

FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES



CONTROL BIOLÓGICO DE LA POLILLA DEL TOMATE *TUTA ABSOLUTA*
(LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) MEDIANTE LA GESTIÓN DE MÍRIDOS
DEPREDADORES

Memoria presentada por Óscar Mollá Hernández, para optar al grado de
Doctor en Biodiversidad por la *Universitat de València*.

Director:

Dr. Alberto Urbaneja García

València 2013

Don Alberto Urbaneja García, Doctor Ingeniero Agrónomo por la Universitat Politècnica de València e Investigador Principal en la Unidad de Entomología del Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigación Agraria.

CERTIFICA

Que Óscar Mollá Hernández, Licenciado en Ciencias Biológicas por la *Universitat de València*, ha realizado bajo su dirección la tesis que lleva por título: “Control biológico de la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) mediante la gestión de míridos depredadores”, para optar al grado de doctor por la *Universitat de València*.

Y para que conste en el cumplimiento de la legislación vigente, firmó el presente certificado en Moncada a 4 de abril de 2013

Fdo.: Alberto Urbaneja García

A mi tío y padrino, Silvino...donde quiera que esté.

Agradecimientos

Sin duda, uno de los momentos más complicado de esta tesis ha sido escribir estas líneas, pues es muy difícil resumir todo mi agradecimiento en una sola hoja, haré lo posible por ser breve y no olvidarme de nadie.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias al Dr. Alberto Urbaneja, durante esta larga etapa en el IVIA ha sido mi tutor de prácticas, jefe, y director de tesis, pero lo más importante, siempre amigo. Gracias por todo tu apoyo tanto a nivel profesional como personal.

A Miquel Alonso, por su apoyo técnico. Gracias a él y a José Catalán por su amistad y confianza, por sus consejos y por ser un gran apoyo durante estos años.

A Jesús Estellés, por el apoyo técnico prestado durante mi primer año de tesis.

A Koppert Biological Systems por el suministro de los insectos necesarios para la realización de este trabajo, en especial al Dr. Javier Calvo por su paciencia.

Al Dr. Joel González por todo el trabajo que realizamos juntos. A él y al Dr. Alejandro Tena quiero darles las gracias por sus consejos profesionales y personales.

Al Dr. César Monzó, por ser el primero en confiar en mí. Gracias amigo.

Al resto de compañeros que han pasado o todavía siguen en el departamento de entomología de la unidad asociada IVIA-UJI: Alfons, Amparo, Bea, Consuelo, Cristian, Dembi, Elena, Félix, Francesc, Helga, Josep, Laura, Luís de Pedro, Manuel Piquer, María, Marta, Marian, Mónica, M^a Jesús, M^a José, Pablo B., Pablo U. (gracias por la ayuda en los ensayos y tus consejos), Paco, Pili, Poli, Raquel, Ruth, Sandra, Sara, Tati, Tina y Viky. Os echaré de menos en esta nueva etapa que comienzo.

A mis amigos de la universidad (en los que incluyo al grupo grandes amigos), a mis amigos del máster, y a los HyD. No puedo nombraros uno a uno porque sois muchos. En especial a los que todavía estais ahí, apoyándome a pesar de que pasen los años.

A mi gente, mis amigos de Bicorp, a los que tampoco puedo nombrar uno a uno, pues no hay suficiente espacio. Gracias por estar ahí, y aguantar mis momentos de agobio.

A mi familia, sin ellos no sería ahora la persona que soy. En especial a mis padres y a mi hermano, quienes me han enseñado que soy capaz de alcanzar mis metas y sin los cuales no habría llegado hasta donde ahora me encuentro.

Resumen

La polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) es una plaga clave en el cultivo del tomate en Sudamérica de donde es originaria. Esta plaga es capaz de provocar pérdidas del 100% en el cultivo si no se adoptan medidas para su control, ya que sus larvas se alimentan vorazmente de hojas, tallos y frutos. A finales de 2006 se detectó su presencia en Castellón (España) y desde entonces se ha expandido rápidamente a otros países de la Cuenca Mediterránea, norte y centro de Europa y Oriente Medio. *Tuta absoluta* apareció en España sin la presencia de enemigos naturales que pudiesen regular sus poblaciones, lo cual desató pérdidas importantes en este cultivo y obligó a combatirla químicamente como medida de urgencia para su control. El miedo a la aparición de resistencia a plaguicidas, tal y como ocurrió en su zona de origen, y la necesidad de utilizar otros métodos de control que redujesen los residuos en fruto y no fuesen perjudiciales para el medioambiente y para la fauna auxiliar, obligó a redirigir el control de este fitófago hacia estrategias de gestión integrada de plagas (GIP) centradas principalmente en el control biológico.

Tras la detección de *T. absoluta* en España, los depredadores polípagos *Nesidiocoris tenuis* Reuter y *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Hemiptera: Miridae) se observaron depredando tanto huevos como larvas de este fitófago en el cultivo del tomate. El hecho de que estos dos depredadores ya se utilizaran en el control biológico de moscas blancas en el cultivo de tomate en invernadero, hizo pensar que ambos depredadores podrían ser

agentes potenciales de control biológico de esta nueva plaga. Por ello, el objetivo general de esta tesis doctoral fue evaluar la viabilidad de estos míridos como agentes de control biológico de *T. absoluta*, así como establecer estrategias de manejo mediante la gestión estos míridos para el control de *T. absoluta* en el cultivo del tomate.

Como **primer objetivo** se estudiaron los parámetros biológicos de *N. tenuis* y *M. pygmaeus* utilizando como presa huevos de *T. absoluta* para evaluar la idoneidad de esta presa. Las dos especies fueron capaces de completar su ciclo biológico. Sin embargo, *M. pygmaeus* apenas produjo descendencia, lo que conllevó que los parámetros demográficos de *N. tenuis* fueran mayores que los de *M. pygmaeus* (p.e. la tasa intrínseca de desarrollo fue de 0,127 y 0,005, respectivamente). A partir de estos resultados se reenfocó el estudio únicamente en el manejo de *N. tenuis*.

Dado que *N. tenuis* es un depredador muy voraz de moscas blancas en el cultivo de tomate, su presencia en el cultivo junto a *T. absoluta* podría influir en el comportamiento depredador de *N. tenuis* sobre ambas presas. Por ello, **el segundo objetivo** fue evaluar la capacidad de *N. tenuis* para detectar plantas infestadas por la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) y *T. absoluta* mediante el uso de un olfactómetro, así como su preferencia cuando ambas presas coexisten. *Nesidiocoris tenuis* fue capaz de detectar plantas infestadas tanto por huevos como por estadios inmaduros de ambas plagas, escogiendo siempre plantas infestadas frente a plantas sin infestar. Además, *N. tenuis* mostró clara preferencia entre plantas infestadas con larvas de *T. absoluta* frente a plantas infestadas por ninfas de *B. tabaci*. Por el contrario, este depredador

fue incapaz de discriminar entre plantas infestadas por huevos de ambas especies de fitófagos. En cuanto al estudio de consumo y preferencia de presa, *N. tenuis* prefirió alimentarse de huevos de *T. absoluta* en presencia de huevos, ninfas y adultos de *B. tabaci*. La habilidad de *N. tenuis* para detectar plantas infestadas con estos fitófagos plaga facilitaría la localización de focos iniciales de ambas plagas en el cultivo. Además su capacidad de depredar ambas plagas, aunque éstas coexistan en una misma planta, contribuiría en gran medida a su instalación, y por lo tanto al control de las mismas.

En estudios previos de semicampo se observó que *N. tenuis*, una vez instalado en el cultivo, era capaz de controlar las poblaciones de *T. absoluta*. Por ello, el **tercer objetivo** fue poner a punto una estrategia que permitiese la instalación de *N. tenuis* en el cultivo del tomate antes de que las poblaciones naturales de *T. absoluta* alcancen la categoría de plaga. Con tal finalidad se estudió el uso combinado de tratamientos semanales de *Bacillus thuringiensis* Berliner (por acción larvicida sobre *T. absoluta*), con la inoculación de *N. tenuis* (que prefiere alimentarse sobre huevos de esta plaga). Los tratamientos con *B. thuringiensis* redujeron las poblaciones de *T. absoluta* mientras el depredador aumentaba sus poblaciones alimentándose de huevos del fitófago. Cuando el depredador estuvo instalado en el cultivo, los tratamientos con *B. thuringiensis* ya no fueron necesarios recayendo el control exclusivamente sobre *N. tenuis*. Nuestros resultados mostraron que la combinación de ambos enemigos naturales fue altamente efectiva en el control de *T. absoluta*, y que la aplicación de *B. thuringiensis* no afectó a la instalación de *N. tenuis* en el cultivo.

Una característica que presenta la familia de los míridos es su comportamiento zoofitófago. *Nesidiocoris tenuis* puede afectar negativamente a la producción final del cultivo cuando sus poblaciones son elevadas y hay una carencia de presas. El **cuarto objetivo** de este trabajo doctoral fue evaluar si elevadas poblaciones de *N. tenuis* en el cultivo podrían afectar a la producción final a pesar de la presencia de *T. absoluta*. Nuestros resultados demostraron que bajo ciertas condiciones, *N. tenuis* puede afectar a la producción final a pesar de tener disponibilidad de presa (huevos de *T. absoluta*).

En líneas generales se puede concluir que el mírido *N. tenuis* es un agente de control biológico efectivo en el control de *T. absoluta* en el cultivo de tomate y que, debido a su polifagia, es capaz de regular las poblaciones de varios fitófagos plaga. Sin embargo, es necesario hacer un seguimiento regular de *N. tenuis* y de sus posibles presas, de manera que se pueda reaccionar antes de que *N. tenuis* ocasione daños en la planta por falta de presas. La utilización de este depredador en estrategias de gestión integrada de plagas reducirá la dependencia de plaguicidas en el cultivo del tomate.

Abstract

The tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) is originally from South America, where it is considered one of the most devastating pests of tomato crops. Larvae can infest leaves, flowers, stems and fruit, causing important losses of up to 100% in tomatoes where no control strategies are applied. At the end of 2006, *T. absoluta* was detected in Spain (Castellón). Since then, it was quickly spread to other countries in the Mediterranean Basin, Center-North of Europe and Middle East. *Tuta absoluta* appeared in Spain in absence of native natural enemies, causing important losses in tomato crops. Since *T. absoluta* was detected in the Mediterranean Basin, the most common control practice has been based on the use of chemical insecticides. However, these treatments may disrupt the existing integrated pest management programs in tomato crops also based on biological control, since pesticides may have side effects on natural enemies and they may lead to resistance, as documented in the area of origin of this pest. Therefore, implementation of environmentally safe measures to manage *T. absoluta* while limiting the use of chemical insecticides was urgently crucial.

Soon after the detection of *T. absoluta* in Spain, the polyphagous predators *Nesidiocoris tenuis* Reuter and *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Hemiptera: Miridae) were observed preying upon both eggs and larvae of *T. absoluta*. The fact that these predators were mass-reared and released in inoculative and conservation control programs of whiteflies mainly in protected crops showed both predator species as potential biological

control agents of this new pest. The aim of this study was to evaluate the potential of both predatory bugs as biological control agents of *T. absoluta* in order to establish management strategies using these predators to control *T. absoluta* in tomato crops.

As a **first step**, life history traits of *N. tenuis* and *M. pygmaeus* were studied in the laboratory when they fed exclusively upon eggs of *T. absoluta* to know the suitability of this prey for both predators. Immature stages of both predator species developed successfully on the new prey, while the developed *M. pygmaeus* females produced few offspring. This resulted in higher estimated demographical parameters for *N. tenuis* when compared to *M. pygmaeus* (e.g. the intrinsic rates of increase were 0.127 and 0.005, respectively). After these results, we based our work on *N. tenuis*.

Since *N. tenuis* is an aggressive predator of whiteflies in tomato crops, the occurrence of them with *T. absoluta* could influence in the predatory behaviour of *N. tenuis* upon both preys. As a **second step**, we evaluated the capacity of *N. tenuis* detecting plants infested with *T. absoluta* and *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) and its preference and consumption among eggs of *T. absoluta* and eggs, nymphs and adults of *B. tabaci*. *Nesidiocoris tenuis* was able to detect plants infested with eggs or immature stages of both preys rather than non infested plants. Furthermore, *N. tenuis* showed a preference for plants infested with *T. absoluta* larvae rather than for plants infested with *B. tabaci* nymphs. However, *N. tenuis* did not show preference between plants infested with eggs of both species. The results obtained in the study of consumption showed that *N. tenuis* was able to feed on *T. absoluta* eggs in presence of

eggs, nymphs and adults of *B. tabaci*. The capacity of *N. tenuis* to detect plants infested with these phytophagous pests makes possible to locate it in initial patches, while the capacity of preying upon both preys may contribute to establish the predator in the crop.

Previous studies showed that when *N. tenuis* is well-established in the crop, *T. absoluta* control is possible. The **third step** consisted in establishing a strategy that allowed the establishment of *N. tenuis* in the crop before *T. absoluta* populations reach the level of pest. To achieve this target, the combination of releases of *N. tenuis* with treatments of *Bacillus thuringiensis* Berliner was tested under greenhouse conditions. The hypothesis tested in this work was based on the finding that good control of young *T. absoluta* larvae can be achieved with *B. thuringiensis*. Such successful control may favor the increase and establishment of *N. tenuis* populations, which prey mainly on *T. absoluta* eggs. Our results revealed that when *B. thuringiensis* treatments are applied immediately after the initial detection of *T. absoluta* on plants, they do not interfere with *N. tenuis* establishment in the crop because *T. absoluta* eggs are available. According to our data, treatments with *B. thuringiensis* later in the growing season (when *N. tenuis* is well-established) would no longer be necessary because mirids alone would control the pest.

Nesidiocoris tenuis shows a zoophytophagous behavior, which may affect yield under certain conditions. The **fourth step** of this study was evaluate if the injury of *N. tenuis* produced in tomato plants under extreme conditions with high populations of the predator in the crop, could reduce the yield.

Our results showed that *N. tenuis* may cause yield reductions, but only when populations of this predator are really high.

Our research led us to conclude that *N. tenuis* is a good biological control agent of *T. absoluta* in tomato crops and its polyphagous behavior allows it to contribute in the control of other pests. However, it is necessary to carry out a regular sampling of *N. tenuis* populations and their potential preys in tomato crop. This sampling will led us to anticipate and predict the potential plant damage inflicted by *N. tenuis*. The use of this predator in Integrated Pest Management (IPM) strategies will reduce the use of pesticides in tomato crops.

Índice general:

1. Introducción general	1
1.1. El cultivo del tomate.....	2
1.1.1. Importancia económica	2
1.1.2. Principales fitófagos plaga del cultivo del tomate y su control biológico.....	2
1.2. La polilla del tomate <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)	5
1.2.1. Descripción y ciclo biológico	7
1.2.2. Biología y parámetros biológicos	10
1.2.3. Sintomatología y daños.....	11
1.2.4. Hospederos secundarios	13
1.2.5. Métodos de control	13
1.2.5.1. Control cultural	14
1.2.5.2. Control químico	15
1.2.5.3. Control biotecnológico	17
1.2.5.4. Control biológico	20

1.3. Míridos depredadores: <i>Nesidicoris tenuis</i> y <i>M. pygmaeus</i>	29
1.3.1. Ciclo biológico de <i>N. tenuis</i> y <i>M. pygmaeus</i>	30
1.3.2. Zoofitofagia	33
1.3.3. Míridos como agentes de control biológico en tomate.....	35
1.3.4. Míridos como agentes de control biológico de <i>T. absoluta</i>	37
2. Justificación y objetivos.....	38
3. Material y métodos	40
3.1. Estudio comparativo de los parámetros biológicos de dos míridos depredadores sobre huevos de <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) y de <i>Ephestia kuehniella</i> (Zeller) (Lepidoptera: Pyrelidae) sobre tomate: Implicaciones para el control biológico.....	41
3.1.1. Insectos y material vegetal	42
3.1.2. Tiempo de desarrollo y supervivencia de los estadios juveniles ...	43
3.1.3. Parámetros reproductivos	44
3.1.4. Parámetros demográficos.....	46
3.1.5. Análisis estadístico	48

3 2. Detección y preferencia de presa entre <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) y <i>Bemisia tabaci</i> Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae).por el depredador <i>Nesidiocoris tenuis</i> Reuter (Hemiptera: Miridae).....	49
3.2.1. Insectos y material vegetal	50
3.2.2. Ensayo con el olfactómetro de tubo en forma de “Y”	50
3.2.3. Preferencia de presa y consumo.....	54
3.2.3.1. Preferencia entre dos presas ofrecidas en exceso	54
3.2.3.2. Preferencia entre presas ofrecidas en número limitado.....	56
3.2.4. Análisis estadístico	58
3 3. Uso combinado de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner) y <i>Nesidiocoris tenuis</i> Reuter (Hemiptera: Miridae) en el control de <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae).....	60
3.3.1. Instalaciones	61
3.3.2. Condiciones ambientales	61
3.3.3. Manejo del cultivo	62
3.3.4. <i>Tuta absoluta</i> y enemigos naturales.....	63
3.3.5. Diseño experimental	64
3.3.6. Muestreos	66

3.3.7. Análisis estadístico	67
3 4. Daños producidos en planta por <i>Nesidiocoris tenuis</i> Reuter (Hemiptera: Miridae), en presencia de <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae).....	68
3.4.1. Instalaciones	69
3.4.2. Condiciones ambientales	69
3.4.3. Manejo del cultivo	69
3.4.4. <i>Tuta absoluta</i> y enemigos naturales.....	70
3.4.5. Diseño experimental	71
3.4.6. Muestreos	73
3.4.7. Análisis estadístico	74
4. Resultados y desarrollo argumental.....	75
4. 1. Estudio comparativo de los parámetros biológicos de dos míridos depredadores sobre huevos de <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) y de <i>Ephestia kuehniella</i> (Zeller) (Lepidoptera: Pyrelidae) sobre tomate: Implicaciones para el control biológico.....	76
4.1.1. Resultados.....	77

4.1.1.1. Tiempo de desarrollo y supervivencia de los estadios juveniles	77
4.1.1.2. Parámetros reproductivos.....	82
4.1.1.3. Índices demográficos.....	85
4.1.2. Discusión	87
4. 2. Detección y preferencia de presa entre <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) y <i>Bemisia tabaci</i> Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) por el depredador <i>Nesidiocoris tenuis</i> Reuter (Hemiptera: Miridae).....	92
4.2.1. Resultados.....	93
4.2.1.1. Ensayo con el olfactómetro vertical en forma de “Y”	93
4.2.1.2. Preferencia de presa y consumo	95
4.2.1.2.1. Preferencia entre dos presas ofrecidas en exceso	95
4.2.1.2.2. Preferencia entre presas ofrecidas en número limitado.....	98
4.2.2. Discusión	101
4. 3. Uso combinado de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner) y <i>Nesidiocoris tenuis</i> Reuter (Hemiptera: Gelechiidae) en el control de <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae).....	107
4.3.1.Resultados	108

4.3.1.1. Daño en planta.....	108
4.3.1.2. Poblaciones de <i>N. tenuis</i>	110
4.3.1.3. Anillos necróticos.....	112
4.3.1.4. Efecto de los tratamientos Bt/ <i>N. tenuis</i> en la producción.....	113
4.3.2. Discusión	115
4.4. Daños producidos en planta por <i>Nesidiocoris tenuis</i> Reuter (Hemiptera: Gelechiidae), en presencia de <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae).....	120
4.4.1. Resultados	121
4.4.1.1 Daño en planta.....	121
4.4.1.2. Poblaciones de <i>N. tenuis</i>	123
4.4.1.3. Anillos necróticos.....	125
4.4.1.4. Efecto de los míridos en la producción.....	126
4.4.2. Discusión	129
5. Conclusiones generales.....	133
6. Bibliografía.....	136

Listado de figuras :

Figura 1.1. Mapa de distribución mundial de <i>T. absoluta</i> (fuente: EPPO, consulta noviembre 2012).	6
Figura 1.2. Puesta de <i>T. absoluta</i> en hoja de tomate (A), larva de primer estadio (B), larva de segundo estadio (C), larva de tercer estadio (D), larva de cuarto estadio (E), y pupa (F).	9
Figura 1.3. Dimorfismo sexual de <i>T. absoluta</i> . El macho a la izquierda, presenta un abdomen más estilizado, mientras la hembra a la derecha presenta un abdomen más abombado.	10
Figura 1.4. Daño producido por <i>T. absoluta</i> . Se pueden observar las galerías translucidas que produce en los folíolos al alimentarse del mesófilo (A), daños en tallo (B) y daños en fruto (C).....	12
Figura 1.5. Trampa delta colocada en un cultivo de tomate (A). Visión del interior de una trampa delta donde se observa el cartón con pegamento y el difusor de feromona (B).	18
Figura 1.6. Trampa de agua colocada en un invernadero de tomate.	19
Figura 1.7. Larva de <i>N. artynes</i> parasitando una larva de segundo estadio de <i>T. absoluta</i> . En la parte superior derecha se puede observar una pupa de <i>N. artynes</i> y en la parte inferior derecha un macho adulto.....	23
Figura 1.8. Algunos de los depredadores citados sobre <i>T. absoluta</i> en España. (A) <i>N. tenuis</i> , (B) <i>M. pygmaeus</i> , (C) <i>N. pseudoferus</i> y (D) <i>D. marrocanus</i>	25

Figura 1.9. Larvas de <i>T. absoluta</i> muertas por el efecto de <i>B. thuringiensis</i>	27
Figura 1.10. Adulto de <i>N. tenuis</i> (A) y <i>M. pygmaeus</i> (B).	29
Figura 1.11. Ciclo biológico de <i>N. tenuis</i> (Fuente: G. Tapia. IFAPA, Almería).	30
Figura 1.12. Huevo de <i>N. tenuis</i> insertado en la epidermis (A) y emergencia de una ninfa del huevo (B).	32
Figura 1.13. Daños producidos por <i>N. tenuis</i> en las plantas de tomate. (A) Puncteaduras en fruto, (B) anillos necróticos en el pecíolo de una flor, (C) <i>N.</i> <i>tenuis</i> alimentándose de la planta produciendo anillos en tallo, (D) anillo necrótico en tallo.	35
Figura 3.1.1. Arena experimental utilizada para el estudio del desarrollo de las ninfas.....	44
Figura 3.1.2. Arena experimental utilizada para el estudio de los parámetros reproductivos.	46
Figura 3.2.1. Olfactómetro vertical en forma de “Y”. Se observa la bomba de aire (1), los tubos de entrada (2) que llevan el aire hasta los frascos (3), los tubos de salida (4) que van desde los frascos llevan el aire impregnado de olor hasta los brazos del olfactómetro (5).	51
Figura 3.2.2. Arena experimental usada para el ensayo de preferencia y consumo entre dos presas.	56

Figura 3.2.3. Arena experimental usada en el ensayo de preferencia de cafetería.	58
Figura 3.3.1. Invernadero de malla, situado en el IVIA (Moncada) con cierre de doble puerta utilizado en este experimento.....	61
Figura 3.3.2. Vista del interior de las jaulas usadas para el experimento. Se puede apreciar la disposición de las plantas, las cañas usadas para el entutorado y las gomas del sistema de riego por goteo.....	63
Figura 3.3.3. Diseño experimental de bloques al azar en el invernadero donde se realizó el experimento (C= Control; Bt1= <i>B. thuringiensis</i> durante 1 mes; Bt2= <i>B. thuringiensis</i> durante 2 meses y Bt3= <i>B. thuringiensis</i> todo el ciclo de cultivo).....	66
Figura 3.4.1. Diseño experimental de bloques al azar en el invernadero donde se realizó el experimento (C= Control; Bt= <i>B. thuringiensis</i> ; Post= Suelta de <i>N. tenuis</i> en post-trasplante y Pre = Suelta de <i>N. tenuis</i> en pretrasplante).....	73
Figura 4.1.1. Supervivencia (% \pm ES) de los diferentes estadios ninfales de <i>N. tenuis</i> y <i>M. pygmaeus</i> cuando fueron alimentados con huevos de <i>T. absoluta</i> (A) o huevos de <i>E. kuehniella</i> (B) sobre hoja de tomate a 25° C y un fotoperiodo de 16:8 h L:O.	78
Figura 4.1.2. Descendencia cada dos días (nº de N1 por hembra) de <i>N. tenuis</i> y <i>M. pygmaeus</i> cuando depredaron sobre huevos de <i>T. absoluta</i> (A) o de <i>E. kuehniella</i> (B) sobre tomate a 25° C y un fotoperiodo de 16:8 h L:O..	83

Figura 4.2.1. Respuesta de la hembras de *N. tenuis* en el olfactómetro vertical en forma de “Y” cuando fueron expuestas a plantas sin infestar frente a plantas infestadas (A) o dos plantas infestadas (B). Las diferencias estadísticas están marcadas con (**) ($P < 0,05$). 94

Figura 4.2.2. Presa consumida (Media \pm ES) por hembras y ninfas de *N. tenuis*, cuando ésta se ofreció sola o en dieta mixta: huevos de *T. absoluta* y adultos de *B. tabaci* (A) huevos de *T. absoluta* y ninfas de *B. tabaci*. Las diferentes letras entre pares de columnas muestran diferencias significativas ($P < 0,05$). 97

Figura 4.2.3. Número acumulado de presa depredada por las ninfas de 4º estadio de *N. tenuis* (A) y por las hembras (B) en el ensayo de cafetería. Las diferentes letras al final de cada curva, muestran diferencias significativas en el número total de presa consumida al final del experimento ($P < 0,05$). 99

Figura 4.3.1. Aspecto de las plantas en el tratamiento control (A) y en uno de los tratamientos donde se trató semanalmente con *B. thuringiensis* y se liberó 1 *N. tenuis* por planta 3 semanas después de la infestación (B)..... 109

Figura 4.3.2. Número de foliolos atacados por planta (media \pm ES) para las plantas infestadas semanalmente con 10 parejas de *T. absoluta* y tratadas semanalmente con *B. thuringiensis*. Se liberó 1 *N. tenuis* por planta 3 semanas después de la infestación. 109

Figura 4.3.3. Número de *N. tenuis* tanto de adultos (A) como de ninfas (B) por planta (media \pm ES) para las plantas infestadas semanalmente con 10

parejas de *T. absoluta* y tratadas semanalmente con *B. thuringiensis*. Se liberó 1 *N. tenuis* por planta 3 semanas después de la infestación. 111

Figura 4.3.4. Número de anillos necróticos por planta (media \pm ES) para las plantas infestadas semanalmente con 10 parejas de *T. absoluta* y tratadas semanalmente con *B. thuringiensis*. Se liberó 1 *N. tenuis* por planta 3 semanas después de la infestación. 113

Figura 4.3.5. Peso total de fruta (g) obtenido por planta (A) (media \pm ES) y porcentaje de fruta atacada (B) para las plantas infestadas semanalmente con 10 parejas de *T. absoluta* y tratadas semanalmente con *B. thuringiensis*. Se liberó 1 *N. tenuis* por planta 3 semanas después de la infestación. 114

Figura 4.4.1. Aspecto de las plantas en el tratamiento control (A), en el tratamiento de post-trasplante (B), en el tratamiento de Bt (C) y en el tratamiento de pre-trasplante (D). 122

Figura 4.4.2. Número de folíolos infestados (media \pm ES) por *T. absoluta* cuando en las plantas se liberó *N. tenuis*, se trató con *B. thuringiensis* o se combinaron ambos enemigos naturales. 123

Figura 4.4.3. Número de adultos (A) y ninfas (B) de *N. tenuis* (media \pm ES) por planta cuando se liberó 1 *N. tenuis*/ planta 3 semanas después del trasplante (post-trasplante) o 1 *N. tenuis*/ 2 plantas en el semillero (pre-trasplante). 124

Figura 4.4.4. Número de anillos necróticos (media \pm ES) por planta cuando se liberó 1 *N. tenuis*/ planta 3 semanas después del trasplante (post-trasplante) o 1 *N. tenuis*/ 2 plantas en el semillero (pre-trasplante). 125

Figura 4.4.5. Número de frutos cosechados por planta (media \pm ES) (A) y número de frutos atacados por planta (B) cuando en las plantas se liberó *N. tenuis*, se trató con *B. thuringiensis* o se combinaron ambos enemigos naturales..... 127

Listado de tablas :

Tabla1.1. Principales plagas del tomate y sus enemigos naturales (Fuente: Velden et al. 2012).	4
Tabla 1.2. Enemigos naturales de <i>T. absoluta</i> citados en la Cuenca Mediterránea (Adaptado de Urbaneja et al., 2012).....	28
Tabla 3.2.1. Diferentes combinaciones de fuentes de olor a las que se expusieron las hembras de <i>N. tenuis</i>	52
Tabla 4.1.1. Tiempo medio de desarrollo de los diferentes estadios ninfales de <i>N. tenuis</i> y <i>M. pygmaeus</i> en función de si fueron alimentados con <i>T. absoluta</i> o <i>E. kuehniella</i> (\pm ES) sobre hoja de tomate a 25° C y un fotoperiodo de 16:8 h L:O.	80
Tabla 4.1.2. Número de huevos consumidos de <i>T. absoluta</i> o <i>E. kuehniella</i> (\pm ES) por los diferentes estadios ninfales de <i>N. tenuis</i> y <i>M. pygmaeus</i> sobre hoja de tomate a 25° C y un fotoperiodo de 16:8 h L:O.	81
Tabla 4.1.3. Media de la fertilidad (descendencia), fertilidad diaria (descendencia/ día), proporción de sexos (número de hembras en la descendencia/ total), y longevidad (días) de <i>N. tenuis</i> y <i>M. pygmaeus</i> cuando se alimentaron exclusivamente con huevos de <i>T. absoluta</i> o huevos de <i>E. kuehniella</i> sobre hoja de tomate a 25° C y un fotoperiodo de 16:8 h L:O.	84

Tabla 4.1.4. Tasa intrínseca de desarrollo r_m (huevos hembra/hembra/día), tiempo de generación (T), tasa neta de reproducción, R_0 (Huevos hembra/hembra) y tiempo para doblar la población (DT) (días) de *N. tenuis* y *M. pygmaeus* cuando depredaron sobre huevos de *T. absoluta* o *E. kuehniella* sobre tomate a 25° C y un fotoperiodo de 16:8 h L:O ($\bar{x} \pm SE$)..... 86

Tabla 4.2.1. Valores del índice de β -Manly de huevos de *T. absoluta* para hembras y ninfas de *N. tenuis* (media \pm SE), cuando se ofrecieron conjuntamente con adultos o ninfas de *B. tabaci*. Al presentarse dos presas conjuntamente, el índice de β -Manly muestra preferencia cuando su valor es superior a 0,5. 98

Tabla 4.2.2. Valores del índice de Rodgers (media \pm SE) para las hembras y las ninfas de cuarto estadio de *N. tenuis*, cuando se presentaron simultáneamente frente a 4 presas a 25° C. Las diferentes letras dentro de la misma columna muestran diferencias significativas entre las presas para cada estado del depredador ($P < 0,05$). 100

Tabla 4.4.1. Valores de probabilidad del contraste por parejas del número de foliolos atacados, número de frutos cosechados y número de frutos atacados en los diferentes tratamientos utilizados en el experimento. Los valores seguidos por un asterisco denotan diferencias significativas entre tratamientos según el test de DNS ($P < 0,05$). 128

1. Introducción general



1.1. El cultivo del tomate

1.1.1. Importancia económica

El cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) es el producto hortícola con mayor importancia económica a nivel mundial, en el año 2010 se produjeron 145.751.506 toneladas de tomates (FAOSTAT, 2010). España es, tras Italia, el mayor productor de la Unión Europea y el séptimo a nivel mundial (FAOSTAT, 2010). Durante el año 2009 se sembraron un total de 63.838 ha en España de las que se obtuvieron 4.798.053 de toneladas de tomates (MAGRAMA, 2012). Alrededor del 15% de esta producción se destinó al comercio exterior (MAGRAMA, 2012).

1.1.2. Principales fitófagos plaga del cultivo del tomate y su control biológico

Varios fitófagos pueden alcanzar la categoría de plaga en el cultivo del tomate: los lepidópteros *Helicoverpa armigera* (Hübner), *Chrysodeixes chalcites* (Esper), *Spodoptera littoralis* (Boisduval), *S. exigua* (Hübner), *Autographa gamma* (L.) y *Lacanobia oleracea* L. (Lepidoptera: Noctuidae); el trip *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) que transmite el virus del bronceado del tomate (Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV); minadores de hoja del género *Liriomyza* (Diptera: Agromyzidae); los ácaros *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae) y *Aculops lycopersici* (Masse) (Acari: Eriophyidae); la cochinilla *Pseudococcus viburni* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae); diversas especies de pulgones (Hemiptera: Aphididae) y las moscas blancas *Trialeurodes vaporariorum*

(Westwood) y *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) (**Tabla 1.1**).

En los últimos años, la mosca blanca *B. tabaci* ha sido considerada la plaga clave del cultivo del tomate por su capacidad para transmitir el “virus de la cuchara” (Tomato Yellow Leaf Curl Virus, TYLCV y Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus, TYLCSV) que provoca grandes pérdidas económicas. A finales del 2006 se detectó en la provincia de Castellón la presencia de la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Urbaneja et al., 2007), la cual se convirtió rápidamente en otra plaga clave para este cultivo (**Tabla 1.1**).

Para el manejo de estos fitófagos, tanto en cultivos de invernadero como al aire libre, se ha recurrido al manejo integrado de plagas en el que el control biológico juega un papel muy importante (Gabarra et al., 2008). Las estrategias de control biológico utilizadas en tomate son la inoculación estacional y la conservación y aumento de las poblaciones de los enemigos naturales (**Tabla 1.1**).

Fitófago	Enemigo natural
<p><u>Mosca blanca</u> <i>Bemisia abaco</i> (Gennadius) (Hemiptera: Aleurodidae)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Nesiodicoris tenuis</i> Reuter (Hemiptera: Miridae) - <i>Macrolophus pygmaeus</i> (Rambur) (Hemiptera: Miridae) - <i>Eretmocerus mundus</i> Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) - <i>Eretmocerus eremicus</i> Rose & Zolnerovich (Hymenoptera: Aphelinidae) - <i>Encarsia Formosa</i> (Gaham) (Hymenoptera: Aphelinidae) - <i>Verticillium lecanii</i>
<p><u>Mosca blanca</u> <i>Trialeurodes vaporariorum</i> Westwood (Hemiptera: Aleurodidae)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Nesiodicoris tenuis</i> Reuter (Hemiptera: Miridae) - <i>Macrolophus pygmaeus</i> (Rambur) (Hemiptera: Miridae) - <i>Eretmocerus mundus</i> Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) - <i>Eretmocerus eremicus</i> Rose & Zolnerovich (Hymenoptera: Aphelinidae) - <i>Encarsia Formosa</i> (Gaham) (Hymenoptera: Aphelinidae) - <i>Verticillium lecanii</i>
<p><u>Trips</u> <i>Frankliniella occidentalis</i> (Pergande) (Thysanoptera : Thripinae)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Nesiodicoris tenuis</i> Reuter (Hemiptera: Miridae) - <i>Macrolophus pygmaeus</i> (Rambur) (Hemiptera: Miridae) - <i>Amblyseius cucumeris</i> (Oudemans) (Acari: Phytoseiidae) - <i>Hypoaspis miles</i> (Berlese) (Acari: Laelapidae) - <i>Hypoaspis aculeifer</i> (Canestrini) (Acari : Laelapidae)
<p><u>Minador</u> <i>Liriomyza trifolii</i> (Burgess) (Diptera : Agromycidae) <i>L. strigata</i> (Meigen) (Diptera : Agromycidae) <i>L. bryoniae</i> (Spencer) (Diptera : Agromycidae) <i>L. huidobrensis</i> (Blandchar)(Diptera: Agromycidae)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Diglyphus isaea</i> (Walker) (Hymenoptera: Eulophidae) - <i>Dacnusa sibirica</i> Telenga (Hymenoptera: Braconidae) - <i>Nesiodicoris tenuis</i> Reuter (Hemiptera: Miridae) - <i>Macrolophus pygmaeus</i> (Rambur) (Hemiptera: Miridae)
<p><u>Minador</u> <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera : Gelechiidae)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Nesiodicoris tenuis</i> Reuter (Hemiptera: Miridae) - <i>Macrolophus pygmaeus</i> (Rambur) (Hemiptera: Miridae) - <i>Trichogramma achaeae</i> Nagaraja and Nagarkatti - <i>Necremnus artynes</i> (Walker) (Hymenoptera: Eulophidae) - <i>Bacillus thuringiensis</i>
<p><u>Orugas</u> <i>Helicoverpa armigera</i> Hübner (Lepidoptera : Noctuidae) <i>Chrysodeixes chalcites</i> (Esper) <i>Autographa gamma</i> (Lepidoptera : Noctuidae) <i>Lacanobia oleracea</i> Linnaeus (Lepidoptera : Noctuidae) <i>Spodoptera littoralis</i> (Boisduval) (Lepidoptera : Noctuidae) <i>Spodoptera exigua</i> (Lepidoptera : Noctuidae)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Nesiodicoris tenuis</i> Reuter (Hemiptera: Miridae) - <i>Macrolophus pygmaeus</i> (Rambur) (Hemiptera: Miridae) - <i>Bacillus thuringiensis</i>
<p><u>Pulgón</u> <i>Aphis gossypii</i> Glover (Hemiptera: Aphididae) <i>Aphis fabae</i> Scopoli (Hemiptera: Aphididae) <i>Aphis craccivora</i> Koch (Hemiptera: Aphididae) <i>Myzus persicae</i> Sulzer (Hemiptera: Aphididae)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Aphidius colemani</i> (Haliday) (Hymenoptera: Aphidiidae) - <i>Aphidoletes aphidimyza</i> (Rondani) (Diptera: Cecidomyiidae) - <i>Episyrphus balteatus</i> DeGeer (Diptera: Syrphidae) - <i>Adalia bipunctata</i> Linneo (Coleoptera : Coccinellidae)
<p><u>Pulgón</u> <i>Macrosiphum euphorbiae</i> Thomas(Hemiptera : Aphididae)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Aphelinus abdominalis</i> (Dalman) - <i>Aphidius ervi</i> (Haliday) (Hymenoptera: Aphidiidae) - <i>Aphidoletes aphidimyza</i> (Rondani) (Diptera: Cecidomyiidae) - <i>Episyrphus balteatus</i> DeGeer (Diptera: Syrphidae) - <i>Adalia bipunctata</i> Linneo (Coleoptera : Coccinellidae)
<p><u>Acaro</u> <i>Tetranychus urticae</i> Koch (Acari: Tetranychidae)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Feltiella acarisuga</i> (Vallot) (Diptera: Cecidomyiidae) - <i>Phytoseiulus persimilis</i> (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae) - <i>Nesiodicoris tenuis</i> Reuter (Hemiptera: Miridae) - <i>Macrolophus pygmaeus</i> (Rambur) (Hemiptera: Miridae)
<p><u>Acaro</u> <i>Tetranychus evansi</i> Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Feltiella acarisuga</i> (Vallot) (Diptera: Cecidomyiidae) - <i>Nesiodicoris tenuis</i> Reuter (Hemiptera: Miridae) - <i>Macrolophus pygmaeus</i> (Rambur) (Hemiptera: Miridae)

Tabla1.1. Principales plagas del tomate y sus enemigos naturales (Fuente: Velden et al. 2012).

1.2. La polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)

La polilla del tomate *T. absoluta* es un microlepidóptero originario de Centroamérica. Desde allí se propagó a Sudamérica a principios de 1980 y se convirtió en una de las plagas más devastadoras del cultivo del tomate y otras solanáceas en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela (Barrientos et al., 1998; Estay, 2000; EPPO, 2008).

Tras su detección inicial en España en 2006 (Urbaneja et al., 2007), se expandió hacia otros países de Europa y otras regiones de la costa Mediterránea, incluyendo el Norte y Medio-Este de África (Desneux et., al 2011) (**Figura 1.1**). Su elevado potencial reproductivo y la ausencia inicial de enemigos naturales que pudiesen regular sus poblaciones, hizo que se convirtiera en una plaga clave del cultivo del tomate en todas las regiones que ha colonizado (Desneux et al., 2011).

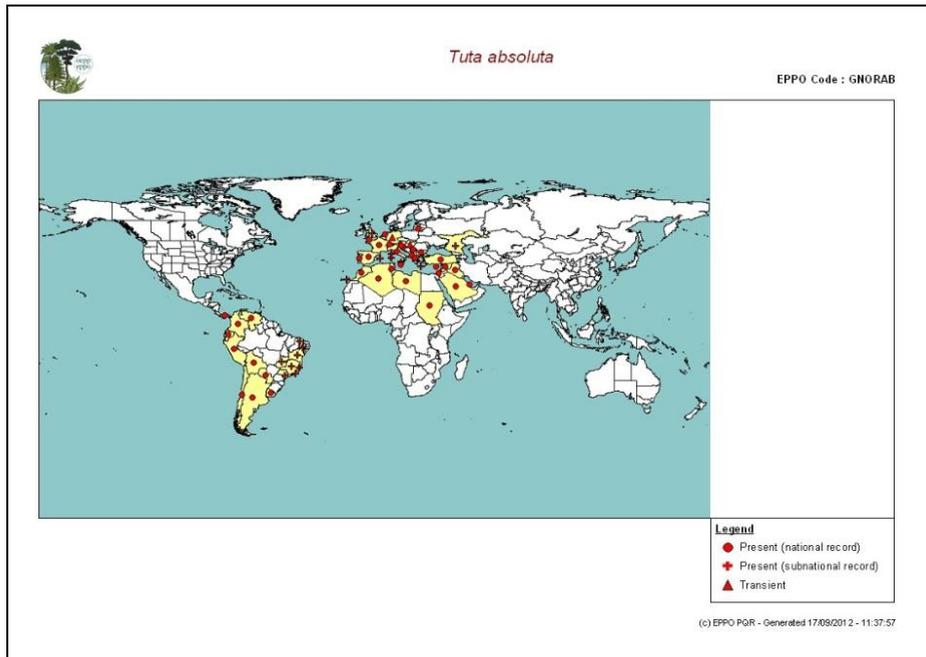


Figura 1.1. Mapa de distribución mundial de *T. absoluta* (fuente: EPP0, consulta noviembre 2012).

Tuta absoluta ha recibido diferentes nombres científicos desde su primera cita en Huancayo (Perú) en 1917 por Meyrick. Algunos de estos nombres han sido: *Phthorimaea absoluta*, *Gnorimoschema absoluta*, *Scrobipalpula absoluta* o *Scrobipalpuloides absoluta*, pero finalmente se situó en el género *Tuta* (Barrientos et al., 1998).

La aparición de esta nueva plaga en España desestabilizó las estrategias de manejo integrado de plagas en el cultivo del tomate (van der Blom et al., 2009) porque su control se basó inicialmente en el uso de insecticidas (Bielza, 2010). La aparición paulatina de enemigos naturales autóctonos en todas las áreas colonizadas por *T. absoluta* ha permitido que se redirigiera hacia un manejo integrado de plagas basado en el control biológico (Urbaneja et al.,

2008; Arnó et al., 2009a; Arnó et al., 2009b; Cabello et al., 2009a; Cabello et al., 2009b; Monserrat, 2009a; Urbaneja et al., 2009; Calvo et al., 2010; Mollá et al., 2010; González-Cabrera et al., 2011).

1.2.1. Descripción y ciclo biológico

Al igual que el resto de lepidópteros, su ciclo biológico presenta cuatro estados de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto.

El huevo tiene forma ovalada con 0,4 mm de largo y 0,2 mm de diámetro. Recién puesto es de color blanco-cremoso tornándose amarillo-anaranjado en pleno desarrollo y de color oscuro conforme se aproxima al momento de la eclosión (Estay, 2000) (**Figura 1.2A**). El estado de larva comprende cuatro estadios larvarios bien definidos y diferenciados en tamaño y color (Vargas, 1970). El primer estadio larvario de color crema con la cabeza de color oscuro mide más o menos 1,6 mm (**Figura 1.2B**). Conforme la larva va alimentándose y aumentando de tamaño su color va virando a verde, más ligero en el segundo estadio de unos 2,8 mm de longitud (**Figura 1.2C**). Según se acerca al tercer estadio va aumentando en tamaño y tonalidad verdosa. Este estadio ya alcanza los 4,7 mm (**Figura 1.2D**). En el cuarto estadio aparece una mancha de color rojizo a nivel dorsal que se extiende longitudinalmente desde los ocelos hasta el margen posterior del cuerpo. En este último estadio la larva puede alcanzar los 8 mm de longitud (**Figura 1.2E**) (Vargas, 1970). Durante el periodo en el que la larva se prepara para pupar (precrisálida) deja de comer, y generalmente se deja caer al suelo por medio de un hilo de seda para completar allí el estado de pupa. La pupa tiene una forma cilíndrica, de unos 4,3 mm de largo y 1,1 mm de diámetro (Vargas, 1970), y presenta una coloración verde recién formada tornándose color café oscura tal y como

avanza el desarrollo (Estay, 2000). Generalmente aparece cubierta por un capullo blanco y sedoso (**Figura 1.2F**) (Apablaza, 1992) .

El adulto, de unos 7 mm de longitud y una envergadura alar de 10 mm en los machos y 11 mm en las hembras, presenta antenas largas y filiformes (Larraín, 1987), las alas anteriores adquieren un color gris oscuro jaspeado con manchas pardas, mientras las alas posteriores presentan un color gris brillante (Vargas, 1970). Suelen permanecer escondidos durante el día, presentando mayor actividad matinal-crepuscular. Las hembras presentan el abdomen de color café cremoso, y más ancho y voluminoso que los machos (**Figura 1.3**) (Estay, 2000). La diseminación se realiza en estado adulto llegando a los cultivos por el vuelo.

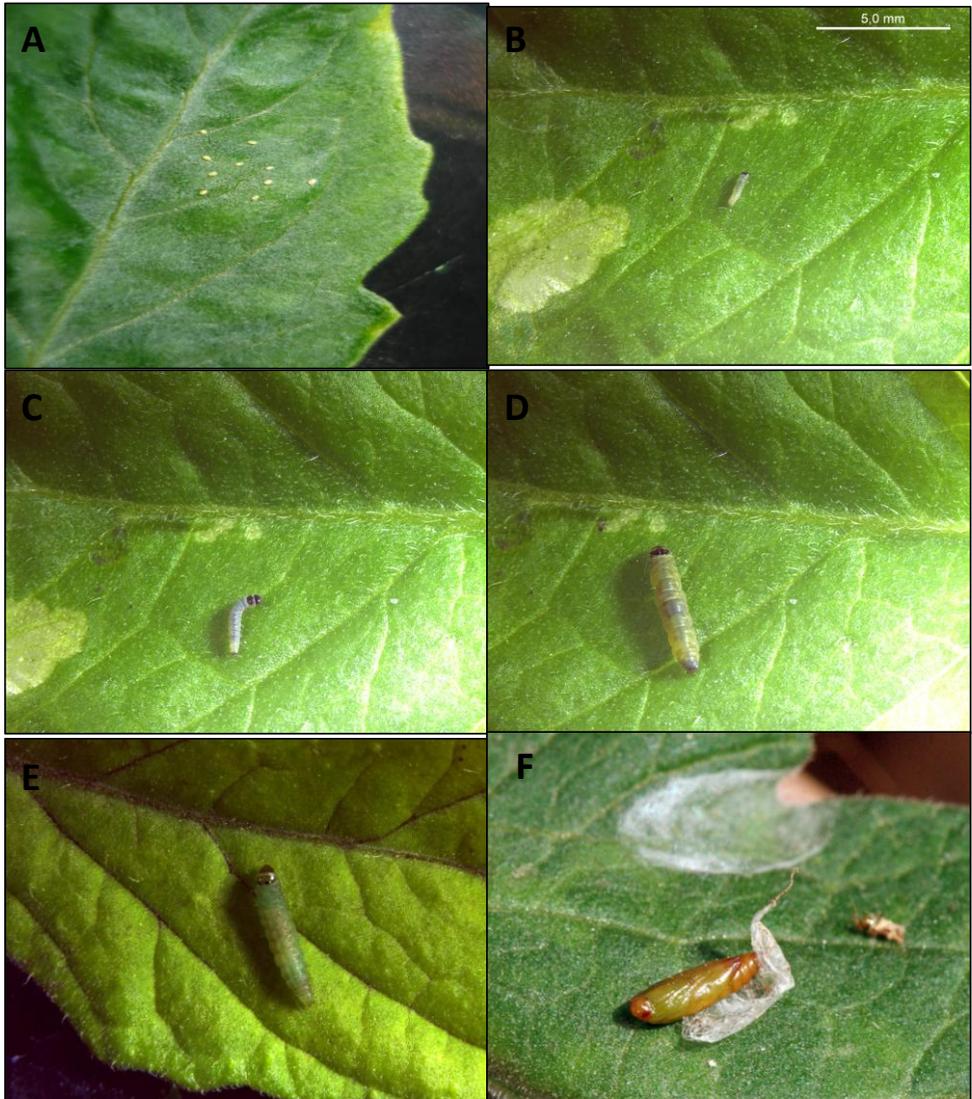


Figura 1.2. Puesta de *T. absoluta* en hoja de tomate (A), larva de primer estadio (B), larva de segundo estadio (C), larva de tercer estadio (D), larva de cuarto estadio (E), y pupa (F).



Figura 1.3. Dimorfismo sexual de *T. absoluta*. El macho a la izquierda, presenta un abdomen más estilizado, mientras la hembra a la derecha presenta un abdomen más abombado.

1.2.2. Biología y parámetros biológicos

Tuta absoluta es una especie multivoltina, y como se ha comentado anteriormente, posee un elevado potencial reproductivo. La duración del ciclo biológico depende de las condiciones ambientales en las que se encuentre. De este modo su desarrollo oscila desde 76,3 días a 14° C, de 39,8 días a 19,7° C y de 23,8 días a 27,1°C (Barrientos et al., 1998). La longevidad de un adulto también está influenciada por las condiciones ambientales. La vida media es de 10 a 15 días para las hembras y de 6 a 7 días para los machos (Estay, 2000). Sin embargo, los machos no apareados presentan una longevidad significativamente mayor que los machos apareados y que las hembras sea cual sea su estado (Fernández y Montagne, 1990). Las hembras se aparean sólo una vez por día y llegan a tener hasta 6 cópulas durante su vida. La cópula dura en promedio cuatro horas y cuarenta y cinco minutos. El periodo más prolífico es siete días después del primer apareamiento, cuando

logran poner el 76% de los huevos (Uchoa-Fernandez et al., 1995). Una sola hembra puede poner hasta 260 huevos a lo largo de toda su vida. La hembra, puede depositar los huevos en hojas, frutos y tallos presentando preferencia por los brotes y hojas recién desplegadas. Normalmente, un 73% de los huevos depositados se encuentran en las hojas desplegadas, el 21% aparece en los nervios de las hojas no desplegadas y brotes secundarios, el 5% en los sépalos, y un 1% en los frutos verdes (Estay, 2000). La larva no entra en diapausa y en Sudamérica presenta de 10 a 12 generaciones anuales (Barrientos et al., 1998).

1.2.3. Sintomatología y daños

Las larvas de *T. absoluta* atacan plantas en cualquier estado de desarrollo, desde plantas de semillero hasta plantas maduras (EPP0, 2006). Tras la eclosión del huevo, el primer estadio larvario busca un punto de entrada en las hojas y tras penetrar entre las dos epidermis, en su avance, consume el mesófilo, dejando áreas translúcidas denominadas galerías donde se alimenta y desarrolla (**Figura 1.4A**) (Uchoa-Fernandez et al., 1995). En ocasiones, la larva sale de la galería en que se encuentra para atacar otras hojas, aumentando así el daño en la planta (Estay, 2000; Urbaneja et al., 2008). Aunque prefieren las hojas en formación y los racimos florales, las larvas de *T. absoluta* pueden atacar también brotes, flores y frutos (**Figura 1.4B y C**) (López, 1991).

Cuando atacan a los frutos, penetran preferentemente por su extremo peduncular y realizan galerías que provocan deformaciones y facilitan el ataque de agentes patógenos, potenciando su pudrición, además de devaluarlos comercialmente (Apablaza, 1992). En ocasiones, la larva puede

salir de un fruto para alimentarse de otro dentro de un mismo racimo (López, 1991).

La presencia de tallos perforados y brotes dañados es menor que la presencia de minas en la hoja. Las perforaciones en el tallo se producen en la inserción de las hojas o pedúnculos de los tomates. La larva prefiere los brotes de la parte apical de la planta.

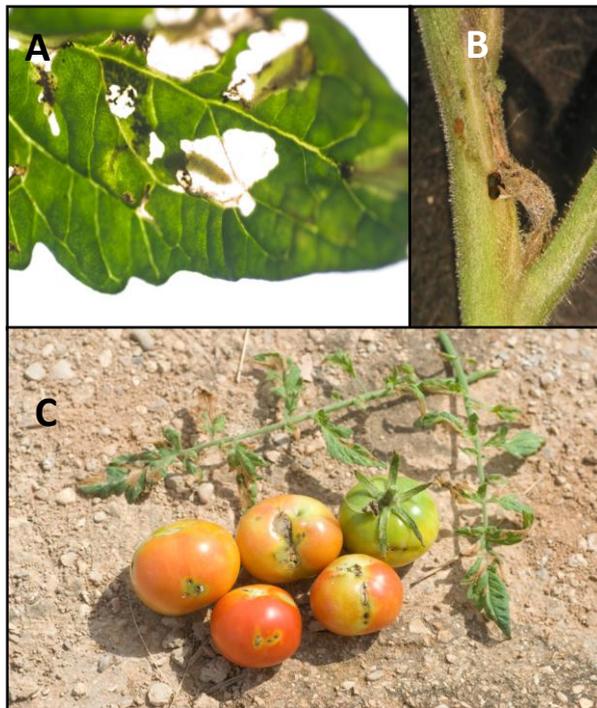


Figura 1.4. Daño producido por *T. absoluta*. Se pueden observar las galerías translúcidas que produce en los folíolos al alimentarse del mesófilo (A), daños en tallo (B) y daños en fruto (C).

1.2.4. Hospederos secundarios

El hospedero principal de *T. absoluta* es el tomate, *Lycopersicon esculentum* Miller, en el que puede realizar la puesta en la mayor parte de sus órganos aéreos (Gilardon et al., 2001) y completar su ciclo vital alimentándose tanto de la hoja como del propio fruto (Estay, 2000). Además, este fitófago puede desarrollarse en otras variedades de tomate como *Lycopersicon hirsutum* Dunal y otras solanáceas cultivadas como la berenjena *Solanum melongena* L., la patata *Solanum tuberosum* L., el pepino dulce *Solanum muricatum* L., y *Solanum litorale* L. Como hospederos alternativos se encuentran varias especies de malas hierbas solanáceas como la hierba mora *Solanum nigrum* L., *Solanum elaeagnifolium* Cav., *Solanum puberulum* Phil., el estramonio *Datura stramonium* L., la trompeta de ángel *Datura ferox* L., el tabaco negro *Nicotina glauca* L. y el tomatillo *Lycium chinense* Miller (Estay, 2000; EPPO, 2006).

1.2.5. Métodos de control

Para regular las poblaciones de *T. absoluta* en el cultivo se recomienda el uso de métodos preventivos antes de que se produzca la explosión de la plaga (Urbaneja et al., 2012). Estos métodos incluyen el control biológico, biotecnológico, y cultural. El control con plaguicidas se recomienda solamente cuando los métodos preventivos no son suficientes y la plaga ha sobrepasado los umbrales de tratamiento (Montserrat, 2010).

1.2.5.1. Control cultural

La prevención es una de las prácticas más efectivas y baratas para reducir las poblaciones de *T. absoluta* en el cultivo de tomate de invernadero (Arnó y Gabarra, 2010). Una de las premisas esenciales es conseguir el aislamiento del cultivo mediante el uso de mallas y la instalación de doble puerta en los invernaderos. Monserrat (2009a) consiguió evitar la entrada de adultos de *T. absoluta* usando malla de un tamaño de luz de al menos 6 x 9 hilos/cm². Sin embargo, se debe tener en cuenta que con este método se reduce la ventilación, por lo que se necesitan medidas para asegurar el movimiento del aire y evitar efectos adversos en el cultivo. Otro inconveniente de este sistema es que también se impide la entrada de depredadores y parasitoides (Berlinger et al., 1999).

En el manejo de *T. absoluta* es de vital importancia reducir la infestación al inicio del cultivo. Para ello, es importante que las plántulas estén libres de *T. absoluta* antes de ser trasplantadas al campo, por lo que los productores deben seguir unas medidas extremas de control. Igualmente, es muy importante eliminar hojas, tallos y frutos afectados por *T. absoluta* al principio del ciclo de cultivo. Además, antes de realizar el trasplante y durante el ciclo de cultivo se deben eliminar las malas hierbas que puedan servir como hospedero secundario a *T. absoluta*.

También se recomienda que los residuos infestados del cultivo sean eliminados tanto durante el ciclo de cultivo o inmediatamente tras la cosecha, enterrando el residuo o poniendo el material en contenedores cerrados con una película de plástico transparente que permita la fermentación (Tapia et al., 2010). Los residuos también pueden ser eliminados quemándolos o

triturándolos combinándolos con tratamientos insecticidas (Robredo y Cardeñoso, 2008).

En zonas altamente especializadas en la producción de tomates, se recomienda vaciar y cerrar los invernaderos entre cuatro y ocho semanas, dependiendo de la temperatura, entre ciclos de cultivo (Montserrat, 2009b, 2010). Bajo estas condiciones, los adultos que emerjan del suelo morirán o serán capturados por trampas de feromona o de luz. En determinadas situaciones, pueden aplicarse tratamientos químicos al suelo para reducir los niveles de *T. absoluta*. En climas con temperaturas elevadas se recomienda la solarización para eliminar las pupas que quedan en el suelo después de la cosecha.

En cultivos al aire libre, la gestión del riego por aspersión también puede reducir el impacto sobre las poblaciones de huevos y larvas de *T. absoluta* (Costa et al., 1998).

1.2.5.2. Control químico

Los primeros insecticidas de origen químico usados contra *T. absoluta* en Sudamérica fueron los organofosforados y el cartap, pero más tarde, en 1970, fueron sustituidos por los piretroides (Desneux et al., 2010). En los años 80, se alternaron aplicaciones de cartap y piretroides o thiocyclam (Lietti et al., 2005). En los años 90, se introdujeron nuevos insecticidas como acylurea, spinosad, abamectina, tebufenozide y chlorfenapyr. La eficacia de los organofosforados disminuyó después de los años 80 debido a la aparición de resistencias a estos productos por parte de *T. absoluta* en Brasil y Chile. Además en Brasil *T. absoluta* mostró resistencia al cartap, la abamectina y el

permitrin, (Siqueira et al., 2000; 2001), y a los piretroides en Chile (Salazar y Araya, 1997) y Argentina (Lietti et al., 2005). Aunque estas resistencias aparecieron por el uso continuado de los insecticidas, en estos países todavía es común la aplicación de insecticidas para controlar a *T. absoluta*.

Como se ha comentado anteriormente, tras la detección de *T. absoluta* en España hubo una necesidad inmediata de elegir insecticidas que cumpliesen dos objetivos: alta eficacia sobre *T. absoluta* y baja toxicidad sobre los enemigos naturales presentes en el cultivo de tomate. En la región Mediterránea, los primeros insecticidas que cumplían estos dos condicionantes fueron spinosad e indoxacarb. Posteriormente, aparecieron en el mercado otros nuevos insecticidas como eran flubendiamid, emamectin, rynoxapir, abamectina o etofenprox (Araujo-Gonçalves, 2010; Astor, 2010; Espinosa, 2010; Gutiérrez-Giulianotti, 2010; López et al., 2010; Robles, 2010; Torné et al., 2010). Por otro lado, los tratamientos con azadiractina (neem) o con azufre también pueden ayudar a reducir la incidencia de *T. absoluta* aunque con una menor eficacia (Monserrat, 2009a; Zappalà et al., 2011). La aplicación de estos productos debe ser rotativa para prevenir la aparición de resistencias por parte de la plaga (Ortega et al., 2008; Bielza, 2010) y deben integrarse con otros métodos de control alternativos (Urbaneja et al., 2012).

1.2.5.3. Control biotecnológico

Trampeo masivo

El trampeo masivo puede ser una herramienta efectiva en el manejo de plagas en lugares aislados y controlados como es el caso de los invernaderos. Para el control de *T. absoluta* en invernaderos de tomate, la colocación de al menos una trampa por cada 500 m² puede reducir las poblaciones de *T. absoluta* significativamente (Stoltman et al., 2010). Los programas de trampeo masivo deben ser instaurados al principio del ciclo de cultivo cuando las poblaciones de *T. absoluta* son bajas, ya que con poblaciones elevadas este tipo de método de control no es eficaz (Montserrat, 2010).

Tradicionalmente, en los programas de trampeo masivo, se suelen usar trampas delta de plástico o papel. Estas trampas son de bajo coste y fácil uso. Las trampas delta de papel tienen las paredes internas cubiertas con pegamento y son de un solo uso. En cambio, las trampas delta de plástico vienen con un cartón renovable cubierto de pegamento, que se reemplaza cuando se saturan (Montserrat, 2010) (**Figura 1.5A y B**).

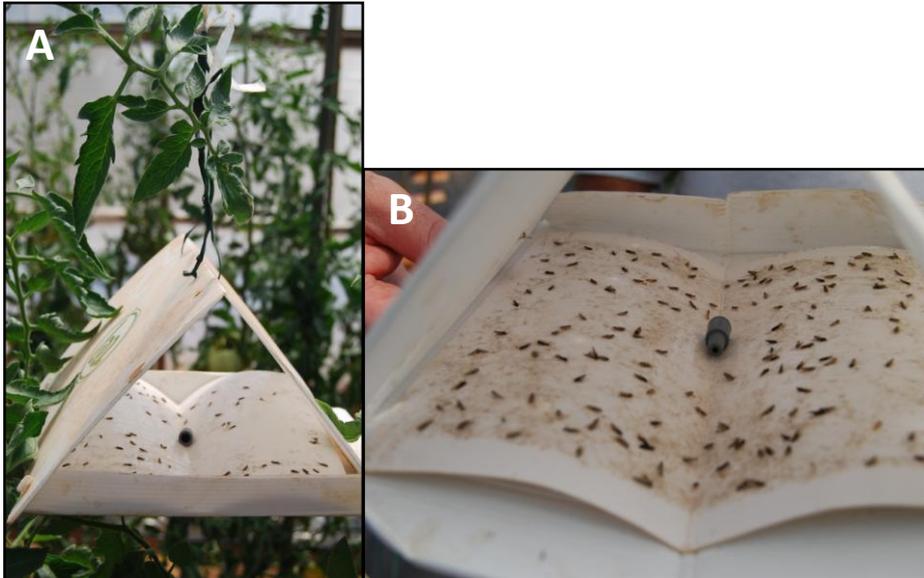


Figura 1.5. Trampa delta colocada en un cultivo de tomate (A). Visión del interior de una trampa delta donde se observa el cartón con pegamento y el difusor de feromona (B).

Con el fin de reducir el coste del trapeo masivo y evitar la saturación de la trampa, los agricultores empezaron a usar trampas de agua en sus programas de trapeo masivo (Montserrat, 2010). El diseño de estas trampas se basa en una bandeja de plástico con cierta profundidad, rellena de agua y jabón, y con el atrayente de feromona suspendido en el centro de la bandeja (**Figura 1.6**).



Figura 1.6. Trampa de agua colocada en un invernadero de tomate.

Confusión sexual

Esta estrategia se basa en la saturación continua de feromona sexual sintética en un área determinada para confundir a los machos en la localización de las hembras. En la zona de origen de la plaga, la confusión sexual para el control de *T. absoluta* no ha resultado efectiva (Michereff et al., 2000a). Recientemente nuevos trabajos realizados en invernaderos de tomate en España han demostrado la viabilidad de esta técnica para el control de *T. absoluta* (Navarro-Llopis et al., 2010). Sin embargo, esta técnica está condicionada por el alto coste y la disponibilidad de la feromona.

Atracción y muerte o atracción y esterilización

Esta estrategia se basa en la atracción de los machos mediante el uso de la feromona sexual, de forma que entren en contacto con algún producto que los elimine o esterilice. Con esta técnica se evita la utilización de trampas y se utiliza una menor cantidad de feromona que en la estrategia de confusión

sexual (Stoltman et al., 2010), aunque su efectividad no está constatada (Monserrat, 2012).

1.2.5.4. Control biológico

Tanto en la zona de origen de la plaga como en las zonas de nueva colonización se han citado varios enemigos naturales sobre *T. absoluta* (Desneux et al., 2010; Urbaneja et al., 2012).

Parasitoides

Desneux et al., (2010) citaron alrededor de 50 parasitoides de huevos, larvas y pupas de *T. absoluta* en Sudamérica. De entre éstos, predominan los parasitoides de huevos y larvas, siendo muy pocas las especies que se han citado parasitando pupas. Hasta la fecha, no hay registros de parasitoides de adultos.

Los huevos de *T. absoluta* son parasitados fundamentalmente por las familias de himenópteros: Encyrtidae, Eupelmidae y Trichogrammatidae (*Trichogramma* spp. es la predominante). En Sudamérica, son tres las especies de *Trichogramma* que se relacionan con *T. absoluta*, *Trichogramma exiguum* Pinto y Platner, *T. nerudai* Pintureau y Gerding y *T. pretiosum* Riley (Zucchi et al., 2010). El control de *T. absoluta* mediante sueltas de *Trichogramma* spp. ha resultado exitoso en países como Colombia (García Roa, 1989; Salas, 2001) y Brasil (Haji et al., 2002; Parra y Zucchi, 2004).

En la región Mediterránea se han citado también parasitoides de huevos (Desneux et al., 2010). Entre ellos, *Trichogramma achaeae* (Nagaraja y Nagarkatti) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) se ha utilizado

comercialmente en sueltas inundativas para el control de *T. absoluta* (Cabello et al., 2009a). Este parasitoide es capaz de reducir considerablemente el daño producido por *T. absoluta*. Sin embargo, su liberación se recomienda combinarla con otros métodos de control biológico ya que no es capaz de alcanzar el estadio adulto parasitando a *T. absoluta* y por ello no puede reproducirse en el cultivo (Urbaneja et al. 2012).

Los parasitoides de larvas pueden ser también importantes en la zona de origen, destacando especies de las familias: Bethyridae, Braconidae, Eulophidae, Ichneumonidae y Tachinidae (Desneux et al., 2010). En Argentina, se han citado varias especies de parasitoides de larvas (Berta y Colomo, 2000; Luna et al., 2007; Sánchez et al., 2009), al igual que en Chile (Rojas, 1981; Larraín, 1986), Brasil (Uchoa-Fernandez et al., 1995; Miranda et al., 1998; Marchiori et al., 2004; Bacci et al., 2008), Colombia (Oatman y Platner, 1989), Perú y Venezuela (Desneux et al., 2010). *Apanteles gelechiidivoris* Marsh (Hymenoptera: Braconidae) ha sido citado como un agente de control biológico efectivo de *T. absoluta* en Colombia, donde se utiliza para su control (Benavides et al., 2010). En Chile, *Dineulophus phthorimaeae* (De Santis) (Hymenoptera: Eulophidae) es el principal enemigo natural de *T. absoluta* con un 70% de parasitismo (Larraín, 2001). En Argentina, los parasitoides de larvas más importantes son *Pseudoapanteles dignus* (Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae) y *D. phthorimaeae* (Luna et al. 2007; Polack, 2007; Sánchez et al., 2009).

En la región Mediterránea, el parasitoide *Necremnus artynes* (Walker) (Hymenoptera: Eulophidae) (**Figura 1.7**) ha sido citado parasitando *T. absoluta* en varias regiones a lo largo de la Cuenca Mediterránea (**Tabla 1.2**)

(Mollá et al., 2008; Arnó et al., 2009b; Gabarra y Arnó, 2010; Mollá et al., 2010; Zappalà et al., 2012). Otra especie de la misma familia fue citada en el Noreste español *Stenomesus* cf. *japonicus* (Ashmead) (Hymenoptera: Eulophidae). Tanto *N. artynes* como *Stenomesus* cf. *japonicus*. son ectoparasitoides e idiobiontes, que parasitan el segundo y tercer estadio larvario de *T. absoluta*. *Neochrysocharis formosa* (Westwood) (Hymenoptera: Eulophidae) ha sido identificado como un parasitoides potencial de larvas de *T. absoluta* en la mismo área (Lara et al., 2010) y *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) se ha observado parasitando larvas en muestras provenientes de campo (Urbaneja et al. 2012). Además, se han registrado atacando a *T. absoluta* a lo largo de la zona Mediterránea varias especies que no se han podido identificar, principalmente Braconidos (Mollá et al., 2008; Arnó et al., 2009a; Gabarra y Arnó, 2010).

En cuanto a los parasitoides de pupas, tan solo se ha identificado *Conura* sp. (Hymenoptera: Chalcididae) en Sudamérica (Polack, 2007).



Figura 1.7. Larva de *N. artynes* parasitando una larva de segundo estadio de *T. absoluta*. En la parte superior derecha se puede observar una pupa de *N. artynes* y en la parte inferior derecha un macho adulto.

Depredadores

En la zona de origen de la plaga, el control biológico con depredadores ha sido poco estudiado (Desneux et al., 2010). Sin embargo, Miranda et al., (1998) observó que el 79,8% de la mortalidad de las larvas de *T. absoluta* era debida mayoritariamente a la acción de los depredadores como *Xylocoris* sp. (Heteroptera: Anthocoridae), *Cycloneda sanguinea* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae) y algunas especies sin determinar de trips (Thysanoptera: Phlaeothripidae). Bacci et al., (2008) encontró que el factor más importante en la mortalidad de las larvas de *T. absoluta* era la depredación, sobre todo antocóridos, míridos y por la avispa *Protonectarina sylveirae* (Saussure) (Hymenoptera: Vespidae). Además, diferentes autores han observado en la

zona de origen de *T. absoluta* una disminución significativa de las sus poblaciones en aquellos cultivos donde se aplican métodos de control biológico por conservación dirigidos al aumento de las poblaciones de depredadores (Paula et al., 2004; Miranda et al., 2005; Medeiros de et al., 2009).

En España, los míridos autóctonos *Nesidiocoris tenuis* Reuter y *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Hemiptera: Miridae) (**Figura 1.8A y B**) (**Tabla 1.2**), que aparecen de forma natural en cultivos de tomate, han sido observados depredando tanto huevos como larvas de *T. absoluta* (Urbaneja et al., 2009; Arnó et al., 2009a).

Otros depredadores que se han observado depredando a *T. absoluta* en la región Mediterránea son *Nabis pseudoferus* Remane (Hemiptera: Nabidae) (Cabello et al., 2009b) (**Figura 1.8C**), *Dicyphus maroccanus* Wagner (Hemiptera: Miridae) (**Figura 1.8D**), *Amblyseius cucumeris* Oudemans y *A. swirskii* (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae) (Mollá et al., 2010) en tomate y *Orius majusculus* (Reuter) y *O. laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) en patata (Urbaneja et al., 2012).

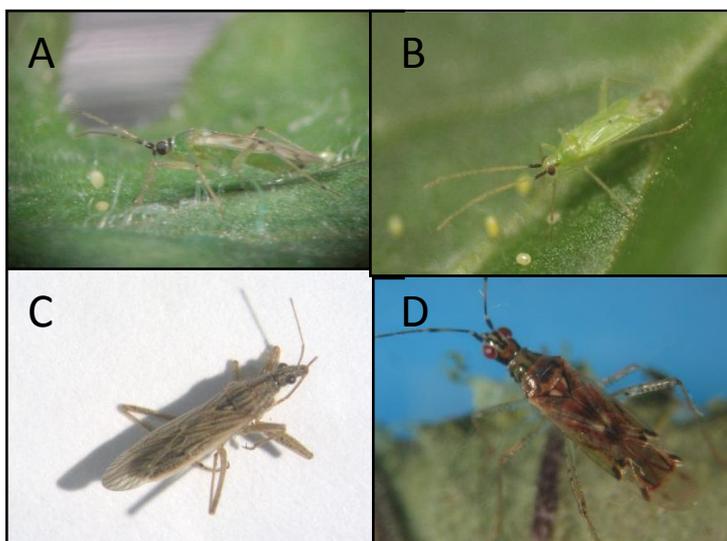


Figura 1.8. Algunos de los depredadores citados sobre *T. absoluta* en España. (A) *N. tenuis*, (B) *M. pygmaeus*, (C) *N. pseudoferus* y (D) *D. marrocanus*.

Entomopatógenos

En la zona de origen son varios los entomopatógenos que se han aislado de *T. absoluta* o que se han probado para su manejo. Rodríguez et al., (2006) observó que las aplicaciones de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok sobre larvas de tercer estadio de *T. absoluta* podían alcanzar una eficacia en torno al 70 %. En varias zonas se han utilizado formulaciones comerciales de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Berliner) para el control de *T. absoluta* (Giustolin, 1996; Giustolin et al., 2001a, b; Niedmann y Meza-Basso, 2006), incluso se han buscado cepas más tóxicas frente a este fitófago (Theoduloz et al., 2003). También, un granulovirus de la polilla de la patata, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), ha resultado altamente virulento contra *T. absoluta* (Mascarin et al., 2010). Sin embargo, ninguno de estos tres tipos de

agentes de biocontrol, hongos, bacterias y virus, son de uso generalizado en Sudamérica (Urbaneja et al., 2012).

En la región Mediterránea, a pesar de la eficacia demostrada por las formulaciones basadas en *B. thuringiensis* sobre otros lepidópteros (González-Cabrera y Ferré, 2008), su uso para el control de *T. absoluta* inicialmente se recomendó únicamente cuando los niveles poblacionales de *T. absoluta* eran relativamente bajos (Monserrat, 2009b; 2010). Sin embargo, trabajos posteriores demostraron una elevada efectividad sobre las larvas de todos los estadios, cuando se aplicaron 180,8 MUI/l (Millones de Unidades Internacionales por litro) (González-Cabrera et al., 2011). Esta concentración es capaz de reducir el daño en las plantas donde se aplica en más del 90% comparado con el control. La aplicación semanal de 90,4 MIU/l puede controlar a *T. absoluta* durante todo el ciclo de cultivo sin necesidad de otro tratamiento adicional, incluso cuando las poblaciones son elevadas (González-Cabrera et al., 2011) (**Figura 1.9**). Además, se ha observado que la combinación de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* con *B. thuringiensis* var. *aizawai* demuestra igual eficacia reduciendo el riesgo de aparición de resistencias por parte de la plaga (González-Cabrera et al., 2011). González-Cabrera et al., (2009), observó que el uso de *B. thuringiensis* no afecta en la instalación de los mirdos, lo que podría permitir su combinación con estos enemigos naturales en el control de *T. absoluta* cuando las poblaciones de ambos depredadores no fuese suficiente.



Figura 1.9. Larvas de *T. absoluta* muertas por el efecto de *B. thuringiensis*.

En cuanto al uso de nematodos entomopatógenos, se ha observado que en condiciones de invernadero pueden alcanzar una mortalidad de larvas de *T. absoluta* del 100%, aunque tan solo del 10% en pupas (Batalla-Carrera et al., 2010). El elevado nivel de parasitismo de larvas que pueden alcanzar los nematodos dentro de las galerías pone de manifiesto sus posibilidades para ser integrados con otras estrategias de control (Batalla-Carrera et al., 2010).

	Orden	Familia	Especie	
Parasitoides	Hymenoptera	Eulophidae	<i>Necremnus artynes</i> (Walker)	
			<i>Necremnus metalarus</i> (Walker)	
			<i>Necremnus tidius</i> (Walker)	
			<i>Stenomesus</i> cf. <i>japonicus</i> (Ashmead)	
			<i>Neocrysocharis formosa</i> (Westwood)	
		Braconidae	<i>Bracon</i> cf. <i>nigricans</i> (Szépligeti)	
			<i>Agathis fuscipennis</i> (Zetterstedt)	
			Braconidae sp.	
		Ichneumonidae	<i>Diadegma ledicola</i> Horstmann	
		Trichogrammatidae	<i>Trichogramma achaeae</i> (Nagaraja y Nagarkatti)	
<i>Trichogramma</i> sp.				
Depredadores	Hemiptera	Miridae	<i>Nesidiocoris tenuis</i> Reuter	
			<i>Macrolophus pygmaeus</i> (Rambur)	
			<i>Dicyphus marrocannus</i> Wagner	
			<i>Dicyphus tamaninii</i> Wagner	
			<i>Dicyphus errans</i> Wolf	
		Anthocoridae	<i>Orius majusculus</i> Reuter	
		<i>Orius laevigatus</i> (Fieber)		
		Nabidae	<i>Nabis</i> (<i>Nabis</i>) <i>pseudoferus ibericus</i> Remane	
		Hymenoptera	Sphecidae	Sin determinar
			Formicidae	<i>Pheidole pallidula</i> (Westwood)
Acari	Phytoseiidae	<i>Amblyseius swirskii</i> Athias-Henriot		
		<i>Amblyseius cucumeris</i> (oudemans)		

Tabla 1.2. Enemigos naturales de *T. absoluta* citados en la Cuenca Mediterránea (Adaptado de Urbaneja et al., 2012).

1.3. Míridos depredadores: *Nesidicoris tenuis* y *M. pygmaeus*

Los depredadores zoofitófagos, *N. tenuis* y *M. pygmaeus*, son dos míridos polípagos endémicos que aparecen de forma espontánea en varios cultivos de la costa Mediterránea (**Figura 1.10**) (Alomar et al., 2002; Sánchez et al., 2003; Stansly et al., 2004; Urbaneja et al., 2005). Estos depredadores son utilizados en programas de control biológico por conservación así como criados en masa para su liberación en programas de control biológico inoculativos contra moscas blancas, principalmente en cultivos de invernadero (Alomar et al., 2006; Gerling et al., 2001; Calvo et al., 2012a). Además, son capaces de contribuir al control de otras plagas de importancia como son trips, minadores, pulgones, ácaros y lepidópteros plaga (Calvo et al., 2009; Perdikis y Lykouressis, 2002; van Lentereen, 2012).



Figura 1.10. Adulto de *N. tenuis* (A) y *M. pygmaeus* (B).

1.3.1. Ciclo biológico de *N. tenuis* y *M. pygmaeus*

Ambas especies, presentan un desarrollo hemimetábolo al igual que el resto de los insectos del orden Hemiptera. El ciclo biológico de estas dos especies es muy similar pasando por tres estados diferentes de desarrollo: huevo, ninfa y adulto. El estado de ninfa además comprende cinco estadios ninfales, que se extienden desde la emergencia de la ninfa hasta que alcanza el estado adulto. Al final de cada estadio la ninfa muda para crecer, dejando la cutícula vieja o exuvia como evidencia del cambio de estadio. Las ninfas suelen concentrarse en el ápice de la planta y en las hojas de nuevo crecimiento (Figura 1.11).

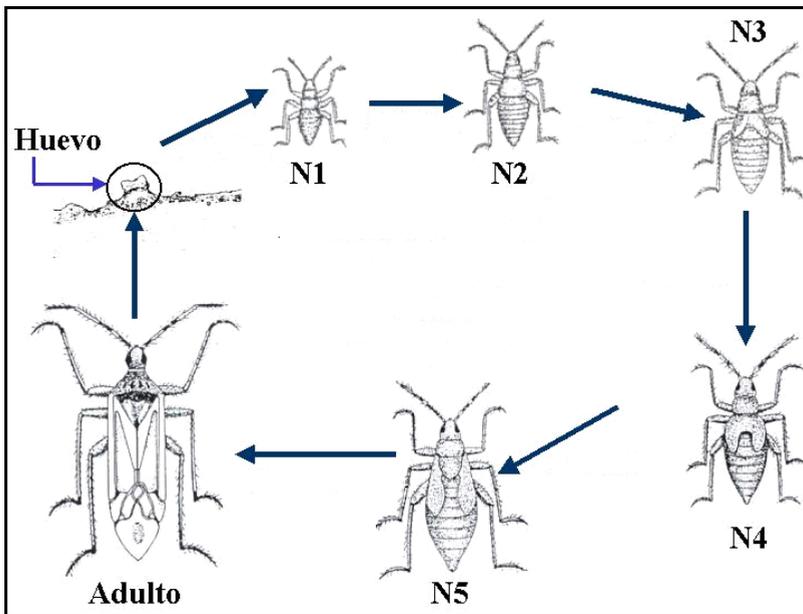


Figura 1.11. Ciclo biológico de *N. tenuis*. (Fuente: G. Tapia. IFAPA, Almería).

Las hembras de ambas especies insertan los huevos dentro de la epidermis de tallos, y nervios foliares, dejando a la vista solamente la lígula (apéndice

respiratorio que sobresale del tejido vegetal) (**Figura 1.12**). El huevo es blancuzo opalescente, alargado y ligeramente curvado. Tras la emergencia del huevo, la ninfa de ambas especies presenta una longitud media entorno a 1 mm. Es delgada, el abdomen es más largo que ancho, y la cabeza es relativamente grande en proporción al cuerpo. Presenta una coloración casi blanca justo después de la emergencia tornándose amarilla al poco tiempo. Los ojos situados a ambos lados de la cabeza presentan una coloración roja. El segundo estadio presenta una longitud media mayor llegando a medir entorno a 1,4 mm, de color verde muy claro, continúa siendo delgada y los ojos presentan una coloración rojo oscuro. La cabeza, el tórax y el abdomen son de color amarillo pero va adquiriendo tonalidades verdosas. Las patas son largas y de color amarillo pálido, al igual que el rostro el cual además presenta la parte distal de color castaño. *Nesidiocoris tenuis* posee el cuarto artejo antenal más largo que los demás, y *M. pygmaeus* presenta las antenas de color amarillo pálido excepto los dos primeros segmentos, los cuales presentan un color amarillo casi uniforme. El tercer estadio ninfal alcanza una longitud media de 1,6 mm y es de color verde amarillento. En este estadio, en ambas especies aparecen los esbozos alares como proyecciones de los segmentos mesotorácico y metatorácico. El cuarto estadio ninfal alcanza una longitud media de 2 mm, es piriforme y los esbozos alares se distinguen mejor que en el estadio anterior, extendiéndose hasta el segundo o tercer segmento abdominal. En *Nesidiocoris tenuis* la base de las antenas es de color castaño brillante y el resto de color grisáceo, mientras en *M. pygmaeus* el primer y segundo segmento antenal es de color amarillo y el resto de la antena de color amarillo pálido. El quinto estadio ninfal ya alcanza una longitud media de 2,5 mm. Su coloración varía entre el verde y el verde

brillante. Las almohadillas alares alcanzan el cuarto segmento abdominal y la genitalia empieza a ser visible externamente.

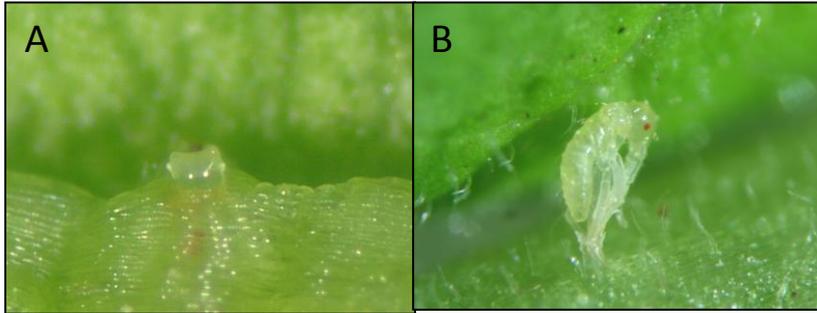


Figura 1.12. Huevo de *N. tenuis* insertado en la epidermis (A) y emergencia de una ninfa del huevo (B).

Tras el último estadio ninfal, ambas especies dedican entre una y dos horas en la última muda, la cual resulta más costosa que las anteriores ya que incluye las alas. El individuo se desprende de la exuvia empujando con las patas traseras. Tras este proceso pasa unos minutos en estado de transición y en reposo hasta que recupera su total actividad. Las alas primero son transparentes y con un aspecto humedecido, mientras que el resto del cuerpo presenta un aspecto seco y va oscureciéndose gradualmente. Los ojos de *N. tenuis* cambian de color rojo oscuro a marrón, y en las alas le aparecen unas manchas de color castaño oscuro. Los ojos de *M. pygmaeus* son de color rojo brillante y presentan una franja longitudinal de color negro detrás del ojo, el vértice del clavus del hemilitro cerca de la membrana son de color negro, y el área posterior de la membrana es también de color negrozco. La cabeza vista dorsalmente es de silueta casi pentagonal y es característica del género *Macrolophus* sp.

Los machos se diferencian de las hembras por tener un abdomen más estilizado y por que la genitalia que aparece como un punto negro al final del abdomen, mientras que las hembras presentan un abdomen abombado y la genitalia en forma de T invertida.

1.3.2. Zoofitofagia

Como ocurre con la mayor parte de míridos, *N. tenuis* y *M. pygmaeus*, muestran un régimen alimenticio mixto, zoófago y fitófago (Sánchez y Lacasa, 2008; Castañe et al., 2011). Gillespie y McGregor, (2000) propusieron 3 modelos de alimentación simple para explicar la zoofitofagia de las especies de esta familia:

- Según el modelo 1, al disminuir la disponibilidad de presa aumenta la fitofagia, que tan solo se daría cuando la presa escasee y el depredador se vea forzado a cambiar sus hábitos alimenticios.
- El modelo 2 hace referencia a un aumento de la fitofagia cuando aumenta la disponibilidad de presa. Esto se debería a que la planta aportaría algún recurso, como el agua, que es necesaria para la digestión. El consumo de la presa estaría entonces limitado por el recurso crítico derivado de la planta.
- Por último en el modelo 3 la fitofagia es independiente a la disponibilidad de presa, ya que el depredador se alimenta de la planta en un ratio constante independiente al consumo de presa.

Nesidiocoris tenuis se comporta según el modelo 1, ya que se ha observado que su fitofagia es inversamente proporcional a la disponibilidad de presa

(Calvo et al., 2009; Arnó et al., 2010; Sánchez et al., 2008). Aunque no existen trabajos dirigidos específicamente en este sentido para *M. pygmaeus*, y por lo general no produce daños que puedan perjudicar a la planta sobre la que se alimenta, este depredador podría comportarse también según el modelo 1, ya que tan solo se han observado daños para esta especie en condiciones de laboratorio con bajo nivel de presa y poblaciones elevadas de depredador (Castañé et al., 2011). En cambio, *Dicyphus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae) se comportaría según el modelo 2, ya que aumenta el daño en tomate en respuesta a un aumento en la disponibilidad de presa debido a que necesita obtener agua de las plantas para realizar la digestión extra-oral de la presa (Gillespie y McGregor, 2000). En cambio *Dicyphus tamaninii* Wagner (Hemiptera: Miridae), se comportaría según el modelo 3, ya que parece que daña los frutos de tomate independientemente de la presa disponible (Lucas y Alomar, 2002).

Nesidiocoris tenuis se alimenta de los tejidos vasculares de la planta produciendo una decoloración marrón (Castañé et al., 2011) conocida como anillos necróticos. Esta alimentación la realiza alrededor de tallos, y pecíolos de flores (**Figura 1.13**) produciendo anillos necróticos que pueden llegar a provocar abortos florales y de pequeños frutos y reducción en el crecimiento de tallos, hojas o incluso de la planta entera. Además, *N. tenuis* puede alimentarse de hojas y frutos donde puede llegar a provocar claras punctaduras (**Figura 1.13**) (Sánchez y Lacasa, 2008; Calvo et al., 2009; Arnó et al., 2010; Castañé et al., 2011). Estos daños pueden afectar a la producción final obtenida a partir de la planta, lo cual conlleva pérdidas económicas (Alomar y Albajes, 1996; Shipp y Wang, 2006; Sánchez, 2009; Arnó et al., 2010). El número de anillos necróticos producidos por *N. tenuis*, es

directamente proporcional al número de individuos presentes en la planta y la temperatura (Arnó et al., 2006; Calvo et al., 2009; Perdakis et al., 2009), e inversamente proporcional a la densidad de presa (Sánchez, 2008).

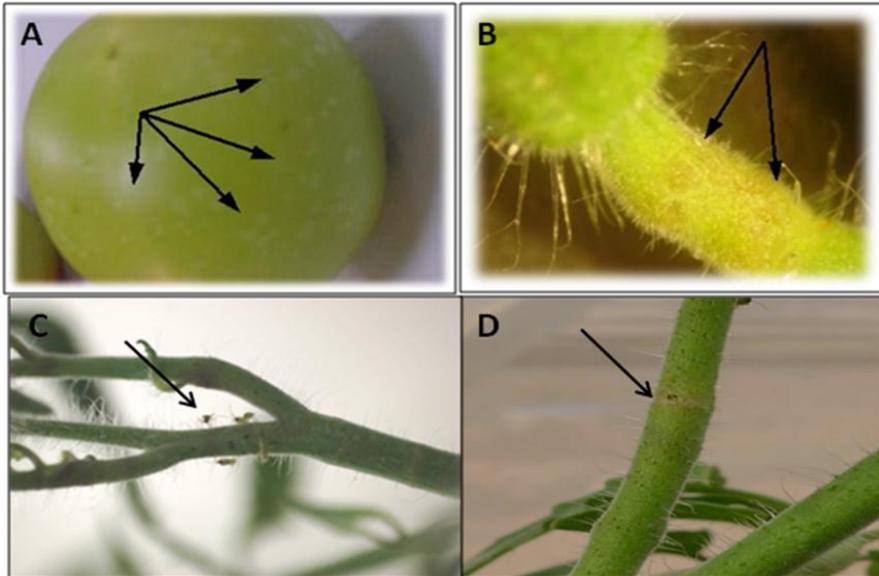


Figura 1.13. Daños producidos por *N. tenuis* en las plantas de tomate. (A) Puncteaduras en fruto, (B) anillos necróticos en el pecíolo de una flor, (C) *N. tenuis* alimentándose de la planta produciendo anillos en tallo, (D) anillo necrótico en tallo.

1.3.3. Míridos como agentes de control biológico en tomate

Los míridos depredadores *N. tenuis* y *M. pygmaeus* son los depredadores más usados comúnmente en Europa para el control de moscas blancas y *T. absoluta* en el cultivo de tomate. Para el uso de éstos como agentes de control biológico pueden seguirse tres estrategias dependiendo de las condiciones del cultivo y del nivel de plaga presente: conservación (aparición espontánea), inoculación/aumentó (realización de sueltas) y la combinación de ambas (Gabarra y Arnó, 2010).

La estrategia de conservación se basa en el hecho de que tanto *N. tenuis* como *M. pygmaeus* son dos enemigos naturales endémicos que aparecen de forma espontánea en varios cultivos de la Cuenca Mediterránea (Alomar et al., 2002; Sánchez et al., 2003; Calvo y Urbaneja, 2003; Stansly et al., 2004; Urbaneja et al., 2005).

Por tanto, la adopción de plaguicidas selectivos así como de estrategias respetuosas con ambos míridos favorecerán la aparición e instalación de estos depredadores en el cultivo (Arnó y Gabarra, 2011; Gabarra et al., 2008). Además, ambos depredadores son criados en masa para su liberación en programas de control biológico inoculativos contra moscas blancas, principalmente en cultivos de invernadero (Gerling et al., 2001; Calvo y Urbaneja, 2004; Alomar et al., 2006; Arnó et al., 2009c; Calvo et al., 2009; 2012a). La practica más común en la inoculación de *N. tenuis* y *M. pygmaeus*, en invernadero de tomates ha sido la liberación de 1 individuo/m² que suele realizarse 4-5 semanas después del trasplante y resulta efectiva en el control de *B. tabaci* (Avilla et al., 2004; Calvo et al., 2009). Sin embargo, para que esta estrategia resulte exitosa se debe alcanzar un determinado número del depredador en el cultivo (Calvo et al., 2009). El problema es que alcanzar este nivel poblacional no es tan sencillo, ya que se requieren de 5-8 semanas para alcanzar el número necesario de depredadores, tras su liberación en los cultivos de primavera-verano, tiempo suficiente para que las poblaciones de plaga puedan haber producido ya graves daños al cultivo.

Tanto *N. tenuis* como *M. pygmaeus* son depredadores polífagos, lo que les permite usar un amplio rango de fitófagos plaga como presa y contribuir a su control biológico. Entre sus presas se encuentran trips, minadores, pulgones,

ácaros y lepidópteros plaga (Calvo et al., 2009; Perdakis y Lykouressis, 2002; van Lentereen, 2012). Esta polífgia permite que ambos depredadores puedan adaptarse a depredar sobre nuevas plagas, como ocurrió en el caso de *T. absoluta*.

1.3.4. Míridos como agentes de control biológico de *T. absoluta*

Inmediatamente después de la aparición de *T. absoluta* en España, se observó a ambos depredadores alimentándose tanto de huevos como de todos los estadios larvarios de este fitófago (Urbaneja et al., 2009). Los primeros estudios realizados con estas dos especies de míridos depredando *T. absoluta*, los mostraron como agentes potenciales en control biológico sobre este nuevo fitófago plaga (Arnó et al., 2009a; Urbaneja et al., 2009). Los adultos de *N. tenuis* y *M. pygmaeus* fueron capaces de depredar más de 100 huevos de *T. absoluta* por individuo y día sin mostrar diferencias significativas entre ambas especies (Arnó et al., 2009a). En condiciones de invernadero *N. tenuis* y *M. pygmaeus* fueron capaces de reducir el daño de *T. absoluta* hasta un 97% y un 76% en foliolo y un 100 % y un 56% en fruto, respectivamente, pero para alcanzar éste cometido se necesitó que los depredadores alcanzaran un cierto número poblacional (Mollá et al., 2009). Estos resultados invitan a pensar en estos dos míridos como posibles candidatos a ser integrados en las estrategias de control de esta plaga (Urbaneja et al., 2008).

2. Justificación y objetivos



La presente tesis pretende profundizar en las posibilidades de control biológico de una plaga exótica, la polilla del tomate, *T. absoluta*, mediante la gestión de los míridos depredadores autóctonos *N. tenuis* y *M. pygmaeus*. Estos dos depredadores son agentes de control biológico eficaces en el control de plagas (principalmente moscas blancas) de invernadero. Tras la aparición de *T. absoluta* en España, ambos depredadores se encontraron depredando sobre esta nueva plaga. Por ello, en esta tesis doctoral se estudió el potencial depredador de *N. tenuis* y *M. pygmaeus* con la finalidad de ver si estos míridos pueden ser incluidos en estrategias de gestión integrada de *T. absoluta*. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. **El primer objetivo** fue determinar y comparar los parámetros biológicos de estos míridos cuando se alimentaban exclusivamente de huevos de *T. absoluta*.
2. **El segundo objetivo** fue determinar la capacidad de detección y la preferencia de presa del mírido *N. tenuis* cuando las presas *B. tabaci* y *T. absoluta* coexisten en el cultivo.
3. **El tercer objetivo** fue determinar una estrategia de control de *T. absoluta* basada en el uso combinado de tratamientos con *B. thuringiensis* y la inoculación de *N. tenuis*.
4. **El cuarto objetivo** fue determinar los daños producidos en planta por *N. tenuis* en presencia de *T. absoluta*.

3. Material y métodos



3.1. Estudio comparativo de los parámetros biológicos de dos míridos depredadores sobre huevos de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) y de *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyrelidae) sobre tomate: Implicaciones para el control biológico



3.1.1. Insectos y material vegetal

Todas las plántulas de tomate utilizadas en estos experimentos eran de la variedad Bodar (Seminis Vegetable Seeds, Inc., Almería, España) y procedían de un semillero libre de plagas y tratamientos químicos. Estas plántulas se trasplantaron a macetas de plástico negro de (11 x 11x 12 cm) con un sustrato de perlita y tierra (1:3; v:v) y se dejaron crecer en un invernadero libre de plagas localizado en el IVIA hasta que las hojas obtuvieron el tamaño necesario para su utilización. Las condiciones climáticas del invernadero fueron $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $60 \pm 5\%$ HR y fotoperiodo natural.

Los individuos de *T. absoluta* utilizados en este experimento provenían de la cría artificial de este fitófago localizada en el IVIA. Esta cría se inició con individuos capturados en campos de tomate localizados en el norte de la provincia de Castellón, y se liberaron en jaulas de cría (120 x 70 x 125 cm). En cada unidad de cría (jaula) se introducían semanalmente 6 plantas de tomate de aproximadamente 30 cm de altura. La cría se mantuvo a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $60 \pm 5\%$ HR y bajo fotoperiodo natural. Los huevos de *T. absoluta* usados durante este experimento se recogieron de las plantas de las crías mediante el uso de un pincel. Se escogían huevos de color blanco cremoso (edad < 24 horas). Los huevos de *E. kuehniella*, y los individuos de *N. tenuis* y *M. pygmaeus* provenían de la cría artificial en masa de Koppert Biological Systems (Águilas, Murcia).

3.1.2. Tiempo de desarrollo y supervivencia de los estadios juveniles

Los adultos de ambas especies se liberaron separadamente en cajas de metacrilato con 4 plantas de tomate. Sobre estas plantas se ofrecían huevos de *E. kuehniella ad libitum* cada dos días como alimento para los depredadores. Tras una semana de exposición, tiempo suficiente para que los depredadores realizaran la puesta sobre las plantas, éstas se cortaron en pequeñas secciones que se colocaron en placas Petri de 60 mm de diámetro. Dentro de cada placa Petri se colocó un trozo de papel de filtro del mismo diámetro que la placa Petri, para evitar la condensación por exceso de humedad. Estas placas eran revisadas diariamente con la finalidad de observar la emergencia de las ninfas. Las ninfas recién emergidas menores de 24 horas de vida se individualizaron en placas Petri de 60 mm de diámetro con un disco de hoja de tomate de 40 mm de diámetro, una bolita de algodón humedecido en agua y huevos de *T. asboluta* o *E. kuehniella* como fuente de alimento, en función del tratamiento al cual se asignaron (**Figura 3.1.1**). La cantidad de huevos ofrecida se aumentó con cada cambio de estadio de desarrollo del individuo y siempre fue superior a su requerimiento diario. El desarrollo de las ninfas (la presencia de exuvia se usaba como evidencia de cambio de estadio), la supervivencia de las ninfas y la cantidad de huevos depredados fueron revisados diariamente, mediante un microscopio binocular, hasta que el insecto moría o alcanzaba el estado adulto. Las ninfas se traspasaban diariamente a una placa Petri nueva con las mismas condiciones que las

explicadas anteriormente. Las placas Petri se mantenían en una cámara climática a $25 \pm 2^\circ \text{C}$, $60 \pm 5\% \text{HR.}$, 16:8 h L:O.



Figura 3.1.1. Arena experimental utilizada para el estudio del desarrollo de las ninfas.

3.1.3. Parámetros reproductivos

Los nuevos adultos recién emergidos de *N. tenuis* y *M. pygmaeus* del experimento de desarrollo se utilizaron para el estudio de sus parámetros reproductivos. Para ello, se separaron parejas de ambas especies en función del tratamiento del cual procedían. La arena experimental utilizada en este estudio (Sánchez et al., 2009), consistió en un vaso de plástico de (370 cm^3) en la base del cual se introdujo la parte apical de una planta de tomate sobre la cual se depositaron 100 huevos de *T. absoluta* o 100 huevos de *E. kuehniella*, según el alimento que recibieron durante el experimento de desarrollo. Posteriormente, cada vaso de plástico se introdujo dentro de otro de menor capacidad (230 cm^3) lleno de agua hasta la mitad. Los tallos apicales se introducían a través de un agujero realizado en la base del vaso superior, de forma que este quedaba en contacto con el agua del vaso inferior, lo cual permitió que el ápice de la planta de tomate se mantuviera turgente durante el tiempo que duraba el experimento. El

vaso superior se cerraba con una malla fina que se sujetaba con una goma elástica (**Figura 3.1.2**).

Las parejas se transfirieron cada dos días a una nueva arena experimental con 100 huevos nuevos de la respectiva presa hasta la muerte de la hembra. Para asegurarnos de que la hembra se apareaba durante toda su vida, con cada hembra se liberaba un macho (proveniente del correspondiente ensayo de desarrollo), el cual se sustituía en caso de que este muriese. Las arenas experimentales se mantuvieron en una cámara climática a $25 \pm 2^\circ \text{C}$, $60 \pm 5\% \text{HR}$, 16:8 h L:O. La supervivencia de los adultos se revisaba diariamente, mientras la emergencia de las ninfas en los vasos se revisaba cada dos días. Para evaluar la proporción de sexos de la descendencia, se escogieron 4 hembras al azar (de cada una de las dietas) y su descendencia se dejó alcanzar el estado adulto en las mismas arenas experimentales donde emergieron, ofreciéndoles como alimento huevos de *E. kuehniella* (*ad libitum*).



Figura 3.1.2. Arena experimental utilizada para el estudio de los parámetros reproductivos.

3.1.4. Parámetros demográficos

Las tablas de vida se construyeron usando los valores diarios de supervivencia y progenie de las hembras.

Por lo tanto, los siguientes parámetros de crecimiento fueron generados:

Tasa neta de reproducción o tasa básica de reproducción:

$$R_o = \sum l_x m_x$$

Donde la x es la edad de los individuos por día, l_x es la edad específica de supervivencia como la proporción de vivos hasta la edad x y m_x es la edad específica de fertilidad (Birch, 1948). Este parámