en un bote auxiliar que contenía alimento, agua, substrato de puesta (judía) y refugio. Posteriormente, se trasladaron al laboratorio para determinar su especie y reproducirlos. Desde que llegaron al laboratorio, en todas las poblaciones pasaron de 2-5 generaciones antes de que se realizaran los bioensayos.



Figura 3.1. Material necesario para la recolección de *Orius laevigatus*.

Tabla 3.1. Poblaciones silvestres de *Orius laevigatus*.

Origen	Población	Número ^a	Distancia (km) ^b	Fecha de muestreo	Especie de planta
España (Noroeste)	Portonovo	1	>100	Ago 2013	<i>Ulex</i> sp.
	Corrubedo	2	>100	Ago 2015	<i>Daphne gnidium</i>
	Moreira	3	>100	Ago 2013	<i>Daucus</i> sp.
	Catadoiro	4	>100	Ago 2015	<i>Daucus</i> sp.
España (Sureste)	Perín	5	>25	Oct 2012	<i>Thymelaea hirsuta</i>
	Cabo de Palos	6	>20	Oct 2012	<i>Thymelaea hirsuta</i>
	La Zenia	7	>10	May 2013	<i>Convolvulus</i> sp.
	Cabo de Gata	8	>10	Jun 2013	<i>Anthyllis cytisoides</i>
	Cuevas de Almanzora	9	>25	May 2013	Umbelliferae
	Hellín	10	>75	May 2013	<i>Chamaemelum</i> sp.
	Puerto de la Mora	11	>60	Nov 2015	Desconocido
	Cazorla	12	>100	Jul 2014	<i>Rubus</i> sp.
	Órgiva	13	>25	Oct 2018	<i>Thymelaea hirsuta</i>
España (Suroeste)	Islantilla	14	>10	Jun 2014	<i>Thymus carnosus</i>
	Carmona	15	>100	Ago 2013	<i>Mentha suaveolens</i>
España (Noreste)	Cabrils	16	>2		Desconocido
	Teruel	17	>100	Sep 2013	<i>Aster</i> sp.
	Logroño	18	>100	Oct 2014	Desconocido
España (Centro)	Méntrida	19	>100	Mar 2015	<i>Chenopodium</i> sp.
	Alcobendas	20	>100	May 2015	Umbelliferae
	Ruidera	21	>100	Jul 2013	<i>Rubus</i> sp.
España (Oeste)	Guadalupe	22	>100	Sep 2015	<i>Daphne gnidium</i>
	Arroyo de San Serván	23	>100	Sep 2015	<i>Daphne gnidium</i>
	Merida	24	>100	Oct 2014	<i>Daphne gnidium</i>
Italia (Sicilia)	Acate	25	>2	Jun 2013	Desconocido
	Cefalú	26	>100	May 2015	Compositae
	Palermo	27	>100	May 2015	<i>Daucus</i> sp.
Italia (Sur)	Policoro	28	>2	Jun 2013	Desconocido
	Nápoles	29	>60	Oct 2018	<i>Daucus silvestre</i>
	Capodichino	30	>60	Oct 2018	<i>Mentha suaveolens</i>
	Vesubio	31	>60	Oct 2018	Desconocido
Grecia (Creta)	Samaria	32	>60	May 2013	Labiatae
	Rethymno	33	>40	May 2013	Umbelliferae
	Chania	34	>80	May 2013	<i>Malva</i> sp.
Grecia	Atenas	35	>100	Abr 2019	Desconocido
Bélgica	Westerlo	36	<10	Oct 2017	Desconocido

^a número de cada población correspondiente a su localización en el mapa (Figura 1).

^b distancia al área más cercana de invernaderos donde pueden realizarse sueltas de *Orius laevigatus*.

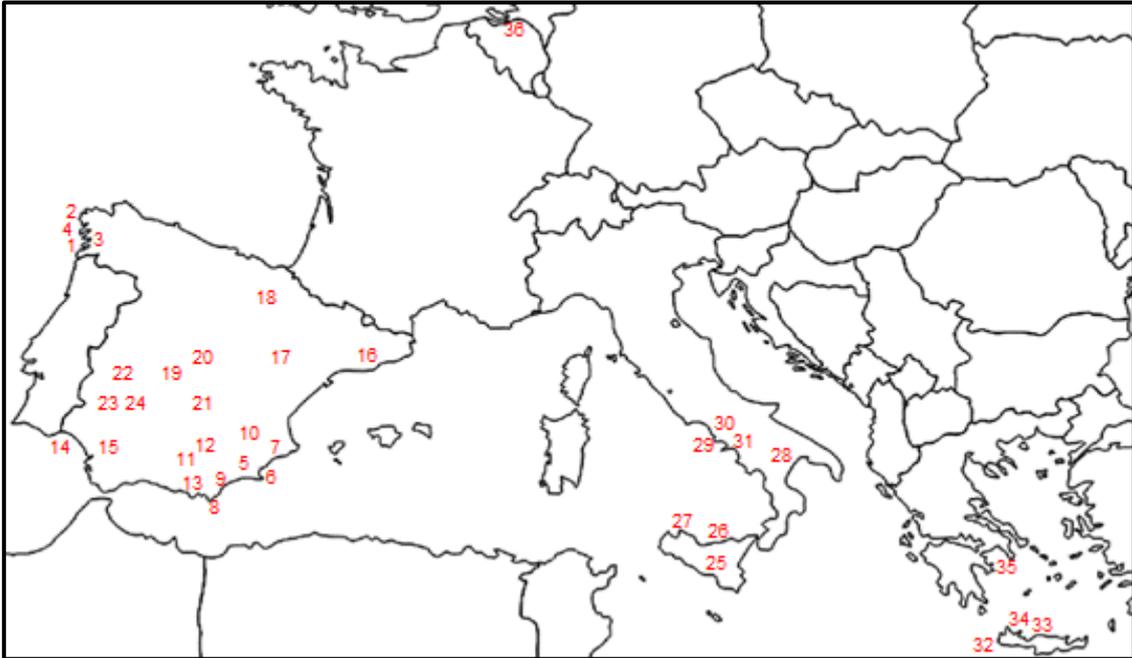


Figura 3.2. Los números corresponden a la localización en el mapa de las poblaciones silvestres de *Orius laevigatus* de la Tabla 3.1.

3.1.2 Poblaciones comerciales

También se bioensayaron como referencia 4 poblaciones comerciales de *O. laevigatus*: Bioline AgroSciences (Reino unido), Koppert (Países Bajos), Agrobío (España) y Biobest (Bélgica). Estas poblaciones fueron suministradas por las empresas y al llegar al laboratorio, se realizó su cría del mismo modo que para las poblaciones silvestres.

3.2 CRÍA Y MANTENIMIENTO DE POBLACIONES DE *Orius laevigatus*

La cría de *Orius* en el laboratorio se realiza en botes de plástico translúcidos y cilíndricos de 1L de capacidad y tapadera de cierre en forma de rosca. A la tapadera se le realiza una apertura circular que se tapa posteriormente con papel de filtro para permitir una correcta aireación del bote y evitar la condensación. El material necesario dentro de cada bote se detalla a continuación (Figura 3.3):

- **Alimento:** se alimenta a los *Orius* con huevos de *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) *ad libitum*.
- **Substrato vegetal:** se utilizan trozos de unos 6 cm de longitud de judías planas (*Phaseolus vulgaris* L.) para la puesta de huevos y también para la hidratación.

Las judías fueron compradas en un minorista local. Previamente, a estas judías se les da un tratamiento de desinfección mediante un baño en agua con lejía al 5% para eliminar hongos y posibles restos de plaguicidas. Después de trocearlas, se sellan sus extremos con parafina para evitar la entrada de los *Orius* en su interior y retrasar la deshidratación.

- **Hidratación:** se utilizan viales de 10 mL llenos de agua, que se tapan con un algodón para que por capilaridad pase el agua y los individuos puedan abastecerse. Se utilizan como apoyo para la hidratación de los *Orius*, ya que la judía se va deshidratando con el paso de los días y puede no ser suficiente.
- **Refugio:** debido al problema que supone la depredación intraespecífica, es importante que dentro de cada bote tengan refugio para protegerse. En la cría se utiliza como refugio cáscara de trigo sarraceno.



Figura 3.3. Material necesario para la cría de *Orius laevigatus*.

El proceso de cría se realiza teniendo en cuenta el ciclo biológico de esta especie (apartado 1.1.3.1 de la introducción general). Cada población se divide en 3 botes, de esta manera, hacemos una cría lineal del primer al último bote (Figura 3.4). En el primer bote (bote 1), se encuentran los adultos más longevos que están en periodo de puesta. En el segundo bote (bote 2), se encuentran los adultos jóvenes que empiezan a aparearse y poner huevos, y en el último bote (bote 3), se encuentran las ninfas.

El mantenimiento de cada población se realiza de la siguiente manera: se abastece cada bote de alimento, se comprueba la hidratación y se sacan las judías del bote 1 y bote 2 para pasarlas al bote 3 y poner una judía nueva en cada uno de ellos. A los botes se les pone una fecha de dos semanas, que es aproximadamente el tiempo que tardan las ninfas del bote 3 en emerger a adultos, cuando se cumple esta fecha, se elimina el bote 1 y se funda nuevamente un último bote con todo el material necesario, donde irán las judías con los huevos. El mantenimiento de la cría se realiza tres veces por semana para evitar que los huevos puestos en las judías eclosionen antes de ser metidos en el bote 3. Los botes se mantienen a unas condiciones de 26 ± 2 °C de temperatura (T^a), $65 \pm 5\%$ de humedad relativa (HR) y fotoperiodo 16 horas luz: 8 horas oscuridad (16:8 L:O). Como ya se ha dicho en el apartado 3.1.1, en las poblaciones silvestres recolectadas, se dejaron pasar en el laboratorio de 2-5 generaciones antes de empezar a realizar los bioensayos.

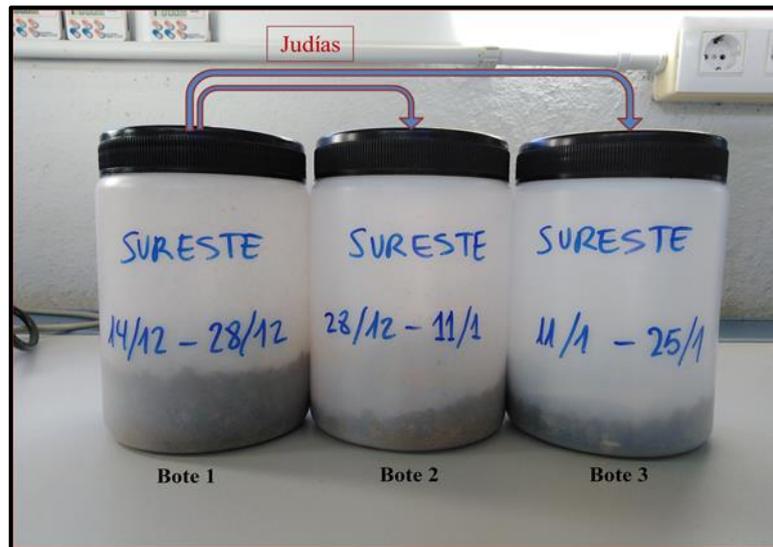


Figura 3.4. Botes de cría de una población de *Orius laevigatus*.

3.3 INSECTICIDAS UTILIZADOS PARA LOS BIOENSAYOS

Los insecticidas utilizados para realizar nuestros bioensayos son algunos de los que se usan normalmente en el sureste español para el control de plagas (Tabla 3.2 y Figura 3.5). Algunos de estos insecticidas afectan a las plagas que *O. laevigatus* depreda y otros pueden utilizarse para controlar otra plaga de la que *Orius* no se alimenta, pero que se encuentra paralelamente en el cultivo donde se ha soltado el depredador y, por lo tanto,

afectaría igualmente a este enemigo natural. Las materias activas ensayadas son las siguientes: spinosad, lambda-cihalotrín, tiametoxam e imidacloprid. En todos los casos, se hacen diluciones de los insecticidas en agua destilada a la que se le añade el mojante Tween 80 como agente humectante (0,5%). Para evitar posibles contaminaciones y por seguridad, la preparación de las dosis del insecticida se realizó en una cámara de extracción de gases.

Tabla 3.2. Insecticidas utilizados en los bioensayos de *Orius laevigatus*.

Materia activa	Grupo principal/Punto de acción IRAC	Subgrupo químico IRAC	Nombre comercial	Casa comercial
Spinosad 48% SC	5, activador del receptor nicotínico de la acetilcolina (sistema nervioso)	Spinosines	Spintor® 480 SC	Corteva Agriscience
λ-cihalotrín 1,5% CS	3, moduladores del canal del sodio (sistema nervioso)	3A Piretroides, Piretrinas	KarateZeon® 1,5 CS	Syngenta Crop Protection
Tiametoxam 25% WG	4, antagonistas del receptor nicotínico de la acetilcolina (sistema nervioso)	4A Neonicotinoides	Actara® 25 WG	Syngenta Crop Protection
Imidacloprid 20% SL	4, antagonistas del receptor nicotínico de la acetilcolina (sistema nervioso)	4A Neonicotinoides	Confidor® 20 SL	Bayer Crop Science



Figura 3.5. Formato comercial de los insecticidas utilizados (de izquierda a derecha: Confidor®, Spintor®, Actara® y KarateZeon®).

3.4 MÉTODOS DE BIOENSAYO DE INSECTICIDAS

3.4.1 Bioensayos de toxicidad

Los bioensayos de toxicidad se realizaron para determinar la toxicidad que tenían las poblaciones (silvestre, comercial o seleccionada) a los distintos insecticidas. Los

bioensayos fueron de tipo residual (exposición del insecto a una judía previamente sumergida en insecticida).

3.4.1.1 Preparación de las dosis

Las dosis elegidas para la realización de los bioensayos fueron estimadas con el objetivo de abarcar un rango entre 0-100% de mortalidad, y así obtener el máximo de información posible en el posterior análisis estadístico. En cada capítulo de este documento se detallan las dosis utilizadas, dependiendo del insecticida que se ensayó. Las dosis se realizaron en vasos de plástico de 0,250-1L de capacidad y para su disolución se utilizó un agitador magnético. Los formulados comerciales que se utilizaron para la preparación de las dosis se disolvieron en agua destilada y a partir de una disolución principal, se realizaron varias diluciones, correspondientes con las dosis a bioensayar (Figura 3.6). A cada vaso se añadieron unas gotas de Tween 80 (0,5%) como coadyuvante para mejorar la mojabilidad de la solución. Una vez preparadas las dosis de insecticida necesarias, a cada una, se añadieron las secciones de judía necesarias, de unos 3 cm de longitud, que se agitaron junto con la disolución y se dejaron secar sobre una rejilla.



Figura 3.6. Distintas dosis de insecticidas en un agitador magnético.

3.4.1.2 Montaje y lectura de los bioensayos

Los bioensayos se realizaron en salseras de plástico (vasos soufflé de 60 ml) con tapa a presión. A las tapas se les hizo una apertura circular (Figura 3.7b). A la hora de cerrar las salseras, se puso primero un trozo de papel secante y después la tapa, así se favoreció la ventilación y se evitó la aparición de hongos. Cada salsera se consideró una repetición y en ella se añadieron huevos de *E. kuehniella*, cáscara de trigo sarraceno, las judías tratadas con el insecticida y los individuos (adultos recién emergidos de 1-3 días de edad) (Figura 3.7a). En cada repetición se dispusieron 10 individuos como mínimo, tamizados y aspirados previamente con un aspirador entomológico (Figura 3.8 a y b) de la población deseada e introducidos en viales de 5 mL. Se realizaron 3 repeticiones por cada dosis, con un control de 3 repeticiones con judías tratadas sólo con agua destilada (Figura 3.9 a y b) y para cada ensayo se prepararon de 3-5 dosis de insecticida. Se estimó la mortalidad de los individuos 3 días después montar los bioensayos y se consideró que los depredadores estaban muertos si no se observaba movimiento. Todos los bioensayos se mantuvieron a unas condiciones de 26 ± 2 °C, $65 \pm 5\%$ HR y fotoperiodo 16:8 L:O.

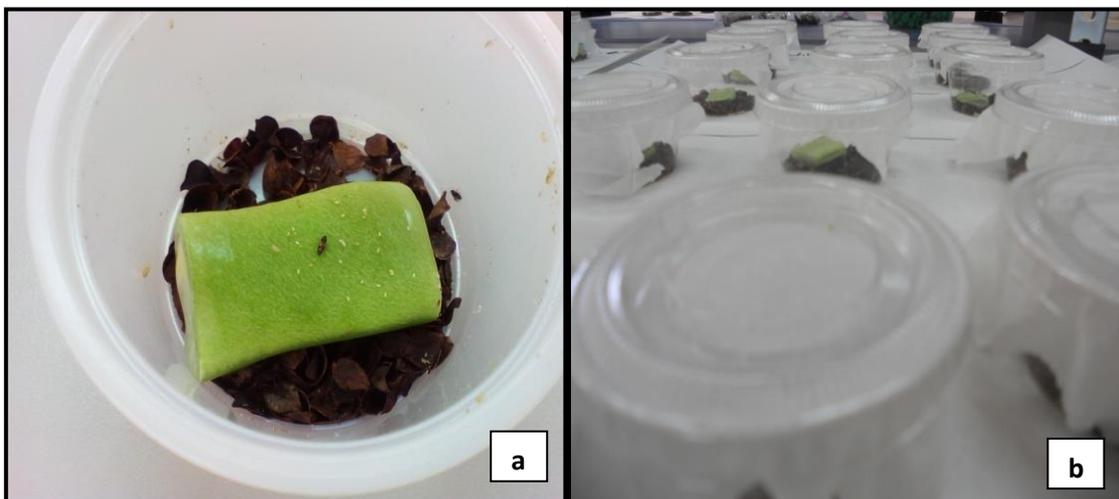


Figura 3.7. (a) Salsera correspondiente a una repetición de un ensayo sin cerrar, con el material necesario y los individuos; (b) repeticiones cerradas.

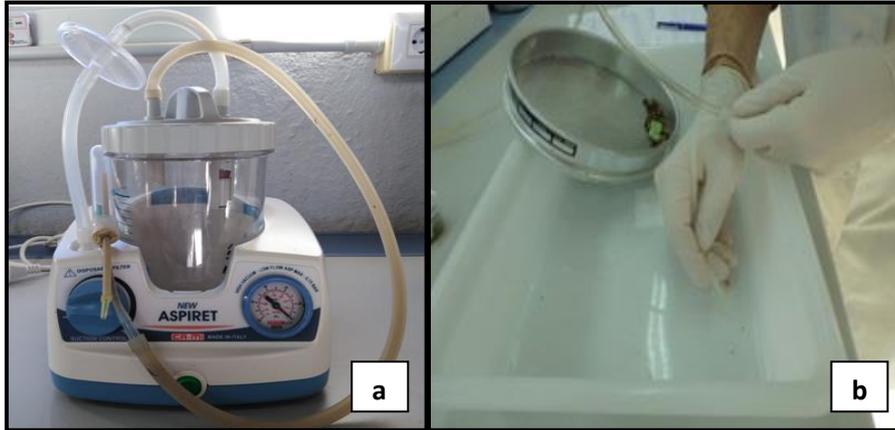


Figura 3.8.(a) Aspirador entomológico; (b) tamizado y aspiración de individuos.

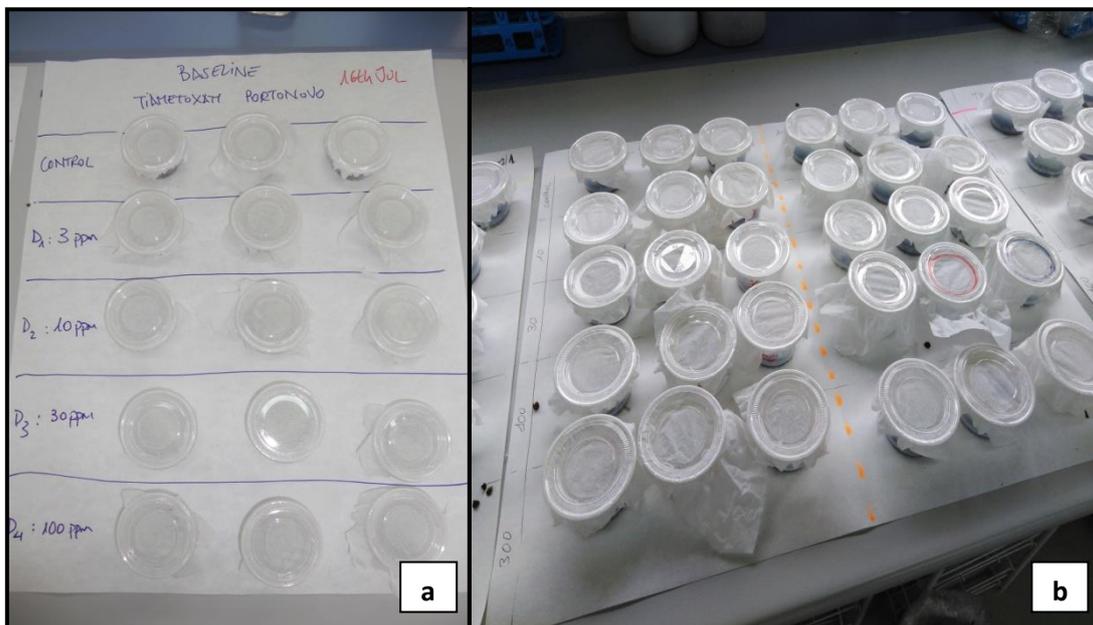


Figura 3.9. (a y b) Bioensayos de insecticidas.

3.4.2. Bioensayos de selección

Los bioensayos de selección se realizaron solamente para las poblaciones que se estaban seleccionando a un determinado insecticida. Los bioensayos fueron de tipo residual (exposición del insecto a una judía previamente sumergida en insecticida). La metodología fue igual para todos los insecticidas descritos en el apartado 3.3

3.4.2.1 Preparación de las dosis

Para los bioensayos de selección, las dosis de los insecticidas se prepararon tal y como se describe en el apartado 3.4.1. En los capítulos siguientes de este documento, se

especificarán las dosis ensayadas. Una vez preparada la dosis, se añadieron cuatros secciones de judía de unos 6 cm, que se agitaron con la disolución y se dejaron secar.

3.4.2.2 Montaje y lectura de los bioensayos

Las poblaciones silvestres y comerciales se seleccionaron primero con la dosis de campo del insecticida que se estaba ensayando. Con los supervivientes, se fundó una nueva población que fue expuesta posteriormente a concentraciones crecientes de insecticida, realizando bioensayos residuales de selección. Los bioensayos de selección se realizaron en botes similares a los utilizados para la cría de *O. laevigatus*, a los que se añadieron huevos de *E. kuehniella*, cáscara de trigo sarraceno, los trozos de judía tratadas con el insecticida (2 a cada bote) y los individuos (adultos recién emergidos de 1-3 días de edad) (Figura 3.10). En cada ciclo de selección, se utilizaron 700–1200 adultos, manteniendo una mortalidad del 70-90% y seleccionando, al menos, 100 individuos supervivientes. Se estimó el porcentaje de mortalidad de los individuos 3 días después de realizar el bioensayo y se consideró que los depredadores estaban muertos si no se observaba movimiento. Todas las selecciones se mantuvieron a unas condiciones de 26 ± 2 °C, 65 ± 5 % HR y fotoperiodo 16:8 L:O.

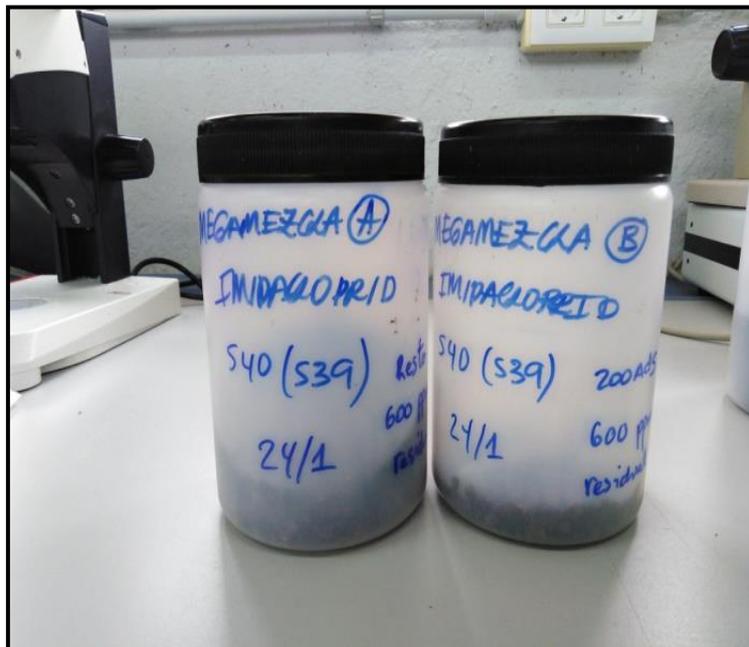


Figura 3.10. Ejemplo de un ensayo de selección.

3.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS

3.5.1 Análisis probit

Antes de realizar el tratamiento de los datos en cada uno de nuestros bioensayos, se discutieron o reajustaron las dosis, con el fin de obtener mortalidades comprendidas entre 0-100%. En los bioensayos de toxicidad, los datos fueron corregidos con respecto a la mortalidad observada en el control (Abbott, 1925) y posteriormente se analizaron utilizando el programa estadístico PoloPlus® haciendo un análisis probit (Russell *et al.*, 1977). Para determinar las diferencias significativas entre las distintas poblaciones ensayadas, se calcularon las concentraciones letales (CL_{50}) y los límites fiduciales (LF) al 95% de confianza. Se consideraron significativamente diferentes si sus respectivos límites de confianza (LF) al 95% no se superponían.

3.5.2 Mortalidad a la dosis de campo (MDC)

La mortalidad a la dosis de campo máxima (MDC) se calculó utilizando la relación dosis-mortalidad obtenida para cada población e insecticida.

3.5.3 Factor de resistencia (FR)

También se calcularon los factores de resistencia a nivel de CL_{50} (FR_{50}) para cada población, con relación a la CL_{50} de la población susceptible de referencia. Los factores de resistencia se determinaron dividiendo los valores de CL_{50} de cada una de las poblaciones estudiadas, por el valor de CL_{50} correspondiente a la cepa más susceptible. Cuando se obtiene un $FR_{50} \geq 10$ podemos hablar de posibles resistencias entre las poblaciones. En cambio, cuando el $FR_{50} < 10$, las diferencias significativas entre las CL_{50} de las diferentes poblaciones son atribuibles a una variación natural de la susceptibilidad a dicho producto.

3.5.4 Clases de toxicidad

Para la evaluación de la mortalidad, se utilizaron las clases de toxicidad desarrolladas para la prueba de laboratorio de toxicidad de contacto inicial en el "peor caso" (Sterk *et al.*, 1999): clase 1 (inofensivo): efecto <30%; clase 2 (levemente dañino): 30-79% de efecto; clase 3 (moderadamente dañino): 80-99% de efecto; clase 4 (dañino): efecto > 99%.

3.5.5 Mortalidad en las selecciones

En la población que se estaba seleccionando, se calculó el porcentaje de mortalidad entre ciclos de selección y se realizaron bioensayos de toxicidad después de varias selecciones, haciendo el correspondiente análisis probit, como se ha descrito anteriormente. De esta forma se iba observando la evolución de la CL_{50} de la población seleccionada.

3.6. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, S.W., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265–267.
- Rusell, R.M., Robertson, J.L., Savin, N.E., 1977. POLO: a new computer program for probit analysis. *Bulletin of the Entomological Society of America* 23: 209-213.
- Sterk, G., Hassan, S.A., Baillod, M., Bakker, F., Bigler, F., Blümel, S., Ogenschütz, H., Boller, E., Bromand, B., Brun, J., Calis, J.N.M., Coremans-Pelseneer, J., Duso, C., Garrido, A., Grove, A., Heimbach, U., Hokkanen, H., Jacas, J., Lewis, G., Moreth, L., Polgar, L., Rovesti, L., Samsoe-Peterson, L., Sauphanor, B., Schaub, L., Stäubli, A., Tuset, J.J., Vainio, A., Van de Veire, M., Viggiani, G., Viñuela, E., and Vogt, H., 1999. Results of seventh joint pesticides testing programme carried out by the IOCB/WPRS Working Group. *Pesticides and Beneficial Organisms. Biocontrol* 44: 99-117.

4. VARIACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD Y SELECCIÓN PARA LA RESISTENCIA A IMIDACLOPRID Y TIAMETOXAM EN POBLACIONES MEDITERRÁNEAS DE *Orius laevigatus*

Balanza, V., Mendoza, J.E., Bielza, P., 2019. Variation in susceptibility and selection for resistance to imidacloprid and thiamethoxam in Mediterranean populations of *Orius laevigatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 167: 626-635. <https://doi.org/10.1111/eea.12813>

4.1 INTRODUCCIÓN

La gestión integrada de plagas (GIP) está orientada a la producción de cultivos saludables con bajo impacto en los agroecosistemas y la utilización de métodos biológicos para el control de plagas. En este contexto, la GIP en agentes de control biológico (ACB) se ha impuesto en muchos cultivos, especialmente en cultivos hortícolas producidos en invernaderos (Van Lenteren y Woets, 1988; Calvo *et al.*, 2012). Sin embargo, el control biológico no siempre es suficiente para manejar las poblaciones de plagas, y se requieren aplicaciones adicionales de insecticidas (Rodrigues *et al.*, 2013a; Bielza, 2016). Además, como se ha comentado en el apartado 1.4.2 de la introducción general, pueden surgir problemas que podrían desestabilizar el sistema. En estos casos sería necesario utilizar algún tipo de compuestos selectivos hacia los ACB para equilibrar el complejo de plagas y no siempre funcionan o no hay disponibilidad de ellos, por lo que se interrumpe la estrategia de biocontrol (Bielza, 2016).

Los neonicotinoides son compuestos con actividad sistémica, translaminar y de contacto (Elbert *et al.*, 1991). Según su modo de acción (IRAC 2020), se encuentran clasificados en el grupo 4 y actúan sobre el sistema nervioso de los insectos, siendo agonistas del receptor nicotínico de la acetilcolina y provocando hiperexcitación (la acetilcolina es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central del insecto). Estos insecticidas de amplio espectro tienen poca selectividad hacia los insectos beneficiosos (Cloyd y Bethke, 2011; Phrabaker *et al.*, 2011). Sin embargo, las aplicaciones puntuales de estos productos ayudarían al control cuando aparecen dificultades con plagas

secundarias en cultivos de invernadero en los que se aplica control biológico, como mosquitos verdes, chinches y cochinillas, que carecen por completo de enemigos naturales para su control, y exigen pulverizaciones inevitables con insecticidas, incluidos los neonicotinoides (Van der Blom *et al.*, 2009). Las moscas blancas y los pulgones tienen una buena cantidad de enemigos naturales, pero en ciertas circunstancias también requieren un tratamiento químico adicional (Van der Blom *et al.*, 2009). Además, la introducción de plagas invasoras, como el gorgojo del pimiento, *Anthonomus eugeni* (Cano) (Coleoptera: Curculionidae), requerirían la aplicación de compuestos no compatibles con la mayoría de los agentes de control biológico (ACB), como los neonicotinoides, ya que no se conocen enemigos naturales efectivos (Speranza *et al.*, 2014).

Como se ha descrito en el apartado 1.4.1 de la introducción general, el aspecto más difícil de la integración efectiva entre los insecticidas y los enemigos naturales es superar su incompatibilidad (Rodrigues *et al.*, 2013a). En el apartado 1.4.2 de la introducción general se comenta la importancia de la variabilidad natural en la susceptibilidad a los insecticidas entre distintas poblaciones. Esta variación intraespecífica puede explotarse para seleccionar poblaciones resistentes a los insecticidas y fungicidas que deben aplicarse para controlar ciertas plagas y enfermedades, lo que permitiría la acción beneficiosa de los enemigos naturales (Bielza, 2016). Tener enemigos naturales más tolerantes a los insecticidas será clave para la perpetuación de los programas de GIP basados en el control biológico.

Orius laevigatus (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) muestra una alta susceptibilidad a los neonicotinoides (Delbeke *et al.*, 1997; Van de Veire y Tirry, 2003; Angeli *et al.*, 2005). Por lo tanto, contar con poblaciones de *O. laevigatus* resistentes a estos plaguicidas mejoraría el uso del control biológico aumentativo en cultivos hortícolas de invernadero.

En el presente estudio, investigamos la toxicidad a imidacloprid y tiametoxam en varias poblaciones silvestres de la cuenca mediterránea y en algunas poblaciones comerciales de *O. laevigatus*. Además, se seleccionó artificialmente una población de *O. laevigatus* resistente a cada uno de los neonicotinoides.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Insectos

Un total de 30 poblaciones silvestres de *O. laevigatus* se recolectaron en varios países mediterráneos entre 2012 y 2015 (ver Tabla 3.1 y Figura 3.2 en materiales y métodos generales). Además, se utilizaron como referencia las cuatro poblaciones comerciales descritas en el apartado 3.1.2 de materiales y métodos generales. Los insectos de todas las poblaciones recolectadas fueron criados en el laboratorio (ver 3.2 de materiales y métodos generales).

4.2.2 Insecticidas

Los insecticidas utilizados en este estudio fueron formulaciones comerciales de imidacloprid (Confidor 20 SL; Bayer Cropscience, Monheim am Rhein, Alemania) y tiametoxam (Actara 25 WG; Syngenta Crop Protection, Basilea, Suiza). Los productos comerciales se disolvieron en agua destilada + Tween 80 como agente humectante (0,5%) para obtener diferentes concentraciones del insecticida.

4.2.3 Bioensayos

Se realizaron bioensayos de toxicidad residuales (ver 3.4.1 de materiales y métodos generales). Todas las poblaciones fueron ensayadas con imidacloprid y tiametoxam. Se utilizaron cuatro concentraciones para cada insecticida y un control sin insecticida: 10, 30, 100 y 300 mg L⁻¹ para imidacloprid y 1, 3, 10 y 30 mg L⁻¹ para tiametoxam. Se eligieron las concentraciones de los insecticidas para dar un rango de mortalidad de 0 a 100%. Después de 3 días, se evaluó la mortalidad para ambos insecticidas.

4.2.4 Selecciones para conseguir una población resistente

Se seleccionaron dos poblaciones, una resistente al imidacloprid y la otra al tiametoxam, realizando ensayos residuales en el laboratorio. Las poblaciones silvestres y comerciales se seleccionaron primero con 150 ppm de imidacloprid y 10 ppm de tiametoxam, lo que corresponde a una mortalidad de alrededor del 80% con relación a la línea de base. Los supervivientes de cada población e insecticida se agruparon en dos poblaciones RIMI00 y RTMX00, respectivamente. Estas poblaciones fueron expuestas posteriormente a concentraciones crecientes de cada insecticida mediante bioensayos de selección

(apartado 3.4.2 de materiales y métodos generales). Las concentraciones más altas utilizadas fueron 1000 y 300 mg L⁻¹ y se realizaron 38 y 43 ciclos de selección para imidacloprid (RIMI38) y tiametoxam (RTMX43), respectivamente.

4.2.5 Análisis de datos

Se calcularon las concentraciones letales (CL₅₀) y los límites fiduciales al 95% de confianza (análisis probit), mortalidad a la dosis de campo (MDC), factor de resistencia (FR₅₀) y las clases de toxicidad, tal y como se describen en la parte 3.5 de materiales y métodos generales.

Para las poblaciones resistentes también se calcularon las concentraciones letales (CL₅₀) y los límites fiduciales al 95% de confianza (análisis probit) (apartado 3.5.1, materiales y métodos generales).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Variación entre poblaciones

Treinta poblaciones silvestres de *O. laevigatus* de España, Italia y Grecia y cuatro poblaciones comerciales se analizaron para determinar su susceptibilidad al tiametoxam (Tabla 4.1) y al imidacloprid (Tabla 4.2).

La susceptibilidad al tiametoxam varió entre las poblaciones, con diferencias significativas entre algunas de ellas. El rango de CL₅₀ de tiametoxam para todas las poblaciones fue de 0,7 a 5,9 mg L⁻¹, lo que indica una variabilidad de 8,4 veces entre la población menos (Agrobío) y la más tolerante (Catadoiro). La línea de base obtuvo un valor de 2,1 mg L⁻¹, que es muy bajo en comparación con la dosis de campo (100 mg L⁻¹). Además, la MDC en todas las poblaciones varió de 89,1 a 100%, lo que dio lugar a clases de toxicidad 3 (moderadamente dañinas) y 4 (dañinas) (Sterk *et al.*, 1999). Estos resultados confirman que tiametoxam puede considerarse muy tóxico para *O. laevigatus*.

Tabla 4.1. Datos de susceptibilidad a tiametoxam en poblaciones silvestres de *Orius laevigatus*.

Origen	Población	Pendiente (\pm SE)	CL ₅₀ mg L ⁻¹ (95% LF) ^a	FR ₅₀ ^b	MDC (%) ^c	Clase ^d
España (Noroeste)	Portonovo	4,3 \pm 1,04	4,7 (2,9-6,3)	6,7	100,0	4
	Corrubedo	1,4 \pm 0,29	2,5 (1,1-4,4)	3,6	98,5	3
	Moreira	2,5 \pm 0,50	1,6 (1,0-2,2)	2,3	100,0	4
	Catadoiro	1,3 \pm 0,28	5,9 (1,7-15,0)	8,4	94,9	3
España (Sureste)	Perín	1,8 \pm 0,45	3,6 (0,6-7,1)	5,1	99,6	4
	Cabo de Palos	1,3 \pm 0,32	5,7 (1,7-10,4)	8,1	95,0	3
	La Zenia	1,9 \pm 0,39	4,8 (2,3-7,4)	6,9	99,3	4
	Cabo de Gata	2,2 \pm 0,52	1,2 (0,5-1,9)	1,7	100,0	4
	Cuevas de Almanzora	1,2 \pm 0,28	2,6 (0,9-5,0)	3,7	97,2	3
	Hellín	2,9 \pm 0,60	1,6 (0,9-2,3)	2,3	100,0	4
	Puerto de la Mora	1,2 \pm 0,19	2,1 (1,2-3,1)	3,0	98,1	3
España (Suroeste)	Cazorla	1,9 \pm 0,25	2,1 (0,9-3,4)	3,0	99,9	4
	Islantilla	1,1 \pm 0,17	2,5 (1,1-4,2)	3,6	95,7	3
España (Noreste)	Carmona	1,1 \pm 0,23	1,9 (0,9-4,3)	2,7	97,3	3
	Cabrils	1,6 \pm 0,41	1,8 (0,8-3,0)	2,6	99,7	4
	Teruel	1,7 \pm 0,24	1,6 (0,8-2,4)	2,3	99,9	4
España (Centro)	Logroño	2,0 \pm 0,31	4,0 (1,8-7,4)	5,7	99,7	4
	Méntrida	0,9 \pm 0,23	4,0 (1,7-9,1)	5,7	89,1	3
	Alcobendas	2,9 \pm 0,67	1,9 (1,1-2,6)	2,7	100,0	4
España (Oeste)	Ruidera	1,8 \pm 0,45	3,6 (0,6-7,1)	5,1	99,6	4
	Guadalupe	1,5 \pm 0,27	2,4 (1,4-3,5)	3,4	99,4	4
	Arroyo de San Servan	1,5 \pm 0,27	2,9 (0,5-7,0)	4,1	99,0	4
Italia (Sicilia)	Mérida	1,8 \pm 0,36	2,2 (1,1-3,4)	3,1	99,9	4
	Acate	1,5 \pm 0,56	1,6 (0,8-2,4)	2,3	99,3	4
	Cefalú	1,5 \pm 0,27	4,1 (2,2-6,6)	5,9	98,1	3
Italia (Sur)	Palermo	2,7 \pm 0,57	1,7 (1,1-2,3)	2,4	100,0	4
	Policoro	1,5 \pm 0,22	1,4 (0,7-2,2)	2,0	99,7	4
Grecia (Creta)	Samaria	2,1 \pm 0,32	1,5 (0,9-2,0)	2,1	100,0	4
	Rethymno	1,9 \pm 0,36	3,9 (2,3-5,8)	5,6	99,6	4
	Chania	2,6 \pm 0,53	3,6 (2,2-5,1)	5,1	100,0	4
Comercial	Syngenta	2,3 \pm 0,53	3,2 (0,9-5,3)	4,6	100,0	4
	Biobest	1,6 \pm 0,32	2,0 (0,7-3,5)	2,9	99,7	4
	Agrobío	1,9 \pm 0,38	0,7 (0,4-1,0)	1,0	100,0	4
	Koppert	2,0 \pm 0,42	0,9 (0,4-1,4)	1,3	100,0	4
	Línea base	1,4 \pm 0,04	2,1 (1,7-2,5)	3,1	99,0	4

^a Concentración del insecticida que mata el 50% de los individuos y sus límites fiduciales (95%).

^b Factor de resistencia= CL₅₀ de cada población/CL₅₀ de la población más susceptible de referencia.

^c Mortalidad a la máxima dosis de campo (100 mg L⁻¹).

^d Clases de toxicidad: clase 1 (inofensivo): efecto <30%; clase 2 (ligeramente dañino): 30-79% de efecto; clase 3 (moderadamente dañino): 80-99% de efecto; clase 4 (dañino): efecto > 99%.

Para el imidacloprid, también hubo diferencias significativas entre algunas poblaciones (Tabla 4.2). En este caso, la población más sensible fue Cabo de Palos ($CL_{50} = 7,7 \text{ mg L}^{-1}$) y la población más tolerante fue Guadalupe ($CL_{50} = 94,7 \text{ mg L}^{-1}$), lo que indica una variabilidad de 12,3 veces. La dosis de campo del imidacloprid es 150 mg L^{-1} , en base a ella, se calcularon las MDC (57,7–99,2%) y se observó que fueron más variables que para el tiametoxam. El valor de CL_{50} de la línea base fue de $48,7 \text{ mg L}^{-1}$, que puede considerarse bajo en comparación con la dosis de campo, pero en este caso, las clases de toxicidad variaron de 2 (ligeramente dañino) a 4 (dañino), por lo que el imidacloprid afectó a *O. laevigatus* de manera diferente en las poblaciones estudiadas.

Según nuestros resultados, el tiametoxam fue significativamente más tóxico que el imidacloprid. El valor de CL_{50} de la línea base para el tiametoxam ($2,1 \text{ mg L}^{-1}$) fue significativamente menor que el de imidacloprid ($48,7 \text{ mg L}^{-1}$). Además, las mortalidades calculadas en base a la dosis máxima de campo siempre fueron superiores al 89% para el tiametoxam, con 24 poblaciones de 34 que mostraron una mortalidad > 99%, incluidas las cuatro poblaciones comerciales. Por el contrario, solo para imidacloprid nueve de las 34 poblaciones exhibieron una MDC superior al 89% sin incluir las comerciales, y la mitad de las poblaciones fueron inferiores al 75%.

4.3.2 Selección para la resistencia

La selección aumentó significativamente la resistencia al tiametoxam ($CL_{50} = 149,15 \text{ mg L}^{-1}$) 71 veces en comparación con la línea base y 213 veces en comparación con la población más susceptible (Tabla 4.3). Del mismo modo, la selección realizada con imidacloprid ($CL_{50} = 309,95 \text{ mg L}^{-1}$) también aumentó significativamente la resistencia en comparación con el valor inicial, obteniendo un factor de resistencia de 6,4 veces, y de 40 veces, en comparación con la población más susceptible (Tabla 4.3).

Las MDC en las poblaciones resistentes a tiametoxam e imidacloprid fueron 44,5 y 36,9 %, respectivamente, y en ambos casos la toxicidad fue de clase 2 (ligeramente dañino) (Sterk *et al.*, 1999).

Tabla 4.2. Datos de susceptibilidad a imidacloprid en poblaciones silvestres de *Orius laevigatus*.

Origen	Población	Pendiente (±SE)	CL ₅₀ mg L ⁻¹ (95% LF) ^a	FR ₅₀ ^b	MDC (%) ^c	Clase ^d
España (Noroeste)	Portonovo	1,8 ± 0,34	44,9 (28,7-83,2)	5,8	82,5	3
	Corrubedo	1,3 ± 0,24	46,0 (22,4-86,7)	6,0	74,9	2
	Moreira	2,1 ± 0,39	24,4 (14,2-36,2)	3,2	94,9	3
	Catadoiro	1,2 ± 0,27	77,3 (38,9-147,5)	10,0	63,1	2
España (Sureste)	Perín	2,5 ± 0,59	48,4 (33,5-67,4)	6,3	88,8	3
	Cabo de Palos	1,6 ± 0,32	7,7 (4,2-11,8)	1,0	98,2	3
	La Zenia	0,9 ± 0,17	44,1 (17,8-236,7)	5,7	69,0	2
	Cabo de Gata	2,0 ± 0,36	27,4 (16,1-40,6)	3,6	92,4	3
	Cuevas de Almanzora	1,6 ± 0,32	62,0 (26,6-118,4)	8,1	73,4	2
	Hellín	2,9 ± 0,65	77,7 (38,2-116,0)	10,1	79,6	2
	Puerto de la Mora	0,7 ± 0,20	78,5 (30,4-275,7)	10,2	57,7	2
	Cazorla	1,6 ± 0,20	67,5 (35,9-119,4)	8,8	70,9	2
España (Suroeste)	Islantilla	1,3 ± 0,19	28,8 (15,2-45,5)	3,7	81,6	3
	Carmona	1,6 ± 0,29	79,1 (48,8-126,8)	10,3	67,2	2
España (Noreste)	Cabrils	3,5 ± 0,96	31,0 (18,3-41,6)	4,0	99,2	4
	Teruel	1,3 ± 0,25	72,6 (40,4-113,1)	9,4	66,0	2
	Logroño	1,8 ± 0,29	92,6 (63,0-127,2)	12,0	64,8	2
España (Centro)	Méntrida	2,1 ± 0,29	17,0 (10,2-24,5)	2,2	97,5	3
	Alcobendas	4,0 ± 0,81	39,6 (26,0-53,6)	5,1	98,9	3
	Ruidera	1,4 ± 0,24	86,8 (47,1-201,7)	11,3	63,2	2
España (Oeste)	Guadalupe	1,4 ± 0,35	94,7 (48,7-165,9)	12,3	61,3	2
	Arroyo de San Serván	1,7 ± 0,26	57,0 (31,7-103,6)	7,4	75,7	2
	Mérida	3,3 ± 0,84	43,0 (12,2-64,7)	5,6	96,4	3
Italia (Sicilia)	Acate	2,5 ± 0,43	75,1 (53,3-100,1)	9,8	77,6	2
	Cefalú	2,7 ± 0,40	29,7 (19,6-40,8)	3,9	97,0	3
	Palermo	1,6 ± 0,23	38,8 (20,9-64,4)	5,0	79,7	2
Italia (Sur)	Policoro	2,5 ± 0,54	77,7 (47,8-108,7)	10,1	75,9	2
Grecia (Creta)	Samaria	2,2 ± 0,50	90,9 (51,3-135,5)	11,8	68,5	2
	Rethymno	0,9 ± 0,20	80,1 (27,8-373,9)	10,4	59,7	2
	Chania	1,9 ± 0,54	78,1 (29,2-124,8)	10,1	70,2	2
Comercial	Syngenta	1,4 ± 0,25	41,4 (25,1-67,6)	5,4	69,1	2
	Biobest	2,0 ± 0,46	57,3 (29,5-85,6)	7,4	80,1	3
	Agrobío	2,1 ± 0,33	48,7 (29,0-75,0)	6,3	84,2	3
	Koppert	1,7 ± 0,35	32,4 (10,9-59,7)	4,2	86,4	3
	Línea base	1,4 ± 0,04	48,7 (40,4-58,04)	6,3	75,9	3

^a Concentración del insecticida que mata el 50% de los individuos y sus límites fiduciales (95%).

^b Factor de resistencia= CL₅₀ de cada población/CL₅₀ de la población más susceptible de referencia.

^c Mortalidad a la máxima dosis de campo (150 mg L⁻¹).

^d Clases de toxicidad: clase 1 (inofensivo): efecto <30%; clase 2 (ligeramente dañino): 30-79% de efecto; clase 3 (moderadamente dañino): 80-99% de efecto; clase 4 (dañino): efecto > 99%.

Tabla 4.3. Datos de susceptibilidad a tiametoxam e imidacloprid de la población más sensible y la más resistente de *Orius laevigatus*.

Insecticida	Población	Pendiente (\pm SE)	CL ₅₀ mg L ⁻¹ (95% LF) ^a	FR ₅₀ ^b	MDC (%) ^c	Clase ^d
Tiametoxam	Más susceptible	1,9 \pm 0,38	0,7 (0,4-1,0)	1,0	100,0	4
	Línea base	1,4 \pm 0,04	2,1 (1,7-2,5)	3,1	99,0	4
	RTMX43	0,8 \pm 0,25	149,2 (60,8-802)	71-213	44,5	2
Imidacloprid	Más susceptible	1,6 \pm 0,32	7,7 (4,2-11,8)	1,0	98,2	3
	Línea base	1,4 \pm 0,04	48,7 (40,4-58,0)	6,3	75,9	3
	RIMI38	1,1 \pm 0,27	309,9 (171-683)	6,4-40	36,9	2

^a Concentración del insecticida que mata el 50% de los individuos y sus límites fiduciales (95%).

^b Factor de resistencia= CL₅₀ de cada población/CL₅₀ de la población más susceptible de referencia.

^c Mortalidad a la máxima dosis de campo (100 y 150 mg L⁻¹).

^d Clases de toxicidad: clase 1 (inofensivo): efecto <30%; clase 2 (ligeramente dañino): 30-79% de efecto; clase 3 (moderadamente dañino): 80-99% de efecto; clase 4 (dañino): efecto > 99%.

4.4 DISCUSIÓN

Los estudios de compatibilidad de enemigos naturales con insecticidas son importantes para conocer el rango de tolerancia que los ACB tienen a los insecticidas, especialmente en ACB clave como las especies de *Orius*. Existen varios estudios sobre la toxicidad del tiametoxam y/o imidacloprid en varias especies de *Orius* (Tang *et al.*, 2007; Dağlı y Bahşi, 2009; Phrabaker *et al.*, 2011; Herrick y Cloyd, 2017) y otros enemigos naturales (Armizade *et al.*, 2014; Phrabaker *et al.*, 2017; Herrick y Cloyd, 2017). Hasta donde sabemos, no se han realizado estudios de enemigos naturales, incluido *O. laevigatus*, sobre la variabilidad genética de la susceptibilidad al tiametoxam y al imidacloprid en un número considerable de poblaciones silvestres.

Treinta poblaciones silvestres y cuatro comerciales de *O. laevigatus* mostraron una alta susceptibilidad a tiametoxam e imidacloprid, con valores de CL₅₀ de 0,7–5,9 y 7,7–94,7 mg L⁻¹, respectivamente. Van de Veire y Tirry (2003), también mostraron que el tiametoxam y el imidacloprid eran muy tóxicos para *O. laevigatus*, pero en su caso, ambos neonicotinoides mataron al 100% de las ninfas de primer y segundo estadio en un período de exposición de 4 días con una dosis de 0,15 μ g cm². Delbeke *et al.* (1997) también informaron una alta toxicidad de imidacloprid en adultos de una población comercial de *O. laevigatus* por contacto residual (CL₅₀= 0,3 mg L⁻¹) e ingestión (CL₅₀= 2,1 mg L⁻¹). Nuestros resultados mostraron valores más altos de CL₅₀ para imidacloprid (7,7–94,7 mg L⁻¹), incluso para la población comercial (32,4 mg L⁻¹). La diferente en la

metodología del bioensayo pudo influir en que estos resultados fueran distintos, pero también indica que la única población utilizada por Delbeke *et al.* (1997) fue particularmente sensible a imidacloprid. Se sabe que la susceptibilidad a los insecticidas no es un rasgo fijo para una especie determinada, sino que existe una variación entre las poblaciones, tanto en plagas (Guillén y Bielza, 2015; Grávalos *et al.*, 2015) como en enemigos naturales (Pathan *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2013a; Costa *et al.*, 2018). Nuestros resultados muestran la importancia de probar varias poblaciones cuando se estudia la compatibilidad o tolerancia de un agente de control biológico a los plaguicidas. La MDC de imidacloprid es del 99% para la población de Cabrils pero del 58% para la población de Puerto de la Mora, esto daría lugar a diferencias prácticas en el campo.

Algunos autores han estudiado la tolerancia de estos neonicotinoides en otras especies de *Orius*. Aplicaciones sistémicas de imidacloprid y tiametoxam fueron altamente tóxicas para *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae) (Phrabaker *et al.*, 2011) (CL_{50} = 2,78 y 1,67 mg mL⁻¹ para imidacloprid y tiametoxam, respectivamente), sin diferencias significativas entre ellos para este enemigo natural. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros ensayos recientes (Phrabaker *et al.*, 2017). Usando pruebas residuales en papel de filtro se descubrió que el imidacloprid era más tóxico para *O. insidiosus* que el tiametoxam (CL_{50} = 0,08 vs. 0,8 mg cm²) (Fernandes *et al.*, 2016). Un estudio reciente demostró una mayor toxicidad del tiametoxam que del imidacloprid en *O. insidiosus* (Herrick y Cloyd, 2017). La mortalidad a la dosis de campo fue de 40, 80 y 100% después de 48, 72 y 96 h de exposición, respectivamente, para imidacloprid y 100% para tiametoxam después de 48-96 h (Herrick y Cloyd, 2017). Esto está de acuerdo con nuestros resultados, mostrando una mayor susceptibilidad de *O. laevigatus* al tiametoxam que al imidacloprid. Del mismo modo, en un estudio de campo usando un tratamiento para semillas de algodón, el tiametoxam tuvo un mayor efecto supresor que el imidacloprid en poblaciones de *Orius* sp. (Saeed *et al.*, 2015).

Los efectos de estos neonicotinoides en otros *Orius* sp. también se han estudiado por separado, como el estudio de toxicidad de imidacloprid bajo diferentes métodos de exposición en *Orius majusculus* (Reuter) (Hemiptera: Anthocoridae) por Dağlı y Bahşi (2009), que indicaron un 100% de mortalidad cuando se aplicaron tópicamente y una

alta mortalidad (> 76%) después de 48 h en ensayos de tipo residual y sistémico. Nuestros datos se muestran muy cerca de estos resultados, ya que la línea base de imidacloprid en *O. laevigatus* obtuvo una mortalidad del 76% a la dosis de campo. Otra especie estudiada con imidacloprid fue *Orius minutus* (Linnaeus) (Hemiptera: Anthocoridae) (Tang *et al.*, 2007), en la cual se encontró una CL₅₀ de 62,1 mg L⁻¹, similar a la CL₅₀ obtenida para la mayoría de las poblaciones silvestres en el presente trabajo.

Los enemigos naturales son la piedra angular de los programas de GIP en cultivos protegidos (Van Lenteren *et al.*, 2018), donde los usos de insecticidas se han reducido drásticamente (Sánchez *et al.*, 2000; Calvo *et al.*, 2011). Los neonicotinoides se consideran muy tóxicos para los ACB, y normalmente se evita su uso (Delbeke *et al.*, 1997). Sin embargo, ocasionalmente deben usarse contra ciertos tipos de plagas, como las moscas blancas [*Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)], los pulgones y las plagas secundarias [*Nezara viridula* (Linnaeus) (Hemiptera: Pentatomidae)], los mosquitos verdes [*Empoasca* sp. (Hemiptera: Cicadellidae)], y las cochinillas [(*Phenacoccus solani* (Ferris) (Hemiptera: Pseudococcidae)] (Van der Blom *et al.*, 2009). Por lo general, estas aplicaciones de insecticidas conducen a la interrupción del control biológico. Por lo tanto, los enemigos naturales resistentes seleccionados contribuirían a la estabilidad y la resistencia de los programas de GIP basados en el control biológico. Nuestros resultados muestran variabilidad en la tolerancia a los insecticidas neonicotinoides en poblaciones de *O. laevigatus*. Por lo tanto, esta variación podría explotarse para optimizar la acción beneficiosa de los enemigos naturales (Bielza, 2016; Lommen *et al.*, 2017). Sobre esta base, se inició un programa de selección en nuestro laboratorio, con el objetivo de seleccionar poblaciones de *O. laevigatus* resistentes a imidacloprid y tiametoxam.

Los niveles de resistencia obtenidos para el tiametoxam y el imidacloprid son relativamente bajos en comparación con los que se han observado para especies de plagas (Fernandez *et al.*, 2009). Sin embargo, el nivel de resistencia seleccionado puede ser suficiente para lograr una buena supervivencia de los individuos cuando sean expuestos a la dosis de campo de ambos neonicotinoides. Cuando tanto los ACB como su plaga son afectados por la exposición a un insecticida, la diferencia de la susceptibilidad entre ambos no tiene por qué ser amplia, sino la suficiente como para

que el número de ACB muertos no perjudique el equilibrio entre las poblaciones del enemigo natural y la plaga (Rodrigues *et al.*, 2013b). Sin embargo, en nuestro caso, la principal presa de *O. laevigatus* [el trips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae)] no es el objetivo de los tratamientos con neonicotinoides, sino otras plagas principales y secundarias. Así, los neonicotinoides deben aplicarse de forma que se garantice el control eficaz de las plagas objetivo sin reducir las poblaciones de *O. laevigatus* hasta el punto de alterar el control biológico de los trips. En este sentido, una mortalidad alrededor del 40%, como se espera a la dosis máxima de campo para las poblaciones seleccionadas RIMI38 y RTMX43, podría ser crítica cuando se están estableciendo las poblaciones de *O. laevigatus* al principio del ciclo del cultivo, pero aceptable con poblaciones bien establecidas (Bielza *et al.*, 2009). La mayoría de las plagas principales y secundarias que serían el objetivo de las aplicaciones de neonicotinoides suelen aparecer a mediados de la temporada, cuando las poblaciones de *O. laevigatus* son altas.

A diferencia de otros insecticidas, los neonicotinoides son activos sistémicamente y pueden ser más selectivos con los enemigos naturales al ser aplicados a través del sistema de riego para su absorción y distribución por toda la planta, reduciendo la exposición a muchos insectos y ácaros no objetivo que no se alimentan de las plantas. De este modo, se supone que son menos perjudiciales para algunos depredadores y parasitoides que las aplicaciones foliares (Prabhaker *et al.*, 2011). Sin embargo, los ACB pueden estar expuestos a los neonicotinoides que son aplicados sistémicamente a través de la cadena alimentaria, al alimentarse de su presa u hospedador. Por otro lado, otros ACB, como *Orius* sp., tienen una dieta zoofitófaga, ya que complementan su dieta, alimentándose de las plantas, ingiriendo savia, polen y néctar, o incluso contenidos de xilema y mesófilo (Cocuzza *et al.*, 1997), lo que los pone en contacto con insecticidas sistémicos. Sin embargo, se espera que la exposición de *Orius* sp. a los neonicotinoides aplicados sistémicamente sea mucho menor que la de las plagas chupadoras, que se alimentan exclusivamente de la savia de las plantas. Por lo tanto, nuestras poblaciones de *O. laevigatus* seleccionadas a los neonicotinoides podrían no verse tan afectadas, cuando estos insecticidas son aplicados por riego a goteo.

La selección para conseguir la resistencia puede tener efectos negativos en los componentes de la aptitud (*fitness*) (Kliot y Ghanim, 2012), aunque no siempre es así (Bielza *et al.*, 2014). Esta desventaja, podría afectar al establecimiento y rendimiento de las poblaciones de ACB resistentes a los insecticidas. Por lo tanto, habrá que hacer estudios adicionales antes de su uso en programas de biocontrol.

La selección de ACB para la resistencia a insecticidas se ha publicado en varios estudios (Pathan *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2013a; Costa *et al.*, 2018). Sin embargo, las selecciones anteriores, se realizaron partiendo de poblaciones de campo que ya exhibían cierto grado de resistencia. Hasta donde sabemos, ésta es la primera vez que han sido seleccionadas poblaciones resistentes de un ACB a partir de distintas poblaciones silvestres que nunca habían sido expuestas a plaguicidas, explotando la variabilidad natural presente en estas.

4.5 CONCLUSIONES

Nuestros resultados han establecido que existe una variación genética en la susceptibilidad a los insecticidas en poblaciones silvestres y comerciales de *O. laevigatus*, y que tal variación puede utilizarse para seleccionar poblaciones con mayor resistencia a los insecticidas, incluso a compuestos altamente tóxicos como los neonicotinoides, imidacloprid y tiametoxam. La resistencia se puede mejorar mediante la selección artificial en condiciones de laboratorio, comenzando con poblaciones que muestran poca o ninguna tolerancia.

Nuestras poblaciones resistentes a neonicotinoides podrían mejorar el control biológico, tomando una adopción más amplia de éste, al permitir aplicaciones puntuales de estos compuestos para controlar plagas principales y secundarias. Por ejemplo, en cultivos de invernadero de hortalizas, imidacloprid o tiametoxam se pueden utilizar para el control de brotes de pulgones o de plagas secundarias como las cochinillas o los mosquitos verdes, y estos plaguicidas no interrumpirían a los ACB claves como *Amblyseius swirskii* (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae) (tolerantes por naturaleza; Kim *et al.*, 2018) y *O. laevigatus* (seleccionados artificialmente).

4.6 BIBLIOGRAFÍA

- Angeli, G., Baldessari, M., Maines, R., Duso, C., 2005. Side-effects of pesticides on the predatory bug *Orius laevigatus* (Heteroptera: Anthocoridae) in the laboratory. *Biocontrol Science and Technology* 15: 745-754.
- Armizade, N., Izadi, H., Jabali, M.A., Zohdi, H., 2014. Evaluation of three neonicotinoid insecticides against the common pistachio psylla, *Agonoscena pistaceae*, and its natural enemies. *Journal of Insect Science* 14: 1-7.
- Bielza, P., 2016. Insecticide resistance in natural enemies. En: Horowitz, A.R., Ishaaya, I., (eds.). *Advances in Insect Control and Resistance*. Springer. Cham, Switzerland, pp. 313-339.
- Bielza, P., Fernández, E., Grávalos, C., Izquierdo, J., 2009. Testing for non-target effects of spiromesifen on *Eretmocerus mundus* and *Orius laevigatus* under greenhouse conditions. *BioControl* 54: 229-236.
- Bielza, P., Quinto, V., Gravalos, C., Abellan, J., Fernandez, E., 2014. Lack of fitness costs of insecticide resistance in the western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology* 101: 499–503.
- Calvo, F.J., Bolckmans, K., Belda, J.E., 2011. Control of *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in cucumber by *Amblyseius swirskii*. *Biocontrol* 56: 185-192.
- Cloyd, R.A., Bethke, J.A., 2011. Impact of neonicotinoid insecticides on natural enemies in greenhouse and interior scape environments. *Pest Management Science* 67: 3-9.
- Cocuzza, G., De Clercq, P., Veire, M., de Cock, A., Degheele, D., Vacante, V., 1997. Reproduction of *Orius laevigatus* and *Orius albidipennis* on pollen and *Ephestia kuehniella* eggs. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 82: 101–104.
- Costa, P.M.G., Torres, J.B., Rondelli, V.M., Lira, R., 2018. Field-evolved resistance to lambda-cyhalothrin in the lady beetle *Eriopis connexa*. *Bulletin of Entomological Research* 108: 380-387.
- Dağlı, F., Bahşi, Ş.Ü., 2009. Topical and residual toxicity of six pesticides to *Orius majusculus*. *Phytoparasitica* 37: 399-405.

- Delbeke, F., Vercruyse, P., Tirry, L., De Clercq, P., Degheele, D., 1997. Toxicity of diflubenzuron, pyriproxyfen, imidacloprid and diafenthiuron to the predatory bug *Orius laevigatus* (Het.: Anthocoridae). *Entomophaga* 42: 349-358.
- Elbert, A., Becker, B., Hartwig, J., Erdelen, C., 1991. Imidacloprid-a new systemic insecticide. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* 44: 113-136.
- Fernández, E., Grávalos, C., Haro, P.J., Cifuentes, D., Bielza, P., 2009. Insecticide resistance status of *Bemisia tabaci* Q-biotype in south-eastern Spain. *Pest Management Science* 65: 885-891.
- Grávalos, C., Fernández, E., Belando, A., Moreno, I., Ros, C., Bielza, P., 2015. Cross-resistance and baseline susceptibility of Mediterranean strains of *Bemisia tabaci* to cyantraniliprole. *Pest Management Science* 71: 1030-1036.
- Guillén, J., Bielza, P., 2015. Cyantraniliprole: a valuable tool for *Frankliniella occidentalis* (Pergande) management. *Pest Management Science* 71: 1068-1074.
- Herrick, N.J., Cloyd, R.A., 2017. Direct and Indirect Effects of Pesticides on the Insidious Flower Bug (Hemiptera: Anthocoridae) under Laboratory Conditions. *Journal of Economic Entomology* 110: 931-940.
- IRAC (2020) The IRAC mode of action classification online. <https://irac-online.org/modes-of-action/>. Accessed 20 June 2020.
- Kim, S.Y., Ahn, H.G., Ha, P.J., Lim, U.T., Lee, J.H., 2018. Toxicities of 26 pesticides against 10 biological control species. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 21(1): 1-8.
- Kliot, A., Ghanim, M., 2012. Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest Management Science* 68: 1431–1437.
- Lommen, S.T., Jong, P.W., Pannebakker, B.A., 2017. It is time to bridge the gap between exploring and exploiting: prospects for utilizing intraspecific genetic variation to optimize arthropods for augmentative pest control-a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 162: 108-123.
- Pathan, A.K., Sayyed, A.H., Aslam, M., Razaq, M., Jilani, G., Saleem, M.A., 2008. Evidence of field evolved resistance to organophosphates and pyrethroids in *Chrysoperla*

- carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). Journal of Economic Entomology 101: 1676-1684.
- Phrabaker, N., Castle, S.J., Naranjo, S.E., Toscano, N.C., Morse, J.G., 2011. Compatibility of Two Systemic Neonicotinoids, Imidacloprid and Thiamethoxam, With Various Natural Enemies of Agricultural Pests. Journal of Economic Entomology 104: 773-781.
- Phrabaker, N., Naranjo, S., Perring, T., Castle, S., 2017. Comparative Toxicities of newer and conventional insecticides: Against four generalist predator species. Journal of Economic Entomology 20: 1-7.
- Rodrigues, A.R., Torres, J.B., Siqueira, H.A., Lacerda, D.P., 2013b. Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance in the predator lady beetle *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae). Biological Control 64(3): 217-224.
- Rodrigues, A.R.S., Ruberson, J.R., Torres, J.B., Siqueira, H.A., Scott, J.G., 2013a. Pyrethroid resistance and its inheritance in a field population of *Hippodamia convergens* (GuérinMénéville) (Coleoptera: Coccinellidae). Pesticide Biochemistry and Physiology 105: 135-143.
- Saeed, R., Razaq, M., Hardy, I.C., 2015. Impact of neonicotinoid seed treatment of cotton on the cotton leafhopper, *Amrasca devastans* (HeGIPtera: Cicadellidae), and its natural enemies. Pest Management Science 72: 1260-1267.
- Sánchez, J.A., Alcázar, A., Lacasa, A., Llamas, A., Bielza, P., Albajes, R., Sekeroglu, E., 2000. Integrated pest management strategies in sweet pepper plastic houses in the Southeast of Spain. Bulletin OILB/SROP 23: 21-30.
- Speranza, S., Colonnelli, E., Garonna, A.P., Laudonia, S., 2014. First record of *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) in Italy. Florida entomologist 97(2): 844-845.
- Sterk, G., Hassan, S.A., Baillod, M., Bakker, F., Bigler, F., Blümel, S., Ogenschütz, H., Boller, E., Bromand, B., Brun, J., Calis, J.N.M., Coremans-Pelseneer, J., Duso, C., Garrido, A., Grove, A., Heimbach, U., Hokkanen, H., Jacas, J., Lewis, G., Moreth, L., Polgar, L., Rovesti, L., Samsøe-Peterson, L., Sauphanor, B., Schaub, L.,

- Stäubli, A., Tuset, J.J., Vainio, A., Van de Veire, M., Viggiani, G., Viñuela, E., and Vogt, H., 1999. Results of seventh joint pesticides testing programme carried out by the IOCB/WPRS Working Group. *Pesticides and Beneficial Organisms*. *Biocontrol* 44: 99-117.
- Tang, F., Sheng-chen, L., Xiang-bo, K., Kai-yun, W., 2007. Studies on Selective Toxicity of Acetamiprid, Imidacloprid and Buprofezin to *Trialeudores vaporariorum* and Two Natural Enemies. *Chinese Journal of Pesticide Science* 1: 0-17.
- Van de Veire, M., Tirry, L., 2003. Side effects of pesticides on four species of beneficials used in IPM in glasshouse vegetable crops: "worst case" laboratory tests. *Pesticides and Beneficial Organisms IOBC/wprs* 26: 41-50.
- Van der Blom, J., Robledo, A., Torres, S., Sanchez, J.A., 2009. Consequences of the wide scale implementation of biological control in greenhouse horticulture in Almeria, Spain. *IOBC/WPRS Bulletin* 49: 9–13.
- Van Lenteren, J.C., Woets, J.V., 1988. Biological and integrated pest control in greenhouses. *Annual Review of Entomology* 33: 239–269.
- Van Lenteren, J.C., Bolckmans, K., Kohl, J., Ravensberg, W.J., Urbaneja. A., 2018. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* 63: 39–59.

5. SELECCIÓN PARA LA RESISTENCIA A PIRETROIDES EN EL DEPREDADOR *Orius laevigatus*

Balanza, V., Mendoza, J.E., Cifuentes, D., Bielza, P., 2021. Selection for resistance to pyrethroids in the predator *Orius laevigatus*. *Pest Management Science* 77(5): 2539-2546. <https://doi.org/10.1002/PS.6288>

5.1 INTRODUCCIÓN

Los programas de gestión integrada de plagas (GIP) basados en el control biológico se han implementado con éxito en muchas áreas de invernadero para controlar las plagas de los cultivos de hortalizas (Calvo *et al.*, 2012; Van Lenteren *et al.*, 2020). El control biológico aumentativo generalmente se dirige a plagas clave, como la mosca blanca y trips, porque sus poblaciones son más estables y los agentes de control biológico (ACB) mantienen su población durante toda la temporada de cultivo. Las plagas principales, como pulgones, ácaros y orugas, generalmente se controlan por medios no químicos, incluido el control biológico. Sin embargo, como se ha comentado en el capítulo 4, sus poblaciones a menudo se vuelven incontrolables y los productores deben recurrir al control químico, utilizando compuestos sintéticos o naturales (Bielza *et al.*, 2020). Por ejemplo, varias plagas secundarias de cultivos de hortalizas, como *Nezara viridula* (Linnaeus) (Hemiptera: Pentatomidae) y *Empoasca* sp. (Hemiptera: Cicadellidae), generalmente se rocían con piretroides, que son muy tóxicos para los insectos beneficiosos (Bielza *et al.*, 2020).

Por otra parte, en los cultivos ecológicos existe un número reducido de insecticidas disponibles para controlar las plagas y muchos de estos son relativamente ineficaces a menos que se usen repetidamente como, por ejemplo, los extractos de plantas. El uso selectivo y repetido de estos insecticidas puede tener un gran impacto en los enemigos naturales, incluso las piretrinas naturales son marcadamente tóxicas para la mayoría de los ACB (Biondi *et al.*, 2012). Es importante tener en cuenta estos factores para que el control biológico aumentativo tenga éxito, ya que se emplea tanto en cultivos que utilizan GIP como en cultivos ecológicos.

Los piretroides son un grupo de plaguicidas sintéticos desarrollados para controlar las poblaciones de insectos plaga. Este grupo surgió para sustituir a las piretrinas naturales obtenidas del crisantemo, que se venían usando desde 1850 (Wilkinson, 1976). El término «*pyrethrum*» se refiere al extracto de oleoresina de las flores secas y pulverizadas pertenecientes a las especies *Chrysanthemum cinerariaefolium* y *Chrysanthemum roseum*. Estas flores, a lo largo de los años se han seleccionado por diferentes técnicas de hibridación y cultivos celulares para la obtención de distintos tipos de piretrinas y así obtener un rendimiento mayor (Taplin y Meinking, 1990). Los piretroides, poseen la misma estructura que las piretrinas, pero se obtienen por síntesis química modificando su estructura básica para incrementar su estabilidad en el ambiente natural (Todd *et al.*, 2003). Según su modo de acción (moduladores del canal del sodio, acción nerviosa), los piretroides y piretrinas se encuentran clasificados en el grupo 3 de IRAC (2020).

El lambda-cihalotrin es uno de los insecticidas piretroides más usados contra las plagas de lepidópteros y coleópteros, actúa por contacto y por ingestión y posee un elevado efecto de choque y una buena persistencia (Ruberson y Tillman, 1999). El inconveniente que tiene es que es tóxico para los enemigos naturales, produciéndoles cambios de comportamiento y efectos subletales (Ferreira *et al.*, 2013).

Los heterópteros omnívoros son depredadores que se liberan en grandes cantidades en cultivos en los que se aplican programas de control biológico aumentativo. El depredador *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae), como se ha explicado en capítulos anteriores, es muy eficaz en el control de pequeños insectos, como los trips, y es un pilar fundamental del gran éxito del control biológico en cultivos de hortalizas bajo invernadero (Sánchez *et al.*, 2000; Mendoza *et al.*, 2020). Sin embargo, *O. laevigatus*, como la mayoría de los enemigos naturales, es muy susceptible a las piretrinas naturales y a los piretroides (Stuebaker y Kring, 2003; Angeli *et al.*, 2005). Estos compuestos se utilizan bastante en cultivos ecológicos y GIP para hacer frente a varias plagas, lo que dificulta el establecimiento y reproducción de los ACB (Costa *et al.*, 2018; Ruberson *et al.*, 2019). Por lo tanto, la selección de cepas de *O. laevigatus* resistentes a piretrinas y piretroides mejoraría la robustez de los protocolos de

biocontrol, que es un requisito urgente para una adopción más amplia del control biológico.

Aunque no es un fenómeno tan extendido como en las especies de plagas, también se ha observado que existe resistencia a insecticidas en varios ACB, como ácaros depredadores, insectos depredadores y parasitoides (Bielza, 2016). Las mariquitas y crisopas son los insectos depredadores en los que más se ha estudiado la resistencia desarrollada a insecticidas en el campo y en el laboratorio (Costa *et al.*, 2018; Ruberson *et al.*, 2019). Sin embargo, no se han observado casos del desarrollo de resistencia en el campo en ningún depredador heteróptero a pesar de su amplia liberación en cultivos de hortalizas (Bielza, 2016). Esto es muy interesante porque estos depredadores son omnívoros, se alimentan también de la planta, y este carácter debería facilitar el desarrollo de resistencias. Por otro lado, se cree que, en general, los enemigos naturales desarrollan resistencia con menos facilidad que las plagas debido a la falta de alimento (presa) después del tratamiento insecticida, ya que hace que éstos no sobrevivan en el cultivo (Tabashnik y Johnson, 1999). Sin embargo, algunos depredadores zoofitófagos, como los míridos y los antocóridos, son capaces de sobrevivir y reproducirse alimentándose de material vegetal, como el polen (Mendoza *et al.*, 2020). Por lo tanto, los depredadores omnívoros deberían ser más propensos a desarrollar resistencia a los insecticidas que los depredadores especializados, como las mariquitas y las crisopas, porque serían capaces de sobrevivir más tiempo alimentándose de la planta. Una explicación que se puede dar a esta carencia de resistencia es que, los depredadores heterópteros se producen comercialmente en biofábricas y se liberan en cultivos estacionales o temporales, como los cultivos de hortalizas (Bielza, 2016). Por lo tanto, en cada cultivo se sueltan individuos criados en masa que no han estado expuestos previamente a insecticidas. La falta de continuidad del cultivo y la liberación de individuos no seleccionados pueden diluir la presión de selección lo suficiente como para evitar la aparición de la resistencia. Debido a su continua exposición a insecticidas, en algunas especies de mariquitas se han desarrollado poblaciones resistentes, pero en otras no, lo que sugiere que puede haber un trasfondo genético de la especie, y luego la variabilidad genética en la susceptibilidad, tiene un papel fundamental (Rodríguez *et al.*, 2013). Por tanto, el trasfondo genético y la falta de variabilidad genética de la especie

podrían ser una explicación de la ausencia de resistencia observada en depredadores heterópteros

El objetivo de este trabajo fue, en primer lugar, explorar la variabilidad intraespecífica en la susceptibilidad a los piretroides en poblaciones silvestres y comerciales de *O. laevigatus*, como se ha hecho en especies de plagas (Grávalos *et al.*, 2015; Guillén y Bielza, 2015), en los capítulos 4 y 6 de esta tesis y otras publicaciones de nuestro grupo (Balanza *et al.*, 2019, 2021). En segundo lugar, seleccionar una población resistente a piretroides y estudiar: (I) la resistencia en diferentes etapas de desarrollo, (II) el patrón de resistencia cruzada con piretroides y otros compuestos, y (III) la posible implicación de los mecanismos de desintoxicación.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Insectos

Entre 2012 y 2019 se muestrearon 35 poblaciones silvestres de *O. laevigatus* (ver Tabla 3.1 y Figura 3.2 en materiales y métodos generales). Además, se utilizaron como referencia las cuatro poblaciones comerciales descritas en materiales y métodos generales (apartado 3.1.2). Las poblaciones se criaron según se detalla en materiales y métodos generales (apartado 3.2). Además, se reprodujo en el laboratorio una población procedente de una mezcla de todas las poblaciones silvestres. Esta población (Mezcla), se mantuvo durante 10 generaciones antes de realizar los bioensayos y se usó también como referencia.

5.2.2 Insecticidas

El insecticida piretroide utilizado en este estudio fue una formulación comercial de lambda-cihalotrín (Karate[®], Syngenta Crop Protection AG). Para bioensayos de resistencia cruzada, los insecticidas utilizados fueron: imidacloprid (Confidor[®], Bayer CropScience); spinosad (Spintor[®], Dow AgroSciences Ibérica); tiametoxam (Actara[®], Syngenta Crop Protection AG); emamectina benzoato (Affirm[®], Syngenta Crop Protection AG); indoxacarb (Steward[®], Dupont Ibérica); cipermetrina (Ralbi[®] 10, Exclusivas Sarabia S.A.); deltametrina (Audace[®] EC, FMC Agricultural Solutions); acrinatrín (Rufast[®] Avance, FMC Agricultural Solutions); y piretrinas naturales

(Breaker®Max, Certis Europe España). Las formulaciones de los insecticidas se disolvieron en agua destilada más Tween 80 (0,5%) para obtener diferentes concentraciones de insecticida, tal y como se detalla en materiales y métodos generales (apartado 3.4.1).

5.2.3 Variación entre poblaciones

Todas las poblaciones silvestres y comerciales se bioensayaron con lambda-cihalotrín. Se realizaron bioensayos de toxicidad según se detalla en el apartado 3.4.1 de materiales y métodos generales. Las concentraciones de lambda-cihalotrín utilizadas para los bioensayos variaron de 0,3 a 100 mg L⁻¹, dependiendo de la tolerancia al insecticida de cada una de las poblaciones.

5.2.4 Selección para resistencia

Para seleccionar una población resistente a lambda-cihalotrín, se utilizaron todas las poblaciones silvestres y comerciales. Cada población fue inicialmente seleccionada con 100 mg L⁻¹ de lambda-cihalotrín, que corresponde a una mortalidad de alrededor del 80% según la línea de base, utilizando el bioensayo descrito anteriormente. Los bioensayos de selección se realizaron tal y como se describen en el apartado 3.4.2 de materiales y métodos generales. Los supervivientes de cada población se mezclaron para constituir la población RLCH1, que fue expuesta a concentraciones crecientes de insecticida hasta llegar a la población seleccionada RLCH18, después de 18 ciclos de selección. La concentración más alta utilizada fue 3000 mg L⁻¹, y esta población se seleccionó adicionalmente usando 31 ciclos de selección más, para obtener la población RLCH49.

5.2.5 Caracterización de la resistencia

La población seleccionada RLCH18 se estudió más a fondo para caracterizar la expresión de resistencia en los diferentes estadios, la resistencia cruzada y posibles mecanismos de resistencia. La resistencia a lambda-cihalotrín se evaluó del primer (N1) al quinto (N5) estadio ninfal de la población RLCH18 y se comparó con la población de referencia (Mezcla). Se evaluó la resistencia cruzada a otros piretroides: cipermetrina (30-1000 mg L⁻¹), deltametrina (10-300 mg L⁻¹) y acrinatrín (30-1000 mg L⁻¹), piretrinas naturales (30-10000 mg L⁻¹) y otros insecticidas, tales como, imidacloprid (10-300 mg L⁻¹), tiametoxam

(1-100 mg L⁻¹), spinosad (10-3000 mg L⁻¹), emamectina benzoato (10-300 mg L⁻¹) e indoxacarb (30-1000 mg L⁻¹). Todos los insecticidas se evaluaron en la población resistente RLCH18 y la población Mezcla. Se estudió el efecto del sinergista butóxido de piperonilo (PBO) utilizando el método de bioensayo descrito en el apartado 3.4.2 de materiales y métodos generales, pero exponiendo a los adultos a 300 mg L⁻¹ de PBO, 24 horas antes del tratamiento con insecticida.

5.2.6 Análisis de datos

Se calcularon las concentraciones letales medias (CL₅₀) y los límites fiduciales al 95% de confianza (análisis probit), la mortalidad a la dosis de campo (MDC), los factores de resistencia (FR₅₀) y las clases de toxicidad (Sterk *et al.*, 1999), tal y como se explica en el apartado 3.5 de materiales y métodos generales.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Variación entre poblaciones

Los datos de toxicidad de lambda-cihalotrín en 35 poblaciones silvestres de *O. laevigatus* de España, Italia y Grecia y cuatro comerciales se muestran en la Tabla 5.1. Los valores de CL₅₀ variaron de 1,6 (Policoro) a 77,0 mg L⁻¹ (Portonovo), una variación de 48,1 veces entre las poblaciones menos y más tolerantes. El valor CL₅₀ para la línea de base fue de 14,6 mg L⁻¹, cerca de la dosis máxima de campo de este compuesto (20 mg L⁻¹). La mortalidad a la dosis de campo (MDC) de todas las poblaciones oscilaron entre el 25,8% y el 98,3%, lo que se traduce en toxicidad de clase 1 (inofensivo) para dos poblaciones, clase 2 (levemente dañino) para 35 poblaciones, y clase 3 (moderadamente dañino) para dos poblaciones (Sterk *et al.*, 1999). La MDC fue > 50% en 25 de las 39 poblaciones (64% del total de las poblaciones), similar a la mortalidad obtenida para la línea de base (56,5%). Estos resultados confirman que el piretroide lambda-cihalotrín es perjudicial para *O. laevigatus*, pero existe una variación significativa entre las poblaciones, incluso entre las comerciales (39,9-78,3% en MDC).

Tabla 5.1. Datos de susceptibilidad a lambda-cihalotrin en poblaciones de *Orius laevigatus*.

Origen	Poblaciones	Pendiente (± SE)	CL ₅₀ mg L ⁻¹ (95% LF) ^a	FR ₅₀ ^b	MDC (%) ^c	Clase ^d
España (Noroeste)	Portonovo	0,9 ± 0,2	77,0 (39,1-374,8)	48,1	25,8	1
	Corrubedo	1,3 ± 0,2	15,1 (9,5-23,5)	9,4	54,4	2
	Moreira	1,1 ± 0,2	5,8 (0,4-14,2)	3,6	72,3	2
	Catadoiro	0,7 ± 0,2	5,1 (0,6-12,5)	3,2	65,9	2
España (Sureste)	Perín	1,3 ± 0,3	38,7 (18,1-128,6)	24,2	35,4	2
	Cabo de Palos	1,0 ± 0,2	29,6 (16,0-66,8)	18,5	42,6	2
	La Zenia	0,8 ± 0,2	26,3 (12,1-70,8)	16,4	45,6	2
	Cabo de Gata	2,1 ± 0,5	10,4 (2,1-19,1)	6,5	72,3	2
	Cuevas de Almanzora	0,9 ± 0,2	34,5 (15,7-98,5)	21,6	41,1	2
	Hellín	1,9 ± 0,4	4,3 (1,8-6,4)	2,7	89,9	3
	Puerto de la Mora	1,2 ± 0,3	39,1 (18,8-88,3)	24,4	37,1	2
	Cazorla	1,1 ± 0,2	14,8 (7,9-25,5)	9,3	56,0	2
España (Suroeste)	Órgiva	1,6 ± 0,3	27,6 (10,7-50,5)	17,3	37,9	2
	Islantilla	1,3 ± 0,3	15,1 (6,2-27,2)	9,4	56,4	2
España (Noreste)	Carmona	1,5 ± 0,3	7,3 (1,7-18,6)	4,6	74,9	2
	Cabrils	1,8 ± 0,3	11,9 (7,3-17,5)	7,4	62,2	2
	Teruel	1,3 ± 0,3	14,5 (3,2-29,2)	9,1	54,8	2
España (Centro)	Logroño	1,6 ± 0,4	7,4 (1,1-13,5)	4,6	75,5	2
	Méntrida	1,3 ± 0,3	6,3 (2,3-11,1)	3,9	75,5	2
	Alcobendas	1,0 ± 0,3	28,3 (11,3-69,5)	17,7	40,9	2
España (Oeste)	Ruidera	1,8 ± 0,5	17,4 (5,0-28,9)	10,9	55,6	2
	Guadalupe	3,2 ± 0,7	12,4 (6,5-18,0)	7,8	74,9	2
	Arroyo de San Serván	0,9 ± 0,3	25,4 (9,8-62,1)	15,9	42,9	2
Italia (Sicilia)	Mérida	2,8 ± 0,6	12,9 (7,8-17,8)	8,1	66,7	2
	Acate	1,1 ± 0,2	13,9 (5,0-30,4)	8,7	56,4	2
	Cefalú	1,0 ± 0,2	5,0 (1,6-9,4)	3,1	71,6	2
Italia (Sur)	Palermo	1,4 ± 0,2	15,1 (7,7-26,5)	9,4	58,0	2
	Nápoles	1,3 ± 0,3	53,9 (29,9-122,2)	33,7	29,2	1
	Capodichino	0,8 ± 0,2	13,3 (1,22-30,9)	8,3	56,4	2
	Vesubio	2,1 ± 0,3	33,4 (22,1-47,2)	20,9	30,6	2
Grecia (Creta)	Policoro	1,9 ± 0,7	1,6 (0,0-3,1)	1,0	98,3	3
	Samaria	1,5 ± 0,3	14,0 (3,1-49,6)	8,8	59,6	2
Grecia	Rethymno	1,4 ± 0,3	12,4 (5,9-20,8)	7,8	57,6	2
	Atenas	1,3 ± 0,3	12,8 (4,3-22,6)	8,0	60,3	2
Bélgica Comercial	Westerlo	1,0 ± 0,2	44,1 (24,2-75,3)	27,6	32,2	2
	Bioline	1,2 ± 0,3	9,1 (5,1-16,5)	5,7	66,6	2
	Biobest	1,9 ± 0,4	7,5 (3,2-12,7)	4,7	78,3	2
	Agrobío	2,1 ± 0,5	20,8 (6,7-36,4)	13,0	46,9	2
	Koppert	2,8 ± 0,7	26,6 (11,2-40,3)	16,6	39,9	2
	Línea base	1,1 ± 0,0	14,6 (11,9-17,5)	9,1	56,5	2

^a Concentración de insecticida que mata al 50% de los individuos y sus límites fiduciales al 95%. Todos los análisis se ajustaron al modelo probit ($p > 0,05$), excepto el de referencia debido a la variación entre poblaciones.

^b Factor de resistencia = CL₅₀ de cada población / CL₅₀ de la población de referencia susceptible.

^c Mortalidad a la tasa máxima de campo (20 mg L⁻¹).

^d Clases de toxicidad: clase 1 (inofensivo): efecto < 30%; clase 2 (ligeramente dañino): efecto del 30 al 79%; clase 3 (moderadamente dañino): efecto del 80 al 99%; clase 4 (dañino): efecto > 99%.

5.3.2 Selección para la resistencia

Después de 18 ciclos de selección, aumentó significativamente la resistencia a lambda-cihalotrín (CL_{50} = 331,7 mg L⁻¹), 14 veces en comparación con la población de referencia, 23 veces en comparación con la línea base y 207 veces en comparación con la población más susceptible (Tablas 5.1 y 5.2). Después de 31 ciclos de selección adicionales, también se obtuvo una resistencia significativamente mayor (CL_{50} = 1059,9 mg L⁻¹), 43 veces en comparación con la población de referencia, 73 veces en comparación con la línea base y 662 veces en comparación con la población más susceptible (Tablas 5.1 y 5.2). Las MDC en las poblaciones resistentes RLCH18 y RLCH49 fueron 1,9% y 0,3%, respectivamente, ambos casos resultaron ser clase de toxicidad 1 (inofensivo).

Tabla 5.2. Datos de susceptibilidad en adultos y estadios ninfales de la población susceptible de referencia (Mezcla) y de las poblaciones seleccionadas RLCH18 y RLCH49 de *Orius laevigatus*.

Población	Estadio	Pendiente (± SE)	CL ₅₀ mg L ⁻¹ (95% LF) ^a	FR ₅₀ ^b	MDC (%) ^c	Clase ^d
Mezcla	Ninfa 1	1,4 ± 0,3	1,1 (0,3-1,9)	1	96,3	3
	Ninfa 2	1,2 ± 0,3	3,1 (1,2-6,6)	1	83,8	3
	Ninfa 3	2,1 ± 0,4	3,7 (2,1-5,3)	1	94,5	3
	Ninfa 4	1,3 ± 0,3	64,6 (24,6-113,8)	1	24,2	1
	Ninfa 5	0,7 ± 0,2	132,6 (50,5-280,7)	1	26,4	1
	Adultos	1,5 ± 0,4	24,5 (8,1-49,3)	1	44,7	2
RLCH18	Ninfa 1	4,2 ± 1,4	16,2 (8,9-20,3)	14,7	60,4	2
	Ninfa 2	0,9 ± 0,2	37,3 (19,5-70,7)	12,0	39,9	2
	Ninfa 3	1,2 ± 0,2	113,9 (54,1-199,1)	30,8	18,1	1
	Ninfa 4	1,7 ± 0,2	355,3 (217,9-506,1)	5,5	1,6	1
	Ninfa 5	1,8 ± 0,5	415,5 (165,0-652,9)	3,1	0,7	1
	Adultos	1,7 ± 0,3	331,7 (167,7-528,2)	13,5	1,9	1
RLCH49	Adultos	1,6 ± 0,3	1059,9 (636,4-1549,7)	43,2	0,3	1

^a Concentración de insecticida que mata al 50% de los individuos y sus límites fiduciales al 95%. Todos los análisis se ajustaron al modelo probit ($p > 0,05$).

^b Factor de resistencia= CL_{50} de cada población/ CL_{50} de la población de referencia susceptible.

^c Mortalidad a la tasa máxima de campo (20 mg L⁻¹).

^d Clases de toxicidad: clase 1 (inofensivo): efecto < 30%; clase 2 (ligeramente dañino): efecto del 30 al 79%; clase 3 (moderadamente dañino): efecto del 80 al 99%; clase 4 (dañino): efecto > 99%.

5.3.3 Caracterización de la resistencia

Los adultos de la población de referencia (Mezcla) mostraron susceptibilidad a lambda-cihalotrín (CL_{50} = 24,5 mg L⁻¹), que fue similar a la de la línea base (14,6 mg L⁻¹) (Tabla 5.2) Los estadios ninfales N4 y N5 fueron más tolerantes que los adultos, con N5 mostrando diferencias significativas. De hecho, las MDC fueron bajas para N4 y N5,

calificándolos en la clase 1 (inofensivo), en comparación con la clase 2 (ligeramente perjudicial) para los adultos y clase 3 (moderadamente dañina) para los estadios más jóvenes N1 a N3.

La población RLCH18 seleccionada mostró una mayor resistencia a lambda-cihalotrin que la población de referencia, en todos los estadios de vida (Tabla 5.2). Los FR₅₀ variaron de 5,5 en N4 a 30,8 en N3. Sin embargo, los estadios más resistentes según los valores de CL₅₀ fueron N4 y N5. En efecto, las MDC fueron muy bajas para los últimos estadios, con unos valores de 1,6% en N4, 0,7% en N5 y 1,9% en adultos, con clases de toxicidad de 1 (inofensivo) desde N3 hasta adulto y 2 (levemente dañino) para N1 y N2.

Tabla 5.3. Resistencia cruzada con diferentes insecticidas en la población susceptible de referencia (Mezcla) y la población seleccionada RLCH18 de *Orius laevigatus*.

Población	Insecticida	Pendiente (± SE)	CL ₅₀ mg L ⁻¹ (95% LF) ^a	MDC (%) ^b	Clase ^c
Mezcla	Imidacloprid	1,1 ± 0,2	71,8 (37,5-132,5)	64,7	2
	Spinosad	1,4 ± 0,3	76,5 (30,2-132,6)	60,6	2
	Tiametoxam	1,7 ± 0,4	1,1 (0,5-1,6)	100,0	4
	Emamectina	2,5 ± 0,3	2,6 (0,2-5,4)	87,4	3
	Indoxacarb	2,2 ± 0,4	64,4 (38,6-92,7)	47,3	2
	Cipermetrina	1,3 ± 0,3	5,6 (2,1-9,8)	95,3	3
	Deltametrina	0,6 ± 0,1	14,6 (5,2-30,9)	48,2	2
	Acrinatrín	0,8 ± 0,2	36,2 (12,8-208,0)	56,8	2
	Piretrina natural	1,2 ± 0,4	2104,7 (1028,7-8603,1)	3,7	1
RLCH18	Imidacloprid	2,5 ± 0,6	91,5 (31,3-158,1)	70,9	2
	Spinosad	1,7 ± 0,3	318,1 (164,2-500,6)	22,3	1
	Tiametoxam	1,2 ± 0,2	3,36 (1,11-6,7)	96,6	3
	Emamectina	1,3 ± 0,3	24,6 (9,8-43,2)	38,9	2
	Indoxacarb	1,2 ± 0,2	122,2 (62,8-203,2)	36,6	2
	Cipermetrina	0,8 ± 0,2	350,2 (185,9 -975,4)	31,9	2
	Deltametrina	1,0 ± 0,2	113,1(53,9-455,5)	16,5	1
	Acrinatrín	0,7 ± 0,2	48,9 (8,1-102,5)	52,8	2
	Piretrina natural	-	>2000	<3	1

^a Concentración de insecticida que mata al 50% de los individuos y sus límites fiduciales al 95%. Todos los análisis se ajustaron al modelo probit ($p > 0,05$).

^b Mortalidad a la dosis de campo máxima (imidacloprid:150 mg L⁻¹; spinosad: 120 mg L⁻¹; tiametoxam:100 mg L⁻¹; emamectina: 15 mg L⁻¹; indoxacarb: 60 mg L⁻¹; cipermetrina:100 mg L⁻¹; deltametrina: 12,5 mg L⁻¹; acrinatrín: 60 mg L⁻¹; piretrina natural:80 mg L⁻¹)

^c Clases de toxicidad: clase 1 (inofensivo): efecto < 30%; clase 2 (ligeramente dañino): efecto del 30 al 79%; clase 3 (moderadamente dañino): efecto del 80 al 99%; clase 4 (dañino): efecto > 99%.

Se obtuvo resistencia cruzada a los piretroides cipermetrina y deltametrina, pero no a acrinatrín, en la población resistente RLCH18 (Tabla 5.3). Las piretrinas naturales no mostraron eficacia contra las poblaciones resistente y de referencia, con valores de $CL_{50} > 2000 \text{ mg L}^{-1}$, cuando su dosis máxima de campo es 80 mg L^{-1} . La población resistente también mostró resistencia cruzada al spinosad y a emamectina benzoato, insecticidas con diferentes modos de acción. Sin embargo, no se encontró resistencia cruzada para los neonicotinoides e indoxacarb.

La aplicación de una concentración de PBO de 300 mg L^{-1} no resultó en diferencias significativas en la tolerancia a lambda-cihalotrín entre la población de referencia (Mezcla) y la población resistente RLCH18 (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Datos de susceptibilidad para lambda-cihalotrín solo y en mezcla con PBO en adultos de la población susceptible de referencia (Mezcla) y la población seleccionada RLCH18 de *Orius laevigatus*.

Población	Tratamiento	Pendiente (\pm SE)	$CL_{50} \text{ mg L}^{-1}$ (95% LF) ^a
Mezcla	Lambda-cihalotrín	$1,5 \pm 0,3$	4,4 (1,55-7,76)
	+ PBO (300 mg L^{-1})	$1,7 \pm 0,4$	5,4 (2,54-8,59)
RLCH18	Lambda-cihalotrín	$1,4 \pm 0,4$	264,8 (102,9-513,9)
	+ PBO (300 mg L^{-1})	$1,1 \pm 0,3$	164,1 (70,6-306,5)

^a Concentración de insecticida que mata al 50% de los individuos y sus límites fiduciales al 95%. Todos los análisis se ajustaron al modelo probit ($p > 0,05$).

5.4 DISCUSIÓN

En cualquier programa de GIP es siempre deseable que haya una buena compatibilidad con los plaguicidas, ya sean sintéticos o naturales. Se ha observado resistencia a los insecticidas en insectos depredadores como los coccinélidos y las crisopas, que son los más estudiados, pero no se han visto casos de resistencia en el campo en ningún depredador heteróptero (Bielza, 2016). Los depredadores que se encuentran de manera natural en los cultivos (coccinélidos y crisopas), han estado expuestos históricamente a los insecticidas, lo que ha dado lugar a poblaciones resistentes en cultivos al aire libre con un alto uso de insecticidas, pero no en cultivos ecológicos o aquellos con poca dependencia de los insecticidas (Ruberson *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2018). Además, algunas especies de mariquitas, como *Eriopis connexa* (Hermer) (Coleoptera: Coccinellidae) y *Hippodamia convergens* (Guérin-Méneville) (Coleoptera: Coccinellidae)

se ha visto que desarrollan resistencia mientras que otros igualmente expuestos a los insecticidas, como *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus) (Coleoptera: Cicindelidae) no lo han hecho (Rodrigues *et al.*, 2013). Por tanto, la predisposición genética de la especie juega un papel clave, permitiendo que la variabilidad genética en la susceptibilidad sea seleccionada bajo la presión de los insecticidas.

Encontramos una variación significativa en la susceptibilidad a los piretroides en poblaciones silvestres del depredador *O. laevigatus*. Estas poblaciones se recogieron en hábitats naturales, sin o improbable contacto con insecticidas. Esta variación (48 veces) podría dar lugar a una mayor selección si se expusiera a una presión de selección como se confirmó posteriormente con la selección artificial. De hecho, varias poblaciones, incluidas las comerciales, mostraron bajas mortalidades a las dosis de campo. En el capítulo 4 también se observó una variación significativa en susceptibilidad a los neonicotinoides en *O. laevigatus*, y se logró la selección de la resistencia (Balanza *et al.*, 2019). En consecuencia, nuestros resultados confirman la existencia de antecedentes genéticos y variabilidad que permitirían la evolución de la resistencia en las poblaciones de *O. laevigatus* cuando se exponen a insecticidas en los cultivos. Por lo tanto, nuestros hallazgos apoyan la hipótesis de que la falta de resistencia en campo en algunos ACB puede estar basada en la falta de presión continua de selección durante varias generaciones debido a la liberación (una o más) cada temporada de nuevos individuos criados en masa y producidos en biofábricas y nunca expuestos a insecticidas (Bielza, 2016). En nuestra opinión, ésta podría ser la principal razón de la falta de casos de resistencia a los insecticidas en los ACB que son utilizados aumentativamente, ya que son liberados cada temporada de cultivo y no se da lugar a una exposición constante a los insecticidas.

5.4.1 Variación entre poblaciones

Los piretroides se utilizan normalmente para controlar importantes plagas en muchos cultivos, pero su amplio espectro de actividad también implica una alta toxicidad para la mayoría de los insectos beneficiosos, incluidas las especies de *Orius* (Stuedebaker y Kring, 2003; Angeli *et al.*, 2005). Se ha comprobado que lambda-cihalotrin es muy tóxico para *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae) en ensayos de campo, de invernadero y de laboratorio, con mortalidades siempre >95% (Stuedebaker y Kring, 2003). Nuestros

resultados mostraron mortalidades más bajas para la máxima dosis de campo en todas las poblaciones silvestres y comerciales de *O. laevigatus*, con sólo una población que mostraba una mortalidad > 95%, y 14 poblaciones con una mortalidad <50%. Las diferencias pueden atribuirse a una distinta metodología del bioensayo porque Studebaker y Kring (2003) expusieron a los individuos a residuos secos en placas de Petri de vidrio (una superficie inerte), mientras que nosotros utilizamos residuos secos en vainas de judías. Del mismo modo, los mismos autores encontraron el indoxacarb muy tóxico para *O. laevigatus* (Studebaker y Kring, 2003), pero otro estudio clasificó el indoxacarb como inofensivo cuando se expone en hojas de tomate (Biondi *et al.*, 2012). Los efectos de los plaguicidas, y en particular los piretroides, son conocidos por ser más tóxicos en superficies inertes que en material vegetal porque las enzimas de las plantas pueden afectar a la toxicidad de los insecticidas y pueden ser adsorbidos en la cutícula de la planta reduciendo la exposición (Desneux *et al.*, 2005, 2006). Del mismo modo, el piretroide ciflutrina mostró una toxicidad intermedia en *O. insidiosus*, con mortalidades del 30-60% cuando se expuso a plantas tratadas y del 28-44% por ingestión (Elzen *et al.*, 1998; Elzen, 2001). Sin embargo, otros piretroides como la bifentrina fueron muy tóxicos (100% de mortalidad) para *O. laevigatus* en ensayos de semicampo y de campo a 30 mg L⁻¹, así como la deltametrina en pruebas de laboratorio a 14 mg L⁻¹ (Van de Veire *et al.*, 2002; Angeli *et al.*, 2005). El piretroide bifentrina fue muy tóxico para *O. insidiosus*, pero la fenpropatrina mostró una toxicidad menor (Phrabaker *et al.*, 2017). En otro estudio, la bifentrina y la deltametrina dieron lugar a valores CL₅₀ similares (0,21-0,25 mg L⁻¹) en *O. insidiosus* (Fernandes *et al.*, 2016).

Sin embargo, todos los estudios citados utilizaron una sola población para evaluar la toxicidad de los insecticidas en diferentes especies de *Orius*, como es habitual en los estudios que se hacen para la mayoría de los ACB (Bielza *et al.*, 2009), y no tuvieron en cuenta la variabilidad intraespecífica de la susceptibilidad entre las poblaciones de una misma especie (Roush *et al.*, 1990; Balanza *et al.*, 2019). Además, se ha insinuado que la consanguinidad y la cría prolongada en laboratorio influyen en los resultados de las pruebas toxicológicas debido a la disminución de la variabilidad genética (De Clercq *et al.*, 1998). En el capítulo 4, se encontró una variabilidad genética significativa en la susceptibilidad a los neonicotinoides en poblaciones silvestres y comerciales de *O.*

laevigatus (Balanza *et al.*, 2019). Nuestros resultados confirman la importancia de utilizar varias poblaciones de una especie determinada para evaluar con precisión los efectos secundarios de un plaguicida en un ACB. En este trabajo, diferentes poblaciones de la misma especie, *O. laevigatus*, dieron lugar a MDC de lambda-cihalotrín del 26-98%, lo que implicarían impactos muy diferentes en el campo después del tratamiento.

5.4.2 Selección de la resistencia

La resistencia a los insecticidas es un rasgo muy deseable en los enemigos naturales porque permite una mejor integración del control biológico con los compuestos sintéticos y naturales aplicados para manejar ciertas plagas, especialmente los brotes de plagas secundarias. Hemos seleccionado con éxito una población de *O. laevigatus* altamente resistente a los piretroides, que son ampliamente utilizados para controlar gran variedad de plagas. Además, dicha resistencia se expresó en todos los estadios, lo que aumentaría la resistencia de toda la población presente en el cultivo frente a una aplicación de piretroides. El nivel de resistencia alcanzado puede ser suficiente para permitir la supervivencia de adultos y ninfas de *O. laevigatus* expuestos a la dosis de campo de varios piretroides, mostrando incluso resistencia cruzada a otros insecticidas como el spinosad y la emamectina benzoato. La resistencia a los piretroides es especialmente interesante en *O. laevigatus* porque los piretroides se dirigen a plagas que no son controladas por este depredador.

La selección para la resistencia a los piretroides se ha llevado a cabo en otros ACB, como las mariquitas y las crisopas (Pathan *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2018). Sin embargo, esas selecciones parten de poblaciones recogidas en cultivos, que ya mostraban una evolución de la resistencia en el campo. Como se puede ver en el capítulo 4, igual que para la resistencia a los neonicotinoides (Balanza *et al.*, 2019), logramos la resistencia a los piretroides aprovechando las variaciones naturales de tolerancia presentes en las poblaciones silvestres. La selección de la resistencia, especialmente las realizadas en el laboratorio, puede tener efectos negativos sobre la aptitud (*fitness*), afectando al rendimiento en campo de poblaciones de ACB resistentes a los insecticidas. Además, después de la liberación de los individuos resistentes, la resistencia puede no ser lo suficientemente estable como para persistir a lo largo de la

temporada de cultivo. Por lo tanto, es necesario la realización de más estudios antes de utilizar en el campo individuos resistentes en programas de biocontrol.

5.4.3 Resistencia cruzada

La población RLCH18, seleccionada por su resistencia a lambda-cihalotrín mostró resistencia cruzada a los piretroides cipermetrina y deltametrina, pero no al acrinatrín. Este último acaricida-insecticida es también es muy eficaz contra algunas plagas que son resistentes a otros piretroides, como los trips y los ácaros (Bielza *et al.*, 2008). Una población del depredador *E. connexa* resistente a lambda-cihalotrín también mostró resistencia cruzada a otros piretroides (Torres *et al.*, 2015). La población RLCH18, resistente a lambda-cihalotrín, también mostró resistencia a compuestos de otros grupos químicos, como el spinosad y la emamectina benzoato, pero no a los neonicotinoides ni al indoxacarb. Esta resistencia cruzada entre compuestos con diferentes modos de acción sugiere la participación de enzimas de desintoxicación. Sin embargo, el inhibidor de las monooxigenasas P450 no fue capaz de restaurar la tolerancia a lambda-cihalotrín en la población resistente.

5.4.4 Efecto del insecticida en los estadios ninfales

El efecto global de un insecticida sobre una población de ACB dependerá del impacto en los diferentes estadios de desarrollo, que pueden mostrar una susceptibilidad distinta a los insecticidas (Prabhaker *et al.*, 2017). Tanto en nuestras poblaciones de referencia, como en las poblaciones resistentes, se observa un aumento progresivo de la tolerancia a lambda-cihalotrín desde el primer al quinto estadio ninfal, con una ligera disminución en el adulto. Del mismo modo, el carbamato pirimicarb fue perjudicial para las ninfas del primer estadio de *O. laevigatus*, pero inofensivo para las ninfas del cuarto estadio y sólo ligeramente dañino o inofensivo para los adultos (Van de Veire *et al.*, 2002; Angeli *et al.*, 2005). Esta tendencia también se observó en el depredador heteróptero *Geocoris punctipes* (Say) (Hemiptera: Geocoridae) los estadios ninfales más jóvenes (N1 y N2) fueron significativamente más susceptibles a los insecticidas que los más viejos (N3 y N4), y los adultos mostraron una posición intermedia (Prabhaker *et al.*, 2017).

La expresión de la resistencia a los insecticidas en función de la edad ha sido estudiada más extensamente en especies de plagas, siendo los adultos más resistentes que los

estadios inmaduros o viceversa (Nauen *et al.*, 2008; Contreras *et al.*, 2010). La expresión de la resistencia a los insecticidas en función de la edad se ha estudiado en el heteróptero *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae), con deltametrina se observó la misma disminución progresiva de la toxicidad de los insecticidas y, al igual que en nuestro caso, las ninfas de cuarto y quinto estadio mostraron la mayor tolerancia al piretroide (Germano y Picollo, 2018). Aunque el aumento de la masa corporal puede influir, estas diferencias también se han atribuido a la expresión de los mecanismos de desintoxicación y a los cambios en la permeabilidad de la cutícula (Jones *et al.*, 2011; Germano y Picollo, 2018).

En este estudio con *O. laevigatus*, los estadios N4 y, sobre todo, de N5 mostraron una mayor tolerancia al piretroide que los más jóvenes y los adultos. El mismo patrón se encontró para la abamectina y el spinosad, siendo las ninfas de quinto estadio más tolerantes que los segundos estadios y los adultos (Van de Veire *et al.*, 2002). Esta diferencia en la susceptibilidad debe tenerse en cuenta al considerar la compatibilidad de los tratamientos insecticidas con los ACB. La mayor supervivencia de las ninfas en estadio más avanzado puede conducir a una mejor recuperación de la población a pesar de la importante mortalidad de los adultos. Además, la liberación de ninfas de último estadio después de las pulverizaciones de insecticidas puede acortar el periodo de seguridad para la reintroducción de los ACB en el cultivo. Por lo tanto, la composición demográfica de las poblaciones de enemigos naturales tendrá un papel importante en el impacto de los tratamientos insecticidas con respecto a la dinámica poblacional y en las interacciones depredador-presa. Los estudios sobre la compatibilidad de los plaguicidas y los enemigos naturales requieren un enfoque múltiple, teniendo en cuenta los efectos letales y subletales, pero también la variación intraespecífica de la susceptibilidad, así como la diferencia en la tolerancia entre los distintos estadios de desarrollo.

5.5 CONCLUSIONES

Se observó una variación significativa en la susceptibilidad a los piretroides en poblaciones silvestres y comerciales del depredador *O. laevigatus*. Además, esta variación fue explotada con éxito para aumentar la resistencia a los piretroides mediante

selección artificial. Nuestra población resistente a los piretroides permitirá la aplicación puntual de piretroides y piretrinas naturales para controlar varias plagas principales y secundarias, sin perturbar la acción beneficiosa de *O. laevigatus*, tanto en los cultivos ecológicos como en los que se aplica la GIP.

Por lo tanto, esta población resistente a las piretrinas y a los piretroides mejoraría la implementación de los protocolos de control biológico dentro la GIP.

5.6 BIBLIOGRAFÍA

- Angeli, G., Baldessari, M., Maines, R., y Duso, C., 2005. Side-effects of pesticides on the predatory bug *Orius laevigatus* (Heteroptera: Anthocoridae) in the laboratory. *Biocontrol Science and Technology* 15: 745-754.
- Balanza, V., Mendoza, J.E., Bielza, P., 2019. Variation in susceptibility and selection for resistance to imidacloprid and thiamethoxam in Mediterranean populations of *Orius laevigatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 167: 626–635.
- Bielza, P., 2016. Insecticide resistance in natural enemies. En: Horowitz, A.R., Ishaaya, I., (eds.). *Advances in Insect Control and Resistance*. Springer. Cham, Switzerland, pp. 313-329. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-31800-4>
- Bielza, P., Balanza, V., Cifuentes, D., Mendoza, J.E., 2020. Challenges facing arthropod biological control: identifying traits for genetic improvement of predators in protected crops. *Pest Management Science* 76: 3517-3526. <https://doi.org/10.1002/ps.5857>
- Bielza, P., Quinto, V., Fernández, E., Grávalos, C., Abellán, J., Cifuentes, D., 2008. Inheritance of resistance to acrinathrin in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Pest Management Science* 64: 584–588.
- Biondi, A., Mommaerts, G.V., Smagghe, E., Viñuela, L., Zappalà, N.D., 2012. The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. *Pest Management Science* 68: 1523–1536.

- Calvo, F.J., Bolckmans, K., Belda, J.E., 2012. Biological control based IPM in sweet pepper greenhouses using *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae). *Biocontrol Science and Technology* 22: 1398–1416.
- Costa, P.M.G., Torres, J.B., Rondelli, V.M., Lira, R., 2018. Field-evolved resistance to Lambda-cyhalothrin in the lady beetle *Eriopis connexa*. *Bulletin of Entomological Research* 108: 380–387.
- De Clercq, P., Mestdagh, I., Degheele, D., 1998. Variation in susceptibility to pyriproxyfen in four laboratory strains of *Podisus maculiventris* (Say) (Het., Pentatomidae). *Journal of Applied Entomology* 122: 405–408.
- Desneux, N., Denoyelle, R., Kaiser, L.A., 2006. Multi-step bioassay to assess the effect of the deltamethrin on the parasitic wasp *Aphidius ervi*. *Chemosphere* 65: 1697–1706.
- Desneux, N., Fauvergue, X., Dechaume-Moncharmont, F.X., Kerhoas, L., Ballanger, Y., Kaiser, L., 2005. *Diaeretiella rapae* limits *Myzus persicae* populations following applications of deltamethrin in oilseed rape. *Journal of Economic Entomology* 98: 9–17.
- Elzen, G.W., 2001. Lethal and sublethal effects of insecticide residues on *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) and *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae). *Journal of Economic Entomology* 94: 55–59.
- Elzen, G.W., Elzen, P.J., King, E.G., 1998. Laboratory toxicity of insecticide residues to *Orius insidiosus*, *Geocoris punctipes*, *Hippodamia convergens* and *Chrysoperla carnea*. *Southwestern Entomologist* 23: 335–342.
- Fernandes, M.E., Alves, F.M., Pereira, R.C., Aquino, L.A., Fernandes, F.L., Zanuncio, J.C., 2016. Lethal and sublethal effects of seven insecticides on three beneficial insects in laboratory assays and field trials. *Chemosphere* 156: 45–55.
- Ferreira, E.S., Rodrigues, A.R.S., Silva-Torres, C.S.A., Torres, J.B., 2013. Life-history costs associated with resistance to lambda-cyhalothrin in the predatory ladybird beetle *Eriopis connexa*. *Agricultural and Forest Entomology* 15: 168–177.

- Grávalos, C., Fernández, E., Belando, A., Moreno, I., Ros, C., Bielza, P., 2015. Cross-resistance and baseline susceptibility of Mediterranean strains of *Bemisia tabaci* to cyantraniliprole. *Pest Management Science* 71: 1030-1036.
- Guillén, J., Bielza, P., 2015. Cyantraniliprole: a valuable tool for *Frankliniella occidentalis* (Pergande) management. *Pest Management Science* 71: 1068-1074.
- IRAC (2020). The IRAC mode of action classification online. <https://irac-online.org/modes-of-action/>. Accessed 20 September 2020
- Mendoza, J.E., Balanza, V., Cifuentes, D., Bielza, P., 2020. Genetic improvement of *Orius laevigatus* for better fitness feeding on pollen. *Journal Pest of Science* (2020). <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01291-x>
- Pathan, A.K., Sayyed, A.H., Aslam, M., Razaq, M., Jilani, G., Saleem, M.A., 2008. Evidence of field-evolved resistance to organophosphates and pyrethroids in *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Journal of Economic Entomology* 101: 1676–1684.
- Prabhaker, N., Naranjo, S., Perring, T., Castle, S., 2017. Comparative toxicities of newer and conventional insecticides: against four generalist predator species. *Journal of Economic Entomology* 110: 2630–2636.
- Rodrigues, A.R.S., Ruberson, J.R., Torres, J.B., Siquiera, H.A., Scott, J.G., 2013. Pyrethroid resistance and its inheritance in a field population of *Hippodamia convergens* (Guérin-Ménéville) (Coleoptera: Coccinellidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 105: 135–143.
- Rodrigues, A.R.S., Spindola, A.F., Torres, J.B., Siquiera, H.A., Colares, F., 2013. Response of different populations of seven lady beetle species to lambda-cyhalothrin with record of resistance. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 96: 53–60.
- Roush, R.T., Hoy, C.W., Ferro, D.N., Tingey, W.N., 1990. Insecticide resistance in the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): influence of crop rotation and insecticide use. *Journal of Economic Entomology* 83: 315–319.

- Ruberson, J. R., Tillman, P.G., 1999. En: Dugger, P., Richter, D.J., (eds.). Effect of selected insecticides on natural enemies in cotton: laboratory studies. Proceedings Beltwide Cotton Conference 2: 1210-1213.
- Ruberson, J.R., Roberts, P., Michaud, J.P., 2007. Pyrethroid resistance in Georgia populations of the predator *Hippodamia convergens* (Coleoptera:Coccinellidae), en: Proceedings of Beltwide Cotton Conference, Vol. 1, pp. 361–365.
- Sánchez, J.A., Alcázar, A., Lacasa, A., Llamas, A., Bielza, P., Albajes, R., *et al.*, 2000. Integrated pest management strategies in sweet pepper plastic houses in the southeast of Spain. Bull OILB/SROP 23:21–30.
- Sterk, G., Hassan, S.A., Baillod, M., Bakker, F., Bigler, F., Blümel, S., *et al.*, 1999. Results of seventh joint pesticides testing programme carried out by the IOCB/WPRS Working Group pesticides and beneficial organisms. BioControl 44:99–117.
- Studebaker, G.E., Kring, T.J., 2003. Effects of insecticides on *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae), measured by field, greenhouse, and Petri dish bioassays. Florida Entomologist 86: 178–185.
- Tabashnik, B.E., Johnson, M.W., 1999. En: Fisher, T.W., Bellows, T.S., Caltagirone, L.E., Dahlsten, D.L., Huffaker, C.B., Gordh, G., (eds). Evolution of pesticide resistance in natural enemies, in Handbook of Biological Control: Principles and Applications of Biological Control, Academic Press, San Diego, CA, pp. 673–689.
- Taplin, D., Meinking, T.L., 1990. Pyrethrins and pyrethroids in dermatology. Archives of Dermatology 126: 213-221.
- Todd, G.D., Wohlers, D., Citra, M., 2003. Toxicology Profile for Pyrethrins and pyrethroids. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, GA.
- Torres, J.B., 2012. Insecticide resistance in natural enemies-seeking for integration of chemical and biological controls. Journal of Biofertilizers and Biopesticides 3: 1-3.

- Torres, J.B., Rodrigues, A.R.S., Barros, E.M., Santos, D.S., 2015. Lambdacyhalothrin resistance in the lady beetle *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) confers tolerance to other pyrethroids. *Journal of Economic Entomology* 108: 60–68.
- Van de Veire, M., Sterk, G., van der Staaij, M., Ramakers, P.M.J., Tirry, L., 2002. Sequential testing scheme for the assessment of the side-effects of plant protection products on the predatory bug *Orius laevigatus*. *BioControl* 47: 101–113.
- Van Lenteren, J.C., Alomar, O., Ravensberg, W.J., Urbaneja, A., 2020. En: Gullino, M. L., Albajes, R., Nicot, P. C., (eds.). *Integrated pest and disease management in greenhouse crops, Plant Pathology in the 21st Century*, Springer International, Cham, pp. 409–439.

6. MEJORA GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A SPINOSAD EN *Orius laevigatus*

Balanza, V., Mendoza, J.E., Cifuentes, D., Bielza, P., 2021. Genetic improvement of spinosad resistance in the biocontrol agent *Orius laevigatus*. BioControl. Artículo en revisión.

6.1 INTRODUCCIÓN

La gestión integrada de plagas (GIP), como se ha dicho en los capítulos anteriores, sigue requiriendo intervenciones fitosanitarias correctivas. Esto puede provocar efectos secundarios en los agentes de control biológico (ACB) ya presentes en el cultivo, causando desequilibrios en la regulación de las poblaciones de sus presas. Así pues, uno de los principales retos para el establecimiento y la supervivencia de los enemigos naturales en un cultivo es la compatibilidad con los tratamientos con plaguicidas (Bielza *et al.*, 2020).

La Unión Europea exige obligatoriamente la comprobación de los efectos secundarios de los plaguicidas para su registro oficial (EPPO, 2003). En consecuencia, se está realizando un importante esfuerzo en el estudio de la selectividad de los plaguicidas a los ACB, que ha tenido un papel clave en la aplicación de los programas de control biológico. En efecto, "Insecticidas y Organismos Beneficiosos" es uno de los grupos de trabajo más antiguos de la Organización Internacional para el Control Biológico e Integrado - Sección Regional del Paleártico Occidental (IOBC-WPRS), cuyo objetivo es "identificar plaguicidas selectivos para los artrópodos beneficiosos y promover su uso, con el fin de mejorar el control biológico en la protección de los cultivos y reducir el impacto de los plaguicidas en los organismos no objetivo" (IOBC- WPRS 2021a). Además, la propia IOBC- WPRS y los principales productores comerciales de ACB mantienen bases de datos en sus páginas web sobre la selectividad de los productos fitosanitarios sobre los polinizadores y los enemigos naturales (IOBC- WPRS 2021b; Agrobío, 2021; Biobest, 2021; Koppert, 2021), con el fin de ayudar a los profesionales del control biológico en la elección de los compuestos más compatibles.

Un enfoque diferente pero complementario puede ser la selección de poblaciones de ACB resistentes a algunos insecticidas usuales, permitiendo su uso conjunto en programas de GIP. Por tanto, se permitiría el uso ocasional de insecticidas para complementar la acción de los enemigos naturales sin efectos secundarios perjudiciales para estos, y se podría hacer la rotación de productos selectivos para evitar la evolución de la resistencia. Aunque la resistencia a los plaguicidas no se ha estudiado en los ACB tan extensamente como en las plagas, sí se ha estudiado para muchos ácaros depredadores, insectos depredadores y parasitoides (Bielza, 2016), y por lo tanto se espera que sea susceptible de mejora genética en la mayoría de los enemigos naturales.

El spinosad se ha convertido en un insecticida clave en los sistemas de cultivo convencionales y ecológicos (Biondi *et al.*, 2012b). Es un insecticida derivado de la fermentación aeróbica de la bacteria del suelo *Saccharopolyspora spinosa* Mertz y Yao, (Thompson *et al.*, 1997). Este insecticida se utiliza para controlar diferentes plagas como las orugas, los trips y los minadores de las hojas en vegetales, frutales y plantas ornamentales (Van de Veire, 2002b; Miles, 2006). Según su modo de acción, se encuentra clasificado en el grupo 5 de IRAC (2021), y debido a su comportamiento en los insectos, presenta pocas posibilidades de tener resistencia cruzada con algunos de los insecticidas que se utilizan habitualmente (Scott, 2004).

El spinosad se considera de bajo riesgo para la mayoría de los enemigos naturales, especialmente para los depredadores (Williams *et al.*, 2003). Sin embargo, existen resultados contrastados en algunos estudios sobre su selectividad hacia las especies de *Orius*, entre ellas *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae), que se han atribuido a variaciones en diferentes aspectos de la metodología de los bioensayos tales como, la duración de la exposición, las condiciones ambientales, el estadio ensayado, la concentración de los residuos, y el tiempo de evaluación de la mortalidad (Biondi *et al.*, 2012b). Por otro lado, otra causa de los diferentes efectos podría ser la variación de la susceptibilidad a los insecticidas entre las poblaciones.

Como se ha expuesto en capítulos anteriores, no se puede generalizar sobre el efecto de un insecticida basándose en la prueba de una o muy pocas poblaciones, ya que el resultado puede ser inexacto (Roush *et al.*, 1990). Es muy probable la existencia de una variación intraespecífica como ocurre en las especies de plagas (Guillén y Bielza, 2015;

Grávalos *et al.*, 2015), por lo que deberían hacerse estudios más profundos para determinar la tolerancia de *O. laevigatus* hacia spinosad. De hecho, ya se ha observado una variación significativa en la susceptibilidad a los neonicotinoides y a los piretroides en las poblaciones de *O. laevigatus* de la cuenca mediterránea, en resultados mostrados en capítulos anteriores de esta tesis y también publicados en revistas científicas (Balanza *et al.*, 2019, 2021).

En el presente trabajo, nuestro primer objetivo fue investigar la variación intraespecífica en la susceptibilidad a spinosad en varias poblaciones silvestres y comerciales de *O. laevigatus*. Nuestro segundo y principal objetivo fue obtener una población resistente a spinosad mediante un programa de cría selectiva, para cumplir con el uso seguro de spinosad dentro de los protocolos de biocontrol. Por último, caracterizamos la resistencia adquirida estudiando la estabilidad, los niveles de resistencia en los diferentes estadios, la resistencia cruzada de spinosad con otros insecticidas, y la implicación de la resistencia metabólica.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 Insectos

Las poblaciones silvestres de *O. laevigatus* que se usaron para la realización de los bioensayos coinciden con las 35 poblaciones del capítulo 2, muestreadas en varios países (principalmente España, Italia y Grecia) entre 2012 y 2019 (ver Tabla 6.3.1 y Figura 3.2 en materiales y métodos generales para más detalle). Se utilizaron como referencia las cuatro poblaciones comerciales descritas en materiales y métodos generales (apartado 3.1.2). Las poblaciones se criaron según se detalla en el apartado 3.2 de materiales y métodos generales.

6.2.2 Insecticidas

Se utilizó una formulación comercial de spinosad (Spintor[®], Corteva Agriscience). Para los bioensayos de resistencia cruzada, los insecticidas utilizados fueron spinetoram (Delegate[®], Corteva Agriscience), sulfoxaflor (Closer[®], Corteva Agriscience), acetamiprid (Mospilan[®], Certis Europe), lambda-cihalotrín (KarateZeon[®], Syngenta Crop Protection), tiametoxam (Actara[®], Syngenta Crop Protection) e imidacloprid (Confidor[®], Bayer

CropScience). Las formulaciones de los insecticidas se disolvieron en agua destilada más Tween 80 (0,5%) para obtener diferentes concentraciones de insecticida, tal y como se detalla en materiales y métodos generales (apartado 3.4.1.1).

6.2.3 Variación entre poblaciones

Todas las poblaciones silvestres y comerciales fueron ensayadas con spinosad. Se realizaron bioensayos de toxicidad residuales con adultos jóvenes de *O. laevigatus*, tal y como se detalla en el 3.4.1 de materiales y métodos generales. Las concentraciones de spinosad utilizadas para los bioensayos variaron de 10 a 3000 mg L⁻¹, dependiendo de la tolerancia al insecticida de cada una de las poblaciones.

6.2.4 Selección de la resistencia

Para seleccionar una población resistente al spinosad, se utilizaron todas las poblaciones silvestres y comerciales. Cada población se seleccionó inicialmente con 1000 mg L⁻¹ de spinosad, lo que corresponde a una mortalidad en torno al 75% según la línea base, mediante un bioensayo de selección (apartado 3.4.2 de materiales y métodos generales). Los supervivientes de cada población se mezclaron para constituir la población inicial RSPI1. Esta población fue expuesta posteriormente a concentraciones crecientes de insecticida hasta llegar a la población seleccionada RSPI38. La concentración más alta utilizada fue de 4800 mg L⁻¹ y se completaron 38 ciclos de selección para llegar a la población seleccionada RSPI38.

6.2.5 Caracterización de la resistencia

La población seleccionada RSPI38 se estudió más a fondo para caracterizar la expresión de la resistencia en los diferentes estadios, la estabilidad de la resistencia, el patrón de resistencia cruzada y la participación de los mecanismos de resistencia metabólica. Se evaluó la resistencia a spinosad en todos los estadios ninfales (N1-N5) de la población RSPI38, comparándolos con la población comercial de referencia (Agrobío). Se estudió la estabilidad de la resistencia al spinosad después de criar la población RSPI38 resistente, sin presión de selección, durante 10 generaciones.

Se evaluó la resistencia cruzada a otro spinosín registrado, el spinetoram, con unas concentraciones de insecticida comprendidas entre 3-3000 mg L⁻¹. El spinetoram se ensayó tanto en la población resistente RSPI38 como en la población de referencia. Los

spinosines se clasifican como moduladores alostéricos del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR)- sitio I, dentro del grupo 5 de la Clasificación del Modo de Acción del IRAC (IRAC 2021). Al igual que las spinosinas, los neonicotinoides y las sulfoximinas actúan sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) en los insectos, pero en sitios distintos. Sin embargo, los posibles cambios en los nAChRs relacionados con la resistencia al spinosad en nuestra población seleccionada podrían implicar la interacción con otros compuestos que actúan sobre este receptor (Guillen y Bielza, 2013). Por ello, se estudió también la resistencia cruzada a cuatro insecticidas de este grupo 4: los neonicotinoides, acetamiprid ($10\text{-}300\text{ mg L}^{-1}$), imidacloprid ($30\text{-}1000\text{ mg L}^{-1}$) y tiametoxam ($3\text{-}300\text{ mg L}^{-1}$), y la sulfoximina sulfoxaflor ($10\text{-}300\text{ mg L}^{-1}$), además del piretroide lambda-cihalotrín ($10\text{-}300\text{ mg L}^{-1}$).

Para investigar el papel de los mecanismos metabólicos en la resistencia al spinosad, se estudió el efecto de los sinergistas PBO (butóxido de piperonilo) (300 mg L^{-1}), DEF (S,S,S-tributil fosforotrioato) (300 mg L^{-1}), y DEM (maleato de dietilo) (1000 mg L^{-1}) utilizando el mismo método de bioensayo descrito anteriormente, pero exponiendo a los adultos 24 horas antes del tratamiento con el insecticida, a los sinergistas.

6.2.6 Análisis de los datos

Se calcularon las concentraciones letales medias (CL_{50}), la mortalidad a la dosis de campo (MDC), los factores de resistencia (FR_{50}) y las clases de toxicidad (Sterk *et al.*, 1999), tal y como se explica en el apartado 3.5 de materiales y métodos generales.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Variación entre poblaciones

La Tabla 6.1 muestra los datos de toxicidad de 35 poblaciones silvestres de *O. laevigatus* de España, Italia, Grecia y Bélgica y de 4 poblaciones comerciales, ensayadas con spinosad. Los valores de CL_{50} variaron entre 30,1 (Cefalú) y 1470,1 mg L^{-1} (Cuevas de Almanzora), con una diferencia de 48,8 veces entre las poblaciones menos y más tolerantes, existiendo diferencias significativas entre ellas. El valor CL_{50} para la línea de base fue de 166,3 mg L^{-1} , cercano a la dosis máxima de campo de este compuesto (120 mg L^{-1}). La MDC fue variable entre las poblaciones, alcanzando un valor máximo del

Tabla 6.1. Susceptibilidad a spinosad en poblaciones silvestres y comerciales de *Orius laevigatus*.

Origen	Poblaciones	Pendiente (\pm SE)	CL ₅₀ mg L ⁻¹ (95% LF) ^a	FR ₅₀ ^b	MDC (%) ^c	Clase ^d
España (Noroeste)	Portonovo	2,0 \pm 0,4	42,7 (25,1-60,8)	1,4	80,5	3
	Corrubedo	1,2 \pm 0,2	116,3 (61,6-191,0)	3,9	45,8	2
	Moreira	1,9 \pm 0,3	64,6 (15,9-148,2)	2,1	67,4	2
	Catadoiro	1,7 \pm 0,2	316,5 (222,6-473,8)	10,5	19,3	1
España (Sureste)	Perín	1,7 \pm 0,3	221,9 (126,4-342,9)	7,4	32,1	2
	Cabo de Palos	1,6 \pm 0,8	263,9 (160,4-421,0)	8,8	25,0	1
	La Zenia	1,3 \pm 0,2	268,2 (158,5-460,2)	8,9	31,0	2
	Cabo de Gata	2,2 \pm 0,4	808,4 (550,1-1142,7)	26,9	2,7	1
	Cuevas de Almanzora	5,6 \pm 1,2	1470,1 (1076,1-1896,0)	48,8	0,0	1
	Hellín	1,4 \pm 0,3	80,0 (30,7-138,6)	2,7	55,6	2
	Puerto de la Mora	1,5 \pm 0,2	91,4 (57,6-134,4)	3,0	52,7	2
España (Suroeste)	Cazorla	1,6 \pm 0,3	280,4 (164,7-512,2)	9,3	29,0	1
	Órgiva	1,1 \pm 0,1	683,2 (278,7-1154,6)	22,7	20,0	1
	Islantilla	1,5 \pm 0,2	688,1 (468,1-1033,14)	22,9	10,0	1
España (Noreste)	Carmona	0,3 \pm 0,2	270,7 (116,2-460,2)	9,0	28,2	1
	Cabrils	1,0 \pm 0,3	102,6 (39,3-191,4)	3,4	52,5	2
España (Centro)	Teruel	1,6 \pm 0,2	83,7 (52,9-121,4)	2,8	59,0	2
	Logroño	0,8 \pm 0,2	444,4 (223,4-1679,3)	14,8	29,6	1
	Méntrida	1,3 \pm 0,3	207,5 (74,9-415,4)	6,9	34,6	2
España (Oeste)	Alcobendas	1,8 \pm 0,3	79,5 (40,2-124,3)	2,6	63,4	2
	Ruidera	1,1 \pm 0,2	228,4 (65,4-449,5)	7,6	34,0	2
	Guadalupe	1,7 \pm 0,2	877,7 (615,7-1322,9)	29,2	6,0	1
Italia (Sicilia)	Arroyo de San Serván	2,3 \pm 0,3	804,9 (598,7-1098,2)	26,7	2,9	1
	Mérida	1,2 \pm 0,2	33,0 (8,8-62,1)	1,1	75,6	2
	Acate	0,8 \pm 0,2	225,7 (52,2-757,8)	7,5	38,0	2
Italia (Sur)	Cefalú	1,1 \pm 0,2	30,1 (5,9-61,4)	1,0	75,4	2
	Palermo	1,0 \pm 0,2	37,7 (9,7-71,4)	1,3	69,1	2
	Nápoles	0,9 \pm 0,2	992,4 (369,2-1896,6)	33,0	19,2	1
	Capodichino	1,5 \pm 0,3	378,8 (179,0-625,2)	12,6	18,6	1
Grecia (Creta)	Vesubio	1,8 \pm 0,3	453,9 (226,6-709,2)	15,1	14,1	1
	Policoro	1,3 \pm 0,2	62,2 (33,4-95,2)	2,1	61,5	2
Grecia	Samaria	1,4 \pm 0,3	364,5 (224,6-644,5)	12,1	21,5	1
	Rethymno	1,7 \pm 0,3	848,4 (589,4-1269,5)	28,2	8,0	1
Bélgica	Atenas	1,6 \pm 0,3	158,6 (82,3-252,1)	5,3	39,2	2
	Westerlo	0,9 \pm 0,2	433,4 (1958,3-815,3)	14,4	23,3	1
Comercial	Bioline	1,2 \pm 0,2	90,0 (3,79-161,2)	3,0	55,8	2
	Biobest	1,2 \pm 0,2	90,2 (37,7-159,9)	3,0	49,0	2
	Agrobío	1,0 \pm 0,2	121,6 (20,2-283,8)	4,0	49,9	2
	Koppert	1,1 \pm 0,2	180,8 (103,3- 293,5)	6,0	42,6	2
	Línea base	0,9 \pm 0,0	166,3 (129,7-208,6)	5,5	44,6	2

^a Concentración de insecticida que mata al 50% de los individuos y sus límites fiduciales al 95%. Todos los análisis se ajustaron al modelo probit ($p > 0,05$), excepto el de referencia debido a la variación entre poblaciones.

^b Factor de resistencia = CL₅₀ de cada población / CL₅₀ de la población de referencia susceptible.

^c Mortalidad a la tasa máxima de campo (120 mg L⁻¹).

^d Clases de toxicidad: clase 1 (inofensivo): efecto < 30%; clase 2 (ligeramente dañino): efecto del 30 al 79%; clase 3 (moderadamente dañino): efecto del 80 al 99%; clase 4 (dañino): efecto > 99%.

80,5%, siendo las clases de toxicidad 1 y 2 (inofensiva y ligeramente dañina, respectivamente) para todas las poblaciones, excepto para Portonovo, en la que se observó una clase 3 (moderadamente dañina). La MDC en las poblaciones comerciales osciló entre el 42,6 y el 55,8% (clase 2). Estos resultados muestran que existe una variabilidad entre las poblaciones, siendo el spinosad, en general, ligeramente dañino para *O. laevigatus*.

6.3.2 Selección para la resistencia

La selección después de 38 ciclos de selección (RSPI38) aumentó significativamente la resistencia a spinosad ($CL_{50} = 2110,0 \text{ mg L}^{-1}$) 20,3 veces en comparación con la población de referencia (Agrobío), 12,7 veces en comparación con la línea de base y 70 veces en comparación con la población más susceptible (Tablas 6.1 y 6.2). La MDC fue del 13,1% para la población resistente, resultando una toxicidad inofensiva.

Tabla 6.2. Datos de susceptibilidad al spinosad en adultos y estadios ninfales de la población comercial y resistente (RSPI38).

Población	Estadio	Pendiente (\pm SE)	$CL_{50} \text{ mg L}^{-1}$ (95% LF) ^a	FR_{50} ^b	MDC (%) ^c	Clase ^d
Agrobío	Ninfa 1	1,1 \pm 0,3	8,4 (1,4-17,2)	1	90,1	3
	Ninfa 2	1,1 \pm 0,2	19,3 (4,1-39,1)	1	80,1	3
	Ninfa 3	1,7 \pm 0,4	165,3 (75,0-266,6)	1	40,6	2
	Ninfa 4	1,4 \pm 0,3	83,9 (40,6-136,7)	1	58,5	2
	Ninfa 5	1,9 \pm 0,3	75,4 (45,3-110,1)	1	58,3	2
	Adultos	2,0 \pm 0,4	103,8 (47,9-156,8)	1	54,6	2
	RSPI38	Ninfa 1	1,2 \pm 0,2	17,4 (6,2-30,9)	2,0	86,0
Ninfa 2		1,6 \pm 0,4	55,5 (22,0-92,2)	2,8	71,0	2
Ninfa 3		1,3 \pm 0,3	886,4 (483,5-1581,0)	5,3	11,7	1
Ninfa 4		0,8 \pm 0,2	891,4 (346,1-2661,3)	10,62	23,2	1
Ninfa 5		-	>3000	>40	~10	1
Adultos		0,8 \pm 0,2	2110,0 (562,0-5024,4)	20,3	13,1	1

^a Concentración de insecticida que mata al 50% de los individuos y sus límites fiduciales al 95%. Todos los análisis se ajustaron al modelo probit ($p > 0,05$).

^b Factor de resistencia = CL_{50} de cada población / CL_{50} de la población de referencia susceptible.

^c Mortalidad a la tasa máxima de campo (120 mg L^{-1}).

^d Clases de toxicidad: clase 1 (inofensivo): efecto < 30%; clase 2 (ligeramente dañino): efecto del 30 al 79%; clase 3 (moderadamente dañino): efecto del 80 al 99%; clase 4 (dañino): efecto > 99%.

6.3.3 Caracterización de la resistencia

Los adultos de la población de referencia de Agrobío mostraron susceptibilidad a spinosad (103,8 mg L⁻¹), sin diferencias significativas con la línea base (166,3 mg L⁻¹) (Tablas 1 y 2) y mostrando una toxicidad de clase 2, con una MDC del 54,6%. Los estadios ninfales más jóvenes (N1 y N2) de Agrobío fueron significativamente más susceptibles a spinosad (CL₅₀ 8,4 y 19,3 mg L⁻¹) que los estadios más maduros (N3 a adulto) (CL₅₀ 75,4-165,3 mg L⁻¹), clasificándose N1 y N2 en la clase 3 (moderadamente dañino) y N3, N4 y N5 en la clase 2 (ligeramente dañino) (Tabla 6.2).

Tabla 6.3. Datos de susceptibilidad de la población resistente a spinosad (RSPI38) de *Orius laevigatus* tras varias generaciones sin aplicar el insecticida.

Población	Generación ^a	Pendiente (± SE)	CL ₅₀ mg L ⁻¹ (95% LF) ^b	FR ₅₀ ^c	MDC (%) ^d	Clase ^e
Agrobío	-	2,0 ± 0,4	103,8 (47,9-156,8)	1	54,6	2
RSPI38	Inicial (0)	0,8 ± 0,2	2110,0 (562,0-5024,4)	20,3	13,1	1
	10	1,2 ± 0,2	2312,9 (1351,5-6213,9)	22,2	5,9	1

^a Generaciones sin aplicar el insecticida.

^b Concentración de insecticida que mata al 50% de los individuos y sus límites fiduciales al 95%. Todos los análisis se ajustaron al modelo probit ($p > 0,05$).

^c Factor de resistencia = CL₅₀ de cada población/CL₅₀ de la población de referencia susceptible.

^d Mortalidad a la tasa máxima de campo (120 mg L⁻¹)

^e Clases de toxicidad: clase 1 (inofensivo): efecto < 30%; clase 2 (ligeramente dañino): efecto del 30 al 79%; clase 3 (moderadamente dañino): efecto del 80 al 99%; clase 4 (dañino): efecto > 99%.

La resistencia a spinosad en RSPI38 se observó en todos los estadios ninfales, existiendo diferencias significativas con respecto a la población de referencia en N3 (CL₅₀ = 886,4 mg L⁻¹), siendo incluso N5 más resistente que los adultos (> 3000 mg L⁻¹). La MDC osciló entre el 86 (N1) y el 10% (N5) y la toxicidad fue de clase 3 (moderadamente dañina) para N1, de clase 2 (ligeramente dañina) para N2, y para los últimos estadios ninfales y adultos se clasificó como clase 1 (inofensivo).

La Tabla 6.3 muestra que después de 10 generaciones sin exposición al spinosad, la población seleccionada sigue conservando su resistencia (CL₅₀ = 2312,9 mg L⁻¹), siendo 22,2 veces más resistente que la población comercial de referencia y conservando una toxicidad de clase 1, con un 5,9% de MDC.

Se observó resistencia cruzada con spinetoram (19 veces) en la población RSPI38 ($LC_{50}=1774,8 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabla 6.4), con un 6,7% de MDC (dosis máxima de campo del spinetoram = 25 mg L^{-1}) y una toxicidad de clase 1 (inofensivo). Sin embargo, no se detectó resistencia cruzada con lambda-cihalotrín, sulfoxaflor y ninguno de los neonicotinoides ensayados.

Ninguno de los sinergistas ensayados fue capaz de reducir significativamente la tolerancia a spinosad en la población resistente RSPI38 (Tabla 6.5).

Tabla 6.4. Resistencia cruzada con diferentes insecticidas en la población comercial (Agrobío) y la población seleccionada RSPI38 de *Orius laevigatus*.

Población	Insecticida	Pendiente (\pm SE)	$CL_{50} \text{ mg L}^{-1}$ (95% LF) ^a	MDC (%) ^b	Clase ^c
Agrobío	Imidacloprid	$1,8 \pm 0,4$	258,4 (102,8-464,7)	33,2	2
	Tiametoxam	$1,7 \pm 0,4$	60,7 (17,3-114,9)	64,4	2
	Acetamiprid	$1,8 \pm 0,3$	59,5 (42,2-84,4)	65,9	2
	λ -cihalotrín	$2,3 \pm 0,5$	13,0 (7,0-18,5)	67,0	2
	Spinetoram	$1,4 \pm 0,3$	93,2 (28,9-162,7)	21,1	1
	Sulfoxaflor	$1,5 \pm 0,2$	50,2 (24,3-91,5)	48,6	2
RSPI38	Imidacloprid	$0,9 \pm 0,2$	80,9 (23,0-161,3)	59,6	2
	Tiametoxam	$1,3 \pm 0,3$	128,7 (33,6-240,2)	43,6	2
	Acetamiprid	$2,1 \pm 0,5$	20,1 (12,7-31,8)	92,9	3
	λ -cihalotrín	$1,5 \pm 0,3$	22,6 (6,2-43,9)	46,8	2
	Spinetoram	$0,8 \pm 0,1$	1774,8 (554,6-2874,0)	6,7	1
	Sulfoxaflor	$0,8 \pm 0,2$	29,2 (7,0-63,4)	57,0	2

^a Concentración de insecticida que mata al 50% de los individuos y sus límites fiduciales al 95%. Todos los análisis se ajustaron al modelo probit ($p>0,05$).

^b Mortalidad a la máxima dosis de campo (imidacloprid: 150 mg L^{-1} ; tiametoxam: 100 mg L^{-1} ; acetamiprid: 100 mg L^{-1} ; λ -cihalotrín: 20 mg L^{-1} ; spinetoram: 25 mg L^{-1} ; sulfoxaflor: 48 mg L^{-1}).

^c Clases de toxicidad: clase 1 (inofensivo): efecto < 30%; clase 2 (ligeramente dañino): efecto del 30 al 79%; clase 3 (moderadamente dañino): efecto del 80 al 99%; clase 4 (dañino): efecto > 99%.

Tabla 6.5. Datos de susceptibilidad para spinosad con inhibidores de enzimas de detoxificación en adultos de la población seleccionada RSPI38 de *Orius laevigatus*.

Tratamiento	Concentración (mg L^{-1}) ^a	Pendiente (\pm SE)	$CL_{50} \text{ mg L}^{-1}$ (95% LF) ^b
Spinosad	-	$1,5 \pm 0,3$	2228,9 (1220,1-7106,9)
+ PBO	300	$1,0 \pm 0,2$	2211,2 (1454,2-4513,2)
+ DEF	300	$0,9 \pm 0,2$	2388,8 (1175,8-12682)
+ DEM	1000	$1,0 \pm 0,2$	2186,0 (1174,1-7694,1)

^a Concentración aplicada del sinergista.

^b Concentración de insecticida que mata al 50% de los individuos y sus límites fiduciales al 95%. Todos los análisis se ajustaron al modelo probit ($p>0,05$).

6.4 DISCUSIÓN

El conocimiento de la compatibilidad de los plaguicidas con los ACB es esencial para su integración en los programas de GIP. Este es el primer estudio exhaustivo que evalúa los efectos directos del spinosad en una amplia gama de poblaciones silvestres y comerciales de *O. laevigatus*.

El spinosad tiene un perfil ecotoxicológico favorable, y se destaca el potencial que tiene para su uso en GIP (Thompson *et al.*, 2000), pero existe cierta controversia en la literatura respecto al impacto en las especies de *Orius*. Miles (2006), en un bioensayo residual en plantas de judías, demostró que el spinosad es altamente selectivo para los insectos beneficiosos a la dosis de campo (192 mg L⁻¹) y es ideal para su uso en programas de GIP, clasificándolo como inofensivo (Clase 1) para las ninfas N1 y N2 de *O. laevigatus*. Sin embargo, en un ensayo realizado por Van de Veire *et al.* (2002b) exponiendo a los adultos a residuos secos sobre placas de vidrio, se obtuvo una mortalidad del 98 y 96% aplicando dosis de 250 y 100 mg L⁻¹ respectivamente, y se obtuvo una CL₅₀ de 41,3 mg L⁻¹. En nuestro caso, algunas de las poblaciones silvestres ensayadas obtuvieron valores de CL₅₀ en torno a este valor. Por el contrario, en el mismo trabajo (Van de Veire *et al.*, 2002b), se observó una mortalidad muy baja (10 y 34% para 100 y 250 mg L⁻¹, respectivamente) cuando se expuso la N2 de *O. laevigatus* en hojas de pimiento 5 días después de ser tratadas las plantas en un invernadero. En otro ensayo, se observó un 100% de mortalidad de N2 después de 4 días expuestos a 100 mg L⁻¹ de residuos secos en placas de vidrio, pero exponiendo las N2 a residuos secos en hojas de pimiento cogidas de un invernadero 5 días después de ser tratadas las plantas, solo se observó un 10% (verano) o un 63% (primavera) de mortalidad (Van de Veire y Tirry, 2003). En un estudio similar también con *O. laevigatus* (Kim *et al.*, 2018), se obtuvo una mortalidad del 100% tras rociar directamente a los adultos con 50 mg L⁻¹, y una mortalidad del 100, 98, 96, 39, 17 y 0% utilizando hojas de pimiento recogidas 1, 4, 7, 14, 21 y 28 días después de ser tratadas las plantas en el invernadero. Exponiendo adultos de *O. laevigatus* durante 3 días a residuos secos en hojas de tomate, Biondi *et al.* (2012a) obtuvieron una mortalidad en torno al 85% con residuos de 1 y 7 días, pero sólo del 50% con residuos de 14 días. Por lo tanto, según estos autores, el spinosad puede clasificarse como un insecticida tóxico y no selectivo para *O. laevigatus*.

Se han notificado resultados variables similares para otras especies de *Orius*. Herrick y Cloyd (2017) obtuvieron un 80% de mortalidad de *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae) tras 96 h de exposición en un bioensayo en placa de Petri. Stuebaker y Kring (2003) percibieron una alta mortalidad (90-100%) de adultos en bioensayos en placas de Petri, pero no fue significativamente diferente a la mortalidad obtenida en el control en ensayos de campo e invernadero. Jones *et al.* (2005) también informaron sobre resultados variables en *O. insidiosus* dependiendo del método de bioensayo aplicando 60 mg L⁻¹, desde el 23% utilizando un método de inmersión de las hojas, el 54% rociando directamente los adultos y colocándolos en hojas limpias, y el 100% rociando tanto los adultos como las hojas. En cambio, sólo obtuvieron un 35% y un 17% de mortalidad exponiendo a los adultos a residuos de 1 y 8 días, respectivamente, en hojas de pepino en un invernadero. Spinosad fue moderadamente dañino (alrededor del 50% de mortalidad) para los adultos de *Orius armatus* (Gross) (Hemiptera: Anthocoridae) tras la exposición a residuos secos en papel de filtro (48 mg L⁻¹), pero inocuo cuando se expuso a residuos secos en hojas de plantas de pimiento tratadas (Broughton *et al.*, 2014). Del mismo modo, la mortalidad de adultos de *Orius majusculus* (Reuter) (Hemiptera: Anthocoridae) fue muy elevada (100%) tras una aplicación tópica de 96 mg L⁻¹ de spinosad, pero no fue diferente a la obtenida en el control cuando se expusieron a residuos secos en discos de hojas de judía 1, 3 o 5 días después de la pulverización (Dağlı y Bahşi, 2009).

Por tanto, se han observado resultados variables en las pruebas de toxicidad para las especies de *Orius* y otros enemigos naturales. Estos resultados suelen explicarse por el uso de diferentes métodos de bioensayo, desde aplicaciones tópicas y directas, hasta bioensayos residuales utilizando superficies inertes (placas de vidrio o plástico) o material vegetal (hojas) y ensayos de semicampo o ensayos de campo (Stuebaker y Kring, 2003; Biondi *et al.*, 2012b). Sin embargo, otra fuente de variación puede ser la variabilidad intraespecífica de la susceptibilidad dentro de cada especie.

En el presente trabajo, utilizando el mismo método de bioensayo (exponiendo a los adultos a residuos secos en vainas de judías), encontramos una variación significativa (48,8 veces) en la susceptibilidad a spinosad en poblaciones silvestres del depredador *O. laevigatus*. Se observó una mortalidad muy variable a la máxima dosis de campo (120

mg L⁻¹) entre las poblaciones silvestres, desde el 0% hasta alcanzar un valor máximo del 80,5%, con clases de toxicidad 1 y 2 para la mayoría de las poblaciones y sólo clase 3 para una población. En el caso de las poblaciones comerciales, la MDC varió ligeramente en torno al 50%.

La mayoría de los estudios, si no todos, sobre la compatibilidad de los plaguicidas y los enemigos naturales sólo utilizan una única población de cada especie, sin tener en cuenta la variabilidad intraespecífica de la susceptibilidad entre las poblaciones de una misma especie (Roush *et al.*, 1990; Balanza *et al.*, 2019, 2021). Además, se ha visto que la endogamia y la cría prolongada en laboratorio influyen en los resultados de las pruebas toxicológicas debido a la pérdida de variación genética (De Clercq *et al.*, 1998). Otros estudios también han observado una variación significativa en la susceptibilidad a los neonicotinoides (Balanza *et al.*, 2019) y a lambda-cihalotrín (Balanza *et al.*, 2021) en poblaciones silvestres y comerciales de *O. laevigatus*.

Esta marcada variabilidad dentro de una misma especie en la susceptibilidad a los insecticidas en *O. laevigatus* es probable que sea similar en otros ACB. En general, estos resultados ponen de manifiesto la importancia de utilizar diferentes poblaciones de una determinada especie para evaluar el rango de susceptibilidad a un plaguicida.

6.4.1 Selección para la resistencia

Uno de los principales retos a los que se enfrenta un enemigo natural en un cultivo es la exposición a los tratamientos con insecticidas, ya sean sintéticos o de origen natural, como el spinosad. No es de extrañar que la resistencia a los insecticidas haya sido uno de los primeros rasgos propuestos para ser seleccionados en los ACB (Hoy, 1986) porque su impacto en la eficacia del biocontrol es fácilmente percibido por los agricultores (Bielza *et al.*, 2020).

Seleccionamos con éxito una población de *O. laevigatus* altamente resistente a spinosad y spinetoram, ampliamente utilizados para el control de varias plagas. La selección para la resistencia a spinosad sólo se ha visto en otro ACB, la crisopa *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) (Abbas *et al.*, 2014). Esta especie parece desarrollar fácilmente resistencia a los insecticidas en el campo cuando se expone a la presión de selección (Bielza, 2007). Sin embargo, esa selección se inició a partir de

poblaciones que ya mostraban una resistencia desarrollada en el campo (Abbas *et al.*, 2014). Al igual que se consiguió para la resistencia a neonicotinoides y piretroides (Balanza *et al.*, 2019, 2021), logramos la resistencia a spinosad aprovechando la variación natural de tolerancia presente en poblaciones silvestres.

En los cultivos hortícolas de invernadero bajo control biológico, el spinosad se utiliza para manejar eventuales brotes de trips cuando falla el control por las especies de *Orius*, pero principalmente se usa para controlar orugas de lepidópteros, como *Spodoptera exigua* (Hübner), *Helicoverpa armigera* (Hübner), *Autographa gamma* (Linnaeus) y *Chrysodeixis chalcites* (Esper) (Lepidoptera: Noctuidae). El uso de feromonas en trampas de captura y como confusión sexual, se utilizan como método general de gestión de las poblaciones, pero los tratamientos químicos son necesarios para controlar algunos brotes. El clorantraniliprol, que es una diamida, se utiliza principalmente en los programas de GIP, ya que tiene buena compatibilidad con los enemigos naturales, y en particular con *O. laevigatus* (Biondi *et al.*, 2012a). Aunque el spinosad también se utiliza en los programas de GIP, tiene un efecto moderado pero significativo sobre las poblaciones de *Orius* (Biondi *et al.*, 2012a, b). Por lo tanto, los productores suelen optar por no utilizar spinosad y seguir utilizando la diamida, eludiendo la alternancia de insecticidas dentro de una estrategia de gestión de la resistencia. Esto puede llevar a la evolución de la resistencia extrema a las diamidas, como se ha detectado en varios lepidópteros (Roditakis *et al.*, 2008; Guedes *et al.*, 2019; Richardson *et al.*, 2020). De hecho, uno de los argumentos para la autorización de spinosad en los cultivos ecológicos europeos fue su uso para minimizar el riesgo de evolución de la resistencia (Biondi *et al.*, 2012b). Nuestra población resistente seleccionada permitirá la alternancia de estos productos sin que afecte al rendimiento del biocontrol de *O. laevigatus*.

6.4.2 Caracterización de la resistencia

La población RSP138 mostró una mayor resistencia a spinosad en todos los estadios, aumentando la resistencia de toda la población frente a una aplicación de spinosad. La mayoría de los estudios de toxicidad sobre la compatibilidad con los enemigos naturales utilizan a los adultos, ya que suelen ser el estado de vida distribuido comercialmente y liberado en el biocontrol aumentativo en los cultivos protegidos (Kim *et al.*, 2018). Sin embargo, el efecto global sobre una determinada especie a nivel demográfico y su

capacidad de recuperación dependerá de la susceptibilidad de los diferentes estadios de desarrollo (Biondi *et al.*, 2012b; Balanza *et al.*, 2021). Tanto en la población comercial como en la resistente, se detectó un aumento progresivo de la tolerancia a spinosad desde N1 hasta N5, con un descenso en el adulto. El mismo patrón se encontró en las poblaciones de referencia y resistente a los piretroides de *O. laevigatus* cuando se probó con lambda-cihalotrín (Balanza *et al.*, 2021). Del mismo modo, el carbamato pirimicarb fue más tóxico para las ninfas N1 de *O. laevigatus* que para N4, con los adultos en una posición intermedia (Van de Veire *et al.*, 2002b; Angeli *et al.*, 2005).

Se ha visto que hay diferencia en la tolerancia entre los estadios ninfales y adultos en las plagas, donde los adultos son el estadio más resistente en algunas especies (Nauen *et al.*, 2008) mientras que los estados inmaduros son más resistentes en otras (Contreras *et al.*, 2010). En el insecto depredador *C. carnea*, el spinosad fue más tóxico para la primera larva que para la tercera (Mandour, 2009). El aumento de la masa corporal a lo largo de las etapas de desarrollo puede desempeñar un papel importante, pero estas diferencias entre los distintos estadios también se han explicado por la expresión diferencial de los mecanismos de desintoxicación y los cambios en la permeabilidad de la cutícula (Van de Veire *et al.*, 2002b; Jones *et al.*, 2011).

Además, la población RSPI38 es capaz de mantener la resistencia al spinosad a lo largo del tiempo, al menos después de 10 generaciones sin exposición al insecticida. La estabilidad del carácter seleccionado es suficiente para cubrir un ciclo completo de cultivo de hortalizas (4-8 meses), incluso si la población mejorada genéticamente se libera en el mismo inicio del cultivo. La estabilidad de la resistencia a spinosad también se ha comprobado que existe en otras especies de insectos, como el trips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) (Bielza *et al.*, 2008).

La población RSPI38, seleccionada para la resistencia a spinosad, sólo mostró resistencia cruzada con spinetoram. Ambos insecticidas son spinosines con el mismo modo de acción, grupo 5 según la clasificación del IRAC (IRAC 2021). Este hallazgo sugeriría que el mecanismo de resistencia es una alteración en el punto de acción.

No existen estudios similares en ningún enemigo natural, sin embargo, se observó resistencia cruzada entre spinosad y spinetoram en plagas como *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Campos *et al.*, 2015), *Plutella xylostella* (Linnaeus)

(Lepidoptera: Plutellidae) (Lima *et al.*, 2016) y *Heliothis virescens* (Ochsenheimer) (Lepidoptera: Noctuidae) (Roe *et al.*, 2010). En todos estos casos, los insectos mostraron resistencia cruzada entre spinosines pero no a otros grupos de insecticidas. Además, *Musca domestica* (Linnaeus) (Diptera: Muscidae) resistente a spinosad no mostró resistencia cruzada a varios neonicotinoides y piretroides ni a otros grupos químicos (Shono *et al.*, 2003). En general, se han observado patrones similares para *H. virescens* (Roe *et al.*, 2010), *H. armigera* (Wang *et al.*, 2009), *P. xylostella* (Zhao *et al.*, 2002) y *S. exigua* (Wang *et al.*, 2006). Asimismo, nuestra población seleccionada RSPI38 tampoco mostró resistencia cruzada con insecticidas de otros grupos químicos como neonicotinoides, piretrinas y sulfoximinas.

Los sinergistas PBO, DEF y DEM, inhibidores de las enzimas de desintoxicación monooxigenasas microsomales, esterasas y glutatión S-transferasas (GST), no fueron capaces de restaurar la susceptibilidad al spinosad en la población resistente, lo que indica que la desintoxicación mediada por el metabolismo probablemente no fue responsable de la resistencia al spinosad, por lo que la resistencia no es metabólica. Hasta la fecha no se han realizado estudios con otros enemigos naturales, pero se ha informado de resultados similares en insectos como *P. xylostella* (Zhao *et al.*, 2002), *M. domestica* (Shono *et al.*, 2003), *F. occidentalis* (Bielza *et al.*, 2007) y *H. virescens* (Roe *et al.*, 2010).

Estos resultados indican que es poco probable que nuestra población de *O. laevigatus* seleccionada tenga un mecanismo de desintoxicación metabólica. Este resultado, junto con la resistencia cruzada a spinetoram y la falta de resistencia cruzada con otros insecticidas, sugiere un mecanismo de resistencia en el punto de acción.

6.5 CONCLUSIONES

En conclusión, nuestros resultados indican una variación significativa en la tolerancia al spinosad entre las poblaciones silvestres de *O. laevigatus*, y esta variabilidad fue explotada con éxito para obtener una población que muestra resistencia al spinosad.

La resistencia conseguida es suficiente para permitir la supervivencia de adultos y ninfas de *O. laevigatus* expuestos a aplicaciones de campo de spinosad durante toda la temporada de cultivo.

6.6 BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, N., Mansoor, M.M., Shad, S.A., Pathan, A.K., Waheed, A., Ejaz, M., *et al.*, 2014. Fitness cost and realized heritability of resistance to spinosad in *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Bulletin of Entomological Research* 104: 707.
- Agrobío (2021). Biological pest control and natural pollination - Side-effects. <https://www.Agrobío.es/information/side-effects/?lang=en>. Accessed 19 January 2021.
- Angeli, G., Baldessari, M., Maines, R., y Duso, C., 2005. Side-effects of pesticides on the predatory bug *Orius laevigatus* (Heteroptera: Anthocoridae) in the laboratory. *Biocontrol Science and Technology* 15: 745-754.
- Balanza, V., Mendoza, J.E., Bielza, P., 2019. Variation in susceptibility and selection for resistance to imidacloprid and thiamethoxam in Mediterranean populations of *Orius laevigatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 167: 626–635.
- Balanza, V., Mendoza, J.E., Cifuentes, D., Bielza, P., 2021. Selection for resistance to pyrethroids in the predator *Orius laevigatus*. *Pest Management Science* <https://doi.org/10.1002/PS.6288>
- Bielza, P., 2016. Insecticide resistance in natural enemies. En: Horowitz, A.R., Ishaaya, I., (eds.). *Advances in Insect Control and Resistance*. Springer. Cham, Switzerland, pp. 313-339. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-31800-4>
- Bielza, P., Balanza, V., Cifuentes, D., Mendoza, J.E., 2020. Challenges facing arthropod biological control: identifying traits for genetic improvement of predators in protected crops. *Pest Management Science* 76: 3517–3526. <https://doi.org/10.1002/ps.5857>
- Bielza, P., Quinto, V., Contreras, J., Torné, M., Martín, A., Espinosa, P.J., 2007. Resistance to spinosad in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in

- greenhouses of south-eastern Spain. *Pest Management Science* 63: 682-687.
<https://doi.org/10.1002/ps.1388>
- Biobest., 2021. Side effect manual. <https://www.biobestgroup.com/en/side-effect-manual>. Accessed 19 January 2021.
- Biondi, A., Desneux, N., Siscaro, G., Zappalà, L., 2012a. Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator *Orius laevigatus*. *Chemosphere* 87: 803-812.
- Biondi, A., Mommaerts, V., Smagghe, G., Viñuela, E., Zappalà, L., Desneux, N., 2012b. The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. *Pest Management Science* 68:1523-1536. <https://doi.org/10.1002/ps.3396>
- Broughton, S., Harrison, J., Rahman, T., 2014. Effect of new and old pesticides on *Orius armatus* (Gross)—an Australian predator of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pest Management Science* 70:389-397.
<https://doi.org/10.1002/ps.3565>
- Campos, M.R., Silva, T.B.M., Silva, W.M., Silva, J.E., Siqueira, H.A.A., 2015. Spinosyn resistance in the tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Pest Science* 88: 405-412.
- Contreras, J., Espinosa, P.J., Quinto, V., Abellán, J., Grávalos, C., Fernández, E., Bielza, P., 2010. Life-Stage Variation in Insecticide Resistance of the Western Flower Thrips (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology* 103: 2164–2168.
<https://doi.org/10.1603/EC09391>
- Dağlı, F., Bahşi, Ş.Ü., 2009. Topical and residual toxicity of six pesticides to *Orius majusculus*. *Phytoparasitica* 37: 399-405.
- De Clercq, P., Mestdagh, I., Degheele, D., 1998. Variation in susceptibility to pyriproxyfen in four laboratory strains of *Podisus maculiventris* (Say) (Het., Pentatomidae). *Journal of Applied Entomology* 122: 405-408.

- EPPO, 2003. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Standard PP 3/9 of the European Plant Protection Organization. EPPO Bulletin 33: 99–101.
- Grávalos, C., Fernández, E., Belando, A., Moreno, I., Ros, C., Bielza, P., 2015. Cross-resistance and baseline susceptibility of Mediterranean strains of *Bemisia tabaci* to cyantraniliprole. Pest Management Science 71: 1030-1036.
- Guedes, R.N.C., Roditakis, E., Campos, M.R., Haddi, K., Bielza, P., Siqueira, H.A.A., Tsagkarakou, A., Vontas, J., Nauen, R., 2019. Insecticide resistance in the tomato pinworm *Tuta absoluta*: patterns, spread, mechanisms, management and outlook. Journal Pest Science 92: 1329–1342. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01086-9>
- Guillén, J., Bielza, P., 2013. Thiamethoxam acts as a target-site synergist of spinosad in resistant strains of *Frankliniella occidentalis*. Pest Management Science 69:188-194. <https://doi.org/10.1002/ps.3372>
- Herrick, N.J., Cloyd, R.A., 2017. Direct and indirect effects of pesticides on the insidious flower bug (Hemiptera: Anthocoridae) under laboratory conditions. Journal of Economic Entomology 110: 931–940.
- Hoy, M.A., 1986. Use of genetic improvement in biological control Agriculture, Ecosystems y Environment 15: 109–119.
- IOBC-WPRS, 2021a. Pesticides and Beneficial Organisms. https://www.iobc-wprs.org/expert_groups/01_wg_beneficial_organisms.html. Accessed 19 January 2021.
- IOBC-WPRS, 2021b. IOBC-WPRS Pesticide Side Effect Database. https://www.iobc-wprs.org/ip_ipm/IOBC_Pesticide_Side_Effect_Database.html. Accessed 19 January 2021.
- IRAC, 2021. The IRAC mode of action classification online. <https://irac-online.org/modes-of-action/>. Accessed 19 January 2021
- Jones, C.M., Daniels, M., Andrews, M., Slater, R., Lind, R.J., Gorman, K., Williamson, M.S., Denholm, I., 2011. Age-specific expression of a P450 monooxygenase (CYP6CM1)

- correlates with neonicotinoid resistance in *Bemisia tabaci*. Pesticide Biochemistry and Physiology 101: 53-58.
- Jones, T., Scott-Dupree, C., Harris, R., Shipp, L., Harris, B., 2005. The efficacy of spinosad against the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, and its impact on associated biological control agents on greenhouse cucumbers in southern Ontario. Pest Management Science 61:179-185. <https://doi.org/10.1002/ps.939>
- Kim, S.Y., Ahn, H.G., Ha, P.J., Lim, U.T., Lee, J.H., 2018. Toxicities of 26 pesticides against 10 biological control species. Journal of Asia-Pacific Entomology 21: 1–8.
- Koppert, 2021. Side effects. <https://sideeffects.koppert.com/?L=28>. Accessed 19 January 2021.
- Lima, Neto, J.E., Amaral, M.H.P., Siquiera, H.A.A., Barros, R., Silva, P.A.F., 2016. Resistance monitoring of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) to risk-reduced insecticides and cross resistance to spinetoram. Phytoparasitica 44: 631-640.
- Mandour, N.S., 2009. Influence of spinosad on immature and adult stages of *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). BioControl 54: 93. <https://doi.org/10.1007/s10526-008-9161-1>
- Miles, M., 2006. The effects of Spinosad in beneficial insects and mites used in integrated pest management systems in greenhouses. Pesticides and Beneficial Organisms IOBC/wprs 29: 53-59.
- Nauen, R., Bielza, P., Denholm, I., Gorman, K., 2008. Age-specific expression of resistance to a neonicotinoid insecticide in the whitefly *Bemisia tabaci*. Pest Management Science 64: 1106-1110. <https://doi.org/10.1002/ps.1654>
- Richardson, E.B., Troczka, B.J., Gutbrod, O., Davies, T.G.E., Nauen, R., 2020. Diamide resistance: 10 years of lessons from lepidopteran pests. Journal of Pest Science 93: 911–928. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01220-y>
- Roditakis, E., Vasakis, E., García-Vidal, L., Martínez-Aguirre, M.R., Rison, J.L., Haxaire-Lutun, M.O., Nauen, R., Tsagkarakou, A., Bielza, P., 2018. A four-year survey on insecticide resistance and likelihood of chemical control failure for tomato leaf

- miner *Tuta absoluta* in the European/Asian region. *Journal of Pest Science* 91: 421-435. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0900-x>
- Roe, R.M., Young, H.P., Iwasa, T., Wyss, C.F., Stumpf, C.F., Sparks, T.C., Watson, G.B., Sheets, J.J., Thompson, G.D., 2010. Mechanism of resistance to spinosyn in the tobacco budworm, *Heliothis virescens*, *Pesticide Biochem Physiology* 96: 8–13.
- Roush, R.T., Hoy, C.W., Ferro, D.N., Tingey, W.N., 1990. Insecticide resistance in the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): influence of crop rotation and insecticide use. *Journal of Economic Entomology* 83: 315-319.
- Scott, F.J., 2004. Development and stability of insecticide resistance in the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera:Agromyzidae) to cyromazine, abamectin, and spinosad. *Journal of Economic Entomology* 97: 112-119.
- Shono, T., Scott, J.G., 2003. Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome I. *Pesticide Biochem Physiology* 75: 1-7.
- Sterk, G., Hassan, S.A., Baillod, M., Bakker, F., Bigler, F., *et al.*, 1999. Results of seventh joint pesticides testing programme carried out by the IOCB/WPRS Working Group Pesticides and Beneficial Organisms. *Biocontrol* 44: 99-117.
- Studebaker, G.E., Kring, T.J., 2003. Effects of insecticides on *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae), measured by field, greenhouse and petri dish bioassays. *Florida Entomologist* 86: 178-185.
- Thompson, D., Dutton, R., Sparks, T.C., 2000. Spinosad, a case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Management Science* 56:696-702.
- Thompson, D., Michel, K.H., Yao, R.C., Mynderse, J.S., Mosburg, C.T., Worden, T.V., Chio, E.H., Sparks, T.C., y Hutchins, S.H., 1997. The Discovery of and new class of insect control products. -Down to earth (Dow AgroSciences). 52(1): 1-5.
- Torres, J.B., 2012. Insecticide resistance in natural enemies-seeking for integration of chemical and biological controls. *Journal of Biofertilizers y Biopesticidas* 3: 1-3.
- Van de Veire, M., Klein, M., Tirry, L., 2002b. Residual activity of abamectin and spinosad against the predatory bug *Orius laevigatus*. *Phytoparasitica* 30: 525-528.

- Van de Veire, M., Sterk, G., van der Staaij, M., *et al.*, 2002a. Sequential testing scheme for the assessment of the side-effects of plant protection products on the predatory bug *Orius laevigatus*. *BioControl* 47: 101–113. <https://doi.org/10.1023/A:1014473023912>
- Van de Veire, M., Tirry, L., 2003. Side effects of pesticides on four species of beneficials used in IPM in glasshouse vegetable crops: ‘worst case’ laboratory tests. *IOBC/WPRS Bulletin* 26: 41–50.
- Van Lenteren, J.C., Alomar, O., Ravensberg, W.J., Urbaneja, A., 2020. En: Gullino, M. L., Albajes, R., Nicot, P. C., (eds.). *Integrated pest and disease management in greenhouse crops, Plant Pathology in the 21st Century*, Springer International, Cham, pp. 409–439. https://doi.org/10.1007/978-3-030-22304-5_14
- Wang, D., Qiu, X., Ren, X., Niu, F., Wang, K., 2009. Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticide Biochem Physiology* 95: 90–94.
- Wang, W., Mo, J., Cheng, J., Zhung, P., Tang, Z., 2006. Selection and characterization of spinosad resistance in *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), *Pesticide Biochem Physiology* 84: 180–187.
- Williams, T., Valle, J., Viñuela, E., 2003. Is the naturally derived insecticide spinosad compatible with insect natural enemies? *Biocontrol Science and Technology* 13: 459-475.
- Zhao, J.Z., Li, Y.X., Collins, H.L., Gusukuma-Minuto, L., Mau, R.F.L., Thompson, G.D., Shelton, A.M., 2002. Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad. *Journal of Economic Entomology* 95: 430–436. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.2.430>

7. RESPUESTA FUNCIONAL DE LA POBLACIÓN RESISTENTE A SPINOSAD EN *Myzus persicae* Y *Frankliniella occidentalis*

7.1 INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado a lo largo de este documento, a pesar de la efectividad del control biológico, en muchos cultivos protegidos aún se utilizan una amplia gama de químicos. La mayoría de las veces son utilizados sin control y presentan un gran problema de toxicidad para los artrópodos beneficiosos (Desneux *et al.*, 2007). Como ya se ha dicho en los capítulos anteriores, una alternativa al uso indiscriminado de insecticidas es la gestión integrada de plagas (GIP) (Van Lenteren y Woets, 1988). Por tanto, los insecticidas que se utilizan en GIP suelen ser menos dañinos para los organismos beneficiosos, aun así, algunos pueden ser no selectivos para ciertas especies (Medina *et al.*, 2008). Es el caso del spinosad, que como ya se ha hablado en el capítulo 6, se observa controversia entre los estudios realizados, sobre si es un insecticida favorable (Thompson y Hutchins, 1999), o tóxico para la fauna auxiliar (Williams *et al.*, 2003; Biondi *et al.*, 2012). En la agricultura actual, los agentes de control biológico (ACB) deben ser capaces no solo de sobrevivir a la fumigación con insecticidas, sino también de realizar su actividad beneficiosa (depredadora o parasitismo) bajo la exposición a insecticidas (Bielza, 2016).

En el capítulo 6, se mostraba una población que presentaba resistencia a spinosad, y resultó ser más resistente que la población comercial utilizada como referencia. También consiguió mantener la resistencia a lo largo del tiempo. Este descubrimiento supone una alternativa en GIP para solventar los problemas de compatibilidad con *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) que puedan surgir si es necesario utilizar el spinosad en un determinado momento durante el cultivo.

El objetivo de este estudio fue determinar si la población mejorada, además de presentar la particularidad de ser tolerante a spinosad, sigue conservando, o incluso puede aumentar su eficacia como agente de control biológico. Con esta finalidad, se realizaron bioensayos de laboratorio para estimar la respuesta funcional de *O.*

laevigatus. Según Holling (1959), la respuesta funcional de un depredador describe el número de presas que un individuo consume a medida que aumenta la densidad de éstas. Esto es importante, ya que el número de presas consumidas determina el desarrollo, supervivencia y reproducción de los depredadores o parasitoides (Oaten y Murdoch, 1975) y su potencial de depredación (Fernández-Arhex y Corley, 2003). Para medir la respuesta funcional de la población resistente a spinosad, se utilizaron larvas de segundo estadio de su principal presa objetivo, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). Además, se comparó con una presa alternativa, no preferida por el *Orius*, el pulgón del melocotonero *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) (Messelink *et al.*, 2011). En ambos ensayos se utilizó como referencia una población comercial de *O. laevigatus*.

7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1 Cría de insectos

La población de *O. laevigatus* seleccionada para spinosad, RSPI38, se obtuvo a través de un elaborado programa de mejora genética (ver capítulo 6). Se utilizó como referencia la población comercial de Agrobío (Almería, España, ORIconrol®). Ambas poblaciones de depredadores se mantuvieron en el laboratorio, tal y como se describe en el apartado 3.2 de materiales y métodos generales.

Myzus persicae se obtuvo de un sistema de cría realizado en la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT) a partir de diferentes poblaciones de campo recolectadas entre 2014 y 2015 en huertas de producción de melocotonero (*Prunus persica* L.) y nectarino (*Prunus persica* var. *nucipersica* L.) (Mezei *et al.*, 2020). Para la realización de los bioensayos, se tomó una muestra mixta y sincronizada de segundo estadio (3-4 días de edad) criada en plantas de pimiento dulce *Capsicum annuum* L. (cv. Herminio).

Frankliniella occidentalis también se obtuvo de un sistema de cría establecido en la UPCT a partir de poblaciones de campo recolectadas originalmente en invernaderos del sureste de España entre 2009 y 2010 y posteriormente mezcladas, como se explica en Guillén *et al.* (2014). Para la realización de los bioensayos, se proporcionaron muestras sincronizadas de segundo estadio (6-7 días de edad).

7.2.2 Capacidad de depredación y respuesta funcional

Se utilizaron ninfas de segundo estadio de *M. persicae* y larvas de segundo estadio de *F. occidentalis* como presa para las poblaciones de *O. laevigatus* bioensayadas.

Para estudiar la capacidad de depredación de *M. persicae*, se colocaron réplicas de 5, 10, 20 y 30 ninfas de segundo estadio en placas de polipropileno (38 mm de diámetro) con una sección circular de una hoja de pimiento dulce centrada boca abajo en una capa de agar al 1%. Se utilizó una tapa ventilada con una malla metálica fina para cubrir cada placa. Previamente a la realización de los bioensayos, hembras de *O. laevigatus* jóvenes (emergidas a adulto en las últimas 24 h) fueron puestas en contacto con la presa durante 24 h en botes de plástico que contenían cáscara de trigo sarraceno y un vial lleno de agua, como fuente de humedad. Después, se dejaron en ayuno durante las 24 h siguientes. Finalmente, se transfirió una sola hembra de *Orius* a cada placa. También se realizó un control para comprobar la supervivencia de las ninfas del pulgón en ausencia del depredador.

En el caso de *F. occidentalis*, las larvas de segundo estadio se colocaron en viales de plástico transparente de 5mL con una sección rectangular (30 x 5 mm) de hoja de pimiento dulce en el interior y cubiertos con una tapa cuidadosamente perforada. Para los trips de 2º estadio se evaluaron densidades de 10, 20, 30 y 50 por vial, así como un control negativo. Después de un contacto de 24 h entre las hembras de *O. laevigatus* adultas y la presa, se pusieron en ayuno otras 24 h y, posteriormente, se transfirió una sola hembra de *Orius* a cada vial.

Para cada una de las especies de presa ensayadas, se realizaron diez réplicas de cada densidad, con una hembra de *O. laevigatus* en cada una, a excepción del control, que sólo contenía a la presa. Después de 24 h, se procedió a la lectura de los bioensayos. Los depredadores fueron retirados del lugar donde se realizó el ensayo y se registró el número de presas muertas. Finalmente, las hembras de *Orius* fueron congeladas y se midió el ancho del pronoto en una lupa binocular (Leica EZ4 HD) con micrómetro a 50x.

7.2.3 Análisis estadístico

El tipo de respuesta funcional se determinó mediante análisis de regresión logística de la proporción de presas consumidas (N_c) en función de la densidad de presas inicial (N_0)

utilizando el procedimiento de modelado categórico (PROC CATMOD) del Sistema de Análisis Estadístico (SAS Institute 2001) de la siguiente manera (Trexler y Travis, 1993):

$$\frac{N_c}{N_0} = \frac{\exp(P_0 + P_1 N_0)}{1 + \exp(P_0 + P_1 N_0)}$$

Ec1

donde, N_c es el número de presas consumidas, N_0 es la densidad de presas inicial y P_0 y P_1 son los coeficientes constante y lineal, respectivamente. Para determinar el significado del término lineal de la Ec. 1 y el tipo de respuesta funcional, se utilizó la prueba logarítmica de la razón de verosimilitud, para ver si los coeficientes de la ecuación diferían significativamente de 0 (Trexler y Travis, 1993). En esta prueba, la diferencia en las probabilidades logarítmicas es un valor de chi-cuadrado (χ^2) con 1 grado de libertad. Para un tipo I, la curva de N_c / N_0 versus N_0 tiene una forma lineal si el término lineal de la Ec. 1 no es significativamente diferente de 0, mientras que un valor negativo significativo indica una respuesta de tipo II (la proporción de presas consumidas disminuye gradualmente a medida que aumenta el número inicial de presas ofrecidas) y un valor positivo significativo indica una respuesta funcional de tipo III (la proporción de presa consumida es positivamente dependiente de la densidad) (Juliano, 2001).

Entonces, la ecuación de Holling (1959) se ajustará a los resultados utilizando el procedimiento de regresión no lineal de mínimos cuadrados (PROC NLIN, SAS Institute 2001) para estimar los valores de los parámetros del depredador de la siguiente manera:

$$N_c = \frac{\alpha N_0 T}{1 + \alpha N_0 T_h}$$

donde α es la tasa de ataque instantáneo de un depredador (eficiencia de búsqueda), T es la cantidad total de tiempo disponible para la búsqueda (24 h en este experimento) y T_h es el tiempo de manipulación por presa capturada (proporción del tiempo de exposición que un depredador gasta en identificar, perseguir, matar, consumir y digerir presas). Posteriormente, los valores de T_h se utilizaron para calcular la tasa máxima de ataque como T / T_h (Hassel, 1978), que representa el número máximo de presas que podría consumir *O. laevigatus* durante 24 h. La tasa máxima de ataque mejora la

posibilidad de obtener relaciones óptimas entre depredadores y plagas, por lo que puede ser útil para acelerar la aplicación de sueltas inoculativas (Wang *et al.*, 2019).

Se verificó la normalidad de todos los recuentos y proporciones mediante el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianza (homocedasticidad) mediante el test de Levene. Para el análisis de varianza (ANOVA) y el test de regresión, transformamos los recuentos a sus valores de raíz cuadrada y las proporciones a sus valores de arcoseno si no se cumplían los supuestos de normalidad y homogeneidad. Cuando hubo diferencias significativas, la comparación entre las medias se realizó mediante el test HDS de Tukey a $P < 0,05$. Las hembras muertas fueron excluidas de los ensayos. Las diferencias entre poblaciones en el ancho del pronoto se determinaron mediante un test *t* de Student de dos caras. Se utilizó una prueba de rangos con signos de Wilcoxon para buscar diferencias en las tasas de depredación entre RSPI38 y Agrobío en *M. persicae*. Se calculó la tasa de depredación de las larvas de *F. occidentalis* mediante un ANOVA multifactorial, usando como factores la población y la densidad. Cuando las diferencias fueron significativas, se aplicó el test HDS de Tukey a $P < 0,05$. Finalmente, se utilizó una prueba de rangos con signos de Wilcoxon para comparar el número de muertos de los controles.

7.3 RESULTADOS

7.3.1 Capacidad de depredación y respuesta funcional

Hubo diferencias significativas entre las poblaciones estudiadas para el tamaño corporal (ancho del pronoto) de las hembras de *O. laevigatus* ($t_{154} = 2,771$; $P < 0,001$) obteniendo unos valores de $0,800 (\pm 0,008)$ mm para la población RSPI38 y $0,780 (\pm 0,011)$ mm para la población comercial de Agrobío (Tabla 7.1).

Al evaluar estadísticamente la tasa de depredación de *M. persicae* (Tabla 7.2), sin tener en cuenta la densidad de presa, no se observaron diferencias significativas entre las dos poblaciones, obteniendo unos valores de $67,55 \pm 8,75\%$ para la población RSPI38 y de $66,13 \pm 8,31\%$ para Agrobío (prueba de rangos con signo de Wilcoxon: $W = 837,0$; $P = 0,724$).

Tabla 7.1. Tamaño medio de las poblaciones de *Orius laevigatus* ensayadas.

Población	Tamaño \pm SE (mm)
Agrobío	0,780 \pm 0,011A
RSPI38	0,800 \pm 0,008 B

Para cada población se observan los valores, seguidos de letras mayúsculas en la misma columna que muestran si son significativamente diferentes (prueba de Tukey, $P < 0.05$).

Para larvas de *F. occidentalis*, al hacer el ANOVA multifactorial teniendo en cuenta la densidad y la población, sí se obtuvieron diferencias significativas entre RSPI38 y Agrobío en la tasa de depredación ($F_{1,77} = 10,50$; $P < 0,05$) (Tabla 7.2), observando unos valores de depredación de $87,03 \pm 4,54\%$ para RSPI38 y de $78,45 \pm 6,06\%$ para Agrobío, por lo que se puede decir que la población RSPI38 depredó un 11% más las larvas de *F. occidentalis* que Agrobío. También se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la densidad de presa que se ofreció ($F_{3,77} = 23,78$; $P < 0,001$), por lo que se observó que la respuesta funcional es denso dependiente, ya que la tasa de depredación tiene una relación directa con la densidad de presa. De esta manera, se observaron también diferencias significativas entre la interacción (población x densidad) ($F_{3,77} = 3,92$; $P < 0,05$), sobre todo a densidades altas de presa, depredando un 36% más las hembras de RSPI38 cuando se les ofreció 50 trips a cada una.

Tabla 7.2. Diferentes presas y densidades de presa consumidas por hembras adultas de *Orius laevigatus*.

Presa	Densidad de presa	Número de presas consumidas (Media \pm SE)	
		Agrobío	RSPI38
<i>Myzus persicae</i>	5	4,30 \pm 0,26 Aa	4,60 \pm 0,27 Aa
	10	8,10 \pm 0,57 Ab	8,30 \pm 0,50 Ab
	20	11,30 \pm 1,61 Abc	10,70 \pm 1,33 Ab
	30	12,78 \pm 1,66 Ac	12,60 \pm 1,86 Ab
2º estadio <i>Frankliniella occidentalis</i>	10	9,70 \pm 0,15 Aa	9,13 \pm 0,52 Aa
	20	16,30 \pm 0,70 Ab	19,33 \pm 0,44 Bb
	30	24,60 \pm 1,41 Ac	26,90 \pm 0,87 Ac
	50	26,70 \pm 1,44 Ac	36,30 \pm 1,86 Bd

Para cada presa se observan los valores, seguidos de diferentes letras minúsculas en la misma columna y letras mayúsculas en la misma fila que muestran si son significativamente diferentes (prueba de Tukey, $P < 0.05$).

El coeficiente lineal (P_1) de la regresión logística de las hembras de *O. laevigatus* sobre *M. persicae*, y larvas de *F. occidentalis* fue negativo para ambas poblaciones analizadas, Agrobío y RSPI38, lo que indica una respuesta funcional tipo II (Tabla 7.3). Se caracterizan por una curva hiperbólica: comienza con densidades de presa bajas en la abscisa. La tasa de depredación de *O. laevigatus* primero aumenta casi linealmente, a la vez que aumenta la densidad de presas hasta que se ralentiza gradualmente y alcanza un límite superior, una meseta (Figura 7.1). La pendiente y el valor de la asíntota fueron más altos para la población RSPI38 que para Agrobío, cuando se alimentó de larvas de *F. occidentalis* y no se observaron diferencias significativas cuando se ofrecieron a los pulgones como presa.

Tabla 7.3. Estimaciones de máxima verosimilitud de regresiones logísticas de la proporción de presas diferentes, atacadas por *Orius laevigatus* en función de la densidad de presa.

Población	Presa	Parámetros*	Estimación \pm SE	χ^2 **	P-value
Agrobío	<i>Myzus persicae</i>	P0	1,939 \pm 0,250	59,03	<0,0001
		P1	-0,075 \pm 0,010	52,41	<0,0001
	2º estadio <i>F. occidentalis</i>	P0	3,115 \pm 0,236	174,78	<0,0001
		P1	-0,059 \pm 0,005	114,15	<0,0001
RSPI38	<i>Myzus persicae</i>	P0	2,195 \pm 0,265	68,50	<0,0001
		P1	-0,088 \pm 0,011	65,80	<0,0001
	2º estadio <i>F. occidentalis</i>	P0	3,869 \pm 0,329	137,62	<0,0001
		P1	-0,058 \pm 0,007	60,16	<0,0001

* P_0 y P_1 son los coeficientes constante y lineal, respectivamente; ** valor de chi-cuadrado con 1 df.

Los coeficientes de tasa de ataque (α) y tiempo de manipulación (T_h) fueron los parámetros utilizados para determinar el alcance de la respuesta funcional de *O. laevigatus* (Fathipour *et al.*, 2017). En cuanto a la tasa de ataque, no se observaron diferencias significativas entre las poblaciones, en ninguna de las 2 presas (Tabla 7.4). Solo se observaron diferencias significativas en el tiempo de manipulación. RSPI38 mostró un tiempo de manipulación más corto en larvas de *F. occidentalis* (0,251 \pm 0,048 h), un 50% menos que Agrobío (0,512 \pm 0,068 h). Sin embargo, en el caso de *M. persicae*, el tiempo de manipulación fue similar y no se encontraron diferencias significativas entre poblaciones. Además, la tasa de depredación máxima teórica (T/Th) para RSPI38 (95,61) fue más del doble que la de Agrobío para las larvas de *F. occidentalis* (46,88).

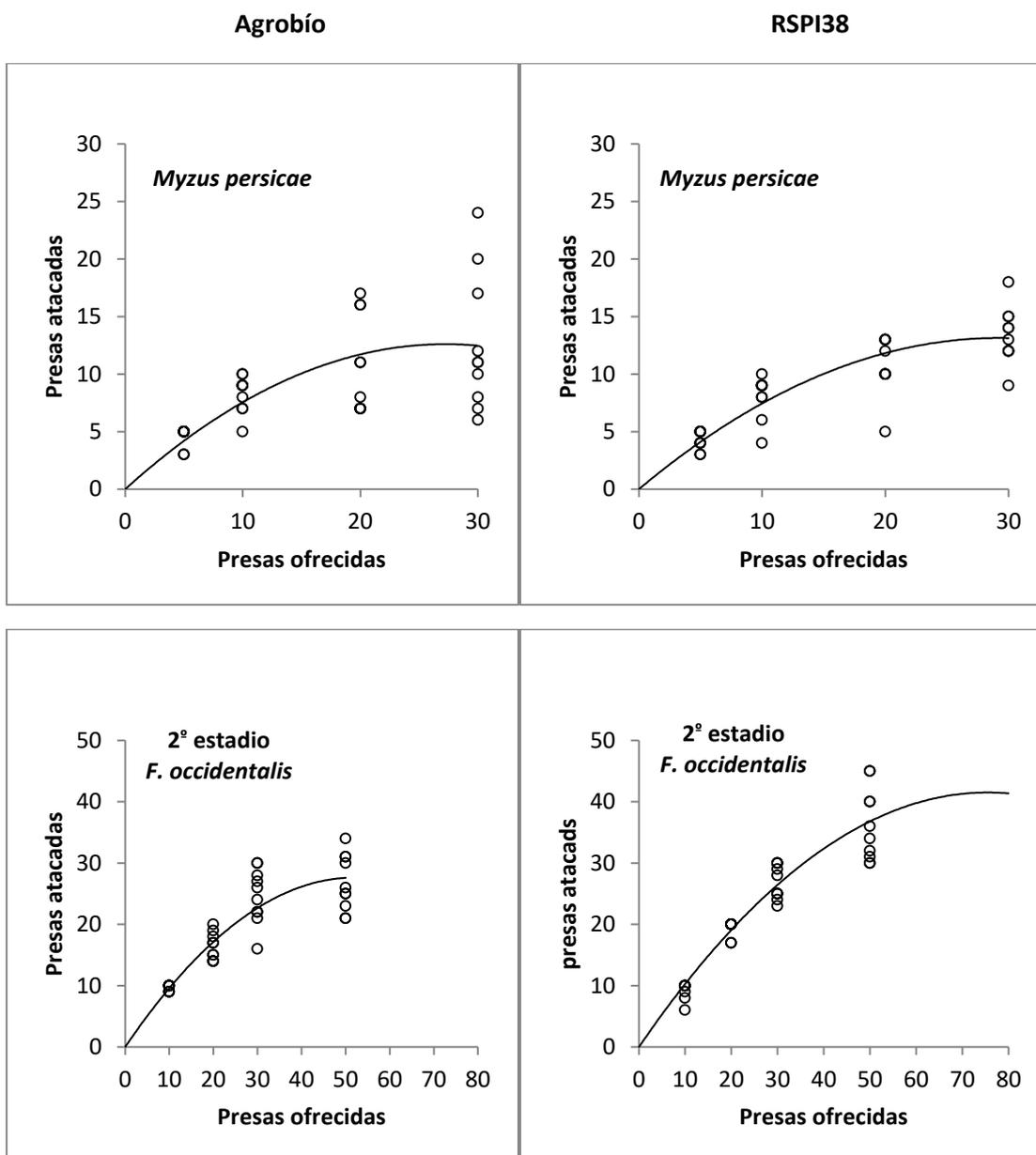


Figura 7.1. Respuesta funcional de Agrobío (izquierda) y RSPI38 (derecha) de hembras de *Orius laevis* a diferentes densidades de presa. Los puntos de datos y las líneas sólidas ajustadas representan el número de presas muertas y las predicciones del modelo de Holling (1959), respectivamente.

Las mortalidades de las presas fueron muy bajas en los controles realizados en los viales. Para ser más precisos, el número de insectos muertos que se observaron en los viales estuvo en el rango de un 3,1-4,9 % para los ensayos realizados con ambas presas, sin diferencias significativas (prueba de rangos con signo de Wilcoxon: $W= 190,0$; $P=0,696$).

Tabla 7.4. Parámetros de la respuesta funcional (RF) de *Orius laevigatus*.

Población	Presa	RF Tipo	$\alpha \pm SE$ (95% IC)	$T_h \pm SE$ (95% CI)	T/T_h	R^2	df
Agrobío	<i>Myzus persicae</i>	II	0,050 \pm 0,007 (0,035 - 0,064)	1,132 \pm 0,147 (0,834 - 1,429)	21,20	0,75	39
	2º estadio <i>F. occidentalis</i>	II	0,057 \pm 0,007 (0,042 - 0,072)	0,512 \pm 0,068 (0,374 - 0,649)	46,88	0,77	39
RSPI38	<i>Myzus persicae</i>	II	0,056 \pm 0,016 (0,023 - 0,089)	1,289 \pm 0,269 (0,745 - 1,834)	18,61	0,42	39
	2º estadio <i>F. occidentalis</i>	II	0,050 \pm 0,005 (0,040 - 0,059)	0,251 \pm 0,048 (0,152 - 0,349)	95,61	0,89	36

IC: intervalos de confianza; α : tasa de ataque (h^{-1}); T_h : tiempo de manipulación (h); T/T_h : tasa máxima teórica de depredación; R^2 son los coeficientes de determinación obtenidos de $R^2 = 1 - (\text{suma de cuadrados residuales} / \text{suma total de cuadrados})$; y df son los grados de libertad del análisis de la varianza (ANOVA) para el procedimiento de regresión no lineal (PROC NLIN, SAS Institute 2001) para estimar los valores de los parámetros.

7.4 DISCUSIÓN

Para cuantificar la capacidad de un depredador a la hora de combatir las diferentes plagas agrícolas, se ha utilizado durante años, el modelo de la respuesta funcional de Holling (Ganjisaffar y Perring, 2015; Yazdani y Keller, 2016). El tiempo de manipulación (T_h) y la tasa de ataque (α) se consideran parámetros clave, que explican las oscilaciones en las interacciones de depredadores y presas (Wang *et al.*, 2019). La respuesta funcional es uno de los métodos más importantes para evaluar la eficiencia de un depredador contra una presa (Wiedenmann y Smith, 1997) y ver el efecto sobre la población de la presa (Begon *et al.*, 1986). Nuestros resultados muestran que la población RSPI38, que ha sido seleccionada para ser resistente a spinosad, no sólo es tolerante a este insecticida, sino que mejoró el rendimiento de depredación de su presa natural, el trips.

El coeficiente lineal (P1) de la regresión logística de hembras de *O. laevigatus* a 26 °C indicó una respuesta funcional tipo II, por lo que fue negativo independientemente de la presa y población analizada. Con el aumento de la densidad de presas, el consumo total de presas de ambas poblaciones de *O. laevigatus* analizadas aumentó hasta que se alcanzó una meseta, saturándose la curva a densidades de presa más altas en RSPI38 que Agrobío, aunque sólo se observaron diferencias significativas cuando se ofreció como presa larvas de *F. occidentalis*. Esta respuesta funcional se ha dado también en

otros trabajos realizados con *O. laevigatus* (Montserrat *et al.*, 2004; Hassanpour *et al.*, 2020) pero también para otras especies de *Orius*, como *Orius insidiosus* Say (Hemiptera: Anthocoridae) en *Aphis glycines* (Matsumura) (Hemiptera: Aphididae) (Rutledge y O'Neil, 2005), *Orius albidipennis* (Reuter) (Hemiptera: Anthocoridae) sobre *Thrips tabaci* (Lind) (Thysanoptera: Thripidae) (Madadi *et al.*, 2007) y *Aphis fabae* (Scopoli) (Hemiptera: Aphididae) (Rashedi *et al.*, 2020), *O. insidiosus* en *A. gossypii* (Veiga *et al.*, 2014), *Orius tristicolor* (White) (Hemiptera: Anthocoridae) en *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Queiroz *et al.*, 2015), *Orius strigicolis* (Poppius) (Hemiptera: Anthocoridae) en *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) (Rehman *et al.*, 2020).

Aunque *O. laevigatus* se considera un depredador generalista, nuestro estudio refleja que la población RSPI38 prefiere a *F. occidentalis* sobre *M. persicae*. Existen estudios previos en los que se observa la preferencia de *O. laevigatus* sobre *F. occidentalis* (Arnó *et al.*, 2008; Bonte y De Clercq, 2010) y también se percibe en otras especies de *Orius*, como *O. insidiosus* (Isenhour y Yeorgan, 1981; Tommasini y Nicoli, 1993), *Orius sauteri* (Poppius) (Hemiptera: Anthocoridae) (Kohno y Kashio, 1998), *Orius thripoborus* (Hesse) (Hemiptera: Anthocoridae) y *Orius naivashae* (Poppius) (Hemiptera: Anthocoridae) (Bonte *et al.*, 2015). Se pudo observar que la capacidad de depredación de las poblaciones estudiadas varió cuando se les ofrecieron las 2 especies de presas, siendo el segundo estadio de *F. occidentalis* el más consumido por RSPI38, que además de ser resistente a spinosad, como se demuestra en el capítulo 6, resultó presentar una óptima depredación de las larvas de trips. Esta característica se manifiesta en los resultados por un mayor número de presas consumidas y tiempo de manipulación más corto (*Th*), lo que da lugar a tasas de depredación más altas. Que RSPI38 sea tan buena depredando larvas de trips, se puede deber al tamaño de la población, ya que la población muestra un tamaño mayor que Agrobío (Tabla 7.1), con diferencias significativas entre ambas. Es posible que en el proceso de selección con spinosad, los individuos más resistentes fueran los más grandes y se seleccionaran los 2 caracteres a la vez, como se ha expuesto en otros trabajos (Cordeiro *et al.*, 2017; Margus *et al.*, 2019). Nuestro grupo de investigación ha publicado recientemente un trabajo sobre una población de *O. laevigatus* seleccionada para gran tamaño (BIG 30) (tamaño medio=0,825 ± 0,008 mm)

(Mendoza *et al.*, 2020b), de la que se estudió posteriormente la respuesta funcional (datos no publicados). Los datos obtenidos, se pueden comparar con los de nuestra población resistente en cuanto a la relación tamaño-depredación. En RSPI38, cuando se alimentaron de larvas de segundo estadio, se obtuvo un valor de $Th = 0,251 (\pm 0,048)$ h y una $T/T_h = 95,61$, muy similar a BIG30 ($Th = 0,269 \pm 0,027$; $T/T_h = 89,22$), Th en ambas poblaciones fue la mitad que en el control y T/T_h , resultó ser más del doble. Con el trabajo anterior, se puede justificar que, a mayor tamaño de los individuos, existe una mayor tasa de depredación, por lo que nuestra población al ser de un tamaño mayor que Agrobío, es capaz de depredar un 11% más a las larvas de *F. occidentalis* y un 36% más las densidades de presa altas.

En los resultados del capítulo 6 de esta tesis, se observó claramente la capacidad de resistencia de la población RSPI38. Además, en un trabajo publicado en un congreso (Balanza *et al.*, 2019), también se demostró que, bajo condiciones de estrés, aplicando la dosis de campo de spinosad (120 mg L^{-1}) a hembras grávidas, se obtuvo una mayor fecundidad y longevidad en las hembras de la población resistente con respecto a las de Agrobío. Con los resultados anteriores y los expuestos en este capítulo, en el que se demuestra que es mejor que una población comercial depredando a *F. occidentalis*, hemos conseguido reunir en una misma población, diferentes características. Este descubrimiento es importante porque como se ha dicho a lo largo de esta tesis, en los cultivos siempre hay que hacer aplicaciones puntuales de insecticidas debido a la aparición de plagas secundarias (Salvador, 2015), así pues, teniendo una población resistente y muy voraz al mismo tiempo, ésta no desaparecerá tras la aplicación y no tendrá problemas en seguir depredando a la plaga principal.

7.5 CONCLUSIONES

La población seleccionada a spinosad, es resistente a este insecticida, no pierde capacidad de depredación y muestra una respuesta funcional hacia las larvas de trips mejor que el control.

7.6 BIBLIOGRAFÍA

- Arno, J., Roig, J., Riudavets, J., 2008. Evaluation of *Orius majusculus* and *O. laevigatus* as predators of *Bemisa tabaci* and estimation of their prey preference. *Biological Control* 44: 1-6.
- Balanza, V., Mendoza, J.E., Bielza, P., 2019. Variation in susceptibility and selection for resistance to imidacloprid and thiamethoxam in Mediterranean populations of *Orius laevigatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 167(7): 626-635.
- Balanza, V., Mendoza, J.E., Bielza, P., 2019. Resistencia a spinosad en *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae). XI Congreso Nacional de Entomología Aplicada. Madrid, España, pp. 32.
- Balanza, V., Mendoza, J.E., Bielza, P., 2020. Selection for resistance to pyrethroids in the predator *Orius laevigatus*. *Pest Management Science*. DOI: 10.1002/ps.6288
- Begon, M., Harper, J.L., Colin, R.T., 1986. *Ecology. Individuals, populations and communities*. Boston: Blackwell Scientific Publications.
- Bielza, P., 2016. Insecticide resistance in natural enemies. En: Horowitz, A.R., Ishaaya, I., (eds.). *Advances in Insect Control and Resistance*. Springer. Cham, Switzerland, pp. 313-339.
- Biondi, A., Desneux, N., Siscaro, G., Zappalà, L., 2012. Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator *Orius laevigatus*. *Chemosphere* 87(7): 803-812.
- Bonte, M. De Clercq, P., 2010. Influence of diet on the predation rate of *Orius laevigatus* on *Frankliniella occidentalis*. *BioControl* 55: 625-629. DOI: 10.1007/s10526-010-9275-0
- Bonte, M., de Hauwere, L., De Clercq, P., 2015. Predation capacity, development and reproduction of the southern African flower bugs *Orius thripoborus* and *Orius naivashae* (Hemiptera: Anthocoridae) on various prey *Biological Control* 86: 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.007>

- Cordeiro, E.M.G., Corrêa, S.A., Rosi-Denadai, C.A., Tomé, H.V.V., Guedes, R.N.C., 2017. Insecticide resistance and size assortative mating in females of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). *Pest Management Science* 73: 823–829.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review Entomology* 52: 81-106.
- Fathipour, Y., Karimi, M., Farazmand, A., Talebi, A.A., 2017. Age-specific functional response and predation rate of *Amblyseius swirskii* (Phytoseiidae) on two-spotted spider mite. *Systematic and Applied Acarology* UK 22: 159-169.
- Fernández-Arhex, V., Corley, J.C., 2003. The functional response of parasitoids and its implications for biological control. *Biocontrol science and Technology*. 132: 403-413.
- Ganjisaffar, F., Perring, T.M., 2015. Prey stage preference and functional response of the predatory mite *Galendromus flumenis* to *Oligonychus pratensis*. *Biological Control* 82: 40–45. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2014.12.004.
- Guillen, J., Navarro, M., Bielza, P., 2014. Cross-resistance and baseline susceptibility of spirotetramat in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology* 107 (3): 1239-1244. <https://doi.org/10.1603/EC13397>
- Hassanpour, M., Yaghmaee, A., Golizadeh, A., Rafiee-Dastjerdi, H., Mottaghinia, L., 2020. Functional response and consumption rate of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) feeding on the melon aphid *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) at three different temperatures. *Journal of Crop Protection* 9(1): 101-113.
- Hassel, M.P., 1978. The dynamics of arthropod predator-prey systems. Princeton, University Press, Princeton, NJ, pp. 237.
- Holling, C.S., 1959. Some characteristics of simple types of predation and parasitism. Sugerencia: Buscar solo resultados en español. Puedes especificar tu idioma de búsqueda en Preferencias. *The Canadian Entomologist* 91: 385-389.
- Isenhour, D.J., Yeagan, K.V., 1981. Predation by *Orius insidiosus* on the soybean thrips, *Sericothrips variabilis*: Effect of prey stage and density. *Environmental Entomology* 10: 496–500.

- Juliano, S.A., 2001. Non-linear curve fitting: predation and functional response curves. En: Scheiner, S.M., Gurevitch, J., (eds.), Design and Analysis of Ecological Experiments. Chapman and Hall. pp. 178-196.
- Kohno, K., Kashio, T., 1998. Development and prey consumption of *Orius sauteri* (Poppius) and *O. minutus* (L.) (Heteroptera: Anthocoridae) fed on *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). Applied Entomology and Zoology 33: 227-230.
- Madadi, H., Enkegaard, A., Brodsgaard, H., Kharrazi-Pakdel, A., Mohaghegh, J., Ashouri, A., 2007. Host plant effects on the functional response of *Neoseiulus cucumeris* to onion thrips larvae. Journal of Applied Entomology 131: 728-733. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2007.01206.x>
- Margus, A., Piironen, S., Lehmann, P., Tikka, S., Karvanen, J., Lindström, L., 2019. Sublethal Pyrethroid Insecticide Exposure Carries Positive Fitness Effects Over Generations in a Pest Insect. Scientific Reports 9: 11320. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47473-1>
- Medina, P., Adán, A., Del estal, P., Budia, F., Viñuela, E., 2008. Integración del control biológico con otros métodos de control. En: Jacas, A., Urbaneja, A., (eds.). Control biológico de plagas agrícolas. Phytoma-España, Valencia, 469-476.
- Mendoza, J.E, Balanza, V., Cifuentes, D., Bielza, P., 2020a. Genetic improvement of *Orius laevigatus* for better fitness feeding on pollen. Journal of Pest Science 1-14.
- Mendoza, J.E., Balanza, V., Cifuentes, D., Bielza, P., 2020b. Selection for larger body size in *Orius laevigatus*: Intraspecific variability and effects on reproductive parameters. Biological Control 148: 104310. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104310>
- Messelink, G. J., Bloemhard, C. M. J., Kok, L., Janssen, A. 2011. Generalist predatory bugs control aphids in sweet pepper. IOBC/WPRS Bull. 68: 115-118.
- Mezei, I., Bielza, P., Siebert, M.W., Torne, M., Gomez, L.E., Valverde-Garcia, P., Belando, A., Moreno, I., Gravalos, C., Cifuentes, D., Sparks, T.C., Sulfoxaflor efficacy in the laboratory against imidacloprid-resistant and susceptible populations of the

- green peach aphid, *Myzus persicae*: Impact of the R81T mutation in the nicotinic acetylcholine receptor. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 166: 104582. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104582>
- Montserrat, M., Albajes, R., Castañe, C., 2000. Functional response of four heteropteran predators preying on greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) and western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). *29*: 1075-1082. DOI: 10.1603/0046-225X-29.5.1075
- Oaten, A., Murdoch, W.W., 1975. Functional response and stability in predator-prey Systems. *The America Naturalist*. 109: 289-298.
- Queiroz, O.S., Ramos, R.S., Gontijo, L.M., Picanço, M.C., 2015. Functional response of three species of predatory pirate bugs attacking eggs of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Environmental Entomology* 44: 246-251.
- Rashedi, A., Rajabpour, A., Sohani, N.Z., Rasekh, A., 2020. Prey stage preference and functional response of *Orius albidipennis* (Hemiptera: Anthocoridae) to *Aphis fabae* (Homoptera: Aphididae). *International Journal of Tropical Insect Science* 40: 13-19. <https://doi.org/10.1007/s42690-019-00045-2>
- Rehman, S.U., Zhou, X., Ali, S., Asim Rasheed, M., Islam, Y., Hafeez, M., Aamir Sohail, M., Khurram, H., 2020. Predatory functional response and fitness parameters of *Orius strigicollis* Poppius when fed *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* as determined by age-stage, two-sex life table. *PeerJ*. 8: e9540. <http://doi.org/10.7717/peerj.9540>
- Rutledge, C.E., O'Neil, R.J., 2005. *Orius insidiosus* (Say) as a predator of the soybean aphid, *Aphis glycines* Matsumura. *Biological Control* 33: 56-64.
- Salvador, F.J., 2015. Manejo de plagas secundarias en pimiento. Jornada Técnica "Cultivo del Pimiento en Murcia". Fundación Cajamar.
- SAS Institute, 2001. SAS/STAT user's guide. Cary, NC: SAS Institute.
- Thompson, G., Hutchins, S., 1999. Spinosad. *Pesticide Outlook* 10: 78-81.
- Tommasini, M.G., Nicoli, G., 1993. Adult activity of four *Orius* species reared on two preys. *IOBC-WPRS Bull* 16: 181-184.

- Trexler, J.C., Travis, J., 1993. Nontraditional regression analysis. *Ecology* 74: 1629-1637.
- Van Lenteren, J.C., Woest, J., 1988. Biological and integrated pest control in greenhouses. *Annual Review Entomology* 33: 239-269.
- Veiga, A.C.P., de Laurentis, V.L., Vacari, A.M., Volpe, H.X.L., Ramalho, D.G., De Bortoli, A.A., 2014. Behavior of *Orius insidiosus* preying on *Aphis gossypii* reared on transgenic and conventional cotton varieties. *Acta Scientiarum* 36: 273-279.
- Wang, S-X., Di, N., Chen, X., Zhang, F., Biondi, A., Desneux, N., Wang, S., 2019. Life history and functional response to prey density of the flower bug *Orius sauteri* attacking the fungivorous sciarid fly *Lycoriella pleuroti*. *Journal of Pest Science* 92: 715-722.
- Wiedenmann, R.N., Smith, J.W., 1997. Attributes of natural enemies in ephemeral crop habitats. *Biological Control* 10: 16-22.
- Williams, T., Valle, J., Viñuela, E., 2003. Is the Naturally Derived Insecticide Spinosad Compatible with Insect Natural Enemies? *Biocontrol Science and Technology* 13(5): 459-475.
- Yazdani, M., Keller, M., 2016. The shape of the functional response curve of *Dolichogenidea tasmanica* (Hymenoptera: Braconidae) is affected by recent experience. *Biological Control* 97: 63–69. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2015.05.004

8. CONCLUSIONES GENERALES

- ❖ En los resultados obtenidos se muestra que existe una variabilidad genética en la susceptibilidad a todos los insecticidas ensayados (imidacloprid, tiametoxam, lambda-cihalotrín y spinosad), en poblaciones silvestres y comerciales de *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae).
- ❖ Se observó que las poblaciones de *O. laevigatus* presentaron más susceptibilidad a tiametoxam que a imidacloprid, aunque ambos insecticidas sean del grupo de los neonicotinoides.
- ❖ Se consiguieron seleccionar poblaciones de *O. laevigatus* resistentes a los neonicotinoides a partir de poblaciones silvestres nunca expuestas a insecticidas. Estas poblaciones resistentes podrían aportar una adopción más amplia del control biológico dentro de la gestión integrada de plagas (GIP), permitiendo aplicaciones puntuales de estos compuestos sin que se viera afectado el enemigo natural.
- ❖ Se seleccionó una población resistente a piretroides y piretrinas naturales (RLCH18). Esta población podría usarse en cultivos ecológicos y en GIP, si es necesaria la aplicación puntual de estos compuestos para el control de plagas principales y secundarias, y así mejorar la implementación de los protocolos de control biológico.
- ❖ La población RLCH18, seleccionada por su resistencia a lambda-cihalotrín mostró resistencia cruzada a los piretroides cipermetrina y deltametrina, pero no al acrinatrín. También mostró resistencia a compuestos de otros grupos químicos, como el spinosad y la emamectina benzoato, pero no a los neonicotinoides ni al indoxacarb. Esta resistencia cruzada entre compuestos con diferentes modos de acción sugiere la participación de enzimas de desintoxicación.
- ❖ Al igual que se consiguió para la resistencia a neonicotinoides y piretroides, logramos una población resistente a spinosad (RSPI38) aprovechando la variación natural de tolerancia presente en las poblaciones silvestres.

- ❖ Además, la población RSPI38 es capaz de mantener la resistencia a lo largo del tiempo, al menos después de 10 generaciones sin exposición al insecticida. La estabilidad del rasgo seleccionado es suficiente para cubrir un ciclo completo de cultivo de hortalizas (4-8 meses), incluso si la población mejorada genéticamente se libera al inicio del cultivo.
- ❖ En las poblaciones RLCH18 y RSPI38, una mayor supervivencia de las ninfas expuestas a los insecticidas puede conducir a una mejor recuperación de la población a pesar de que exista una mortalidad en los adultos. Además, la liberación de ninfas del último estadio después de las pulverizaciones de insecticidas puede acortar el periodo de seguridad para la reintroducción en el cultivo. Esto es importante porque el efecto global sobre una determinada especie a nivel demográfico y su capacidad de recuperación depende de la susceptibilidad al insecticida en sus diferentes estadios de desarrollo.
- ❖ La población seleccionada para la resistencia a spinosad, sólo mostró resistencia cruzada con spinetoram. Ambos insecticidas son spinosines con el mismo modo de acción. Este hallazgo sugeriría que el mecanismo de resistencia se da el punto de acción. Esto coincide con que los sinergistas no fueron capaces de reducir la resistencia en la población RSPI38.
- ❖ La población RSPI38 muestra una respuesta funcional hacia las larvas de trips mejor que el control, por lo que no solo es resistente a spinosad, sino que depreda muy bien a su presa principal.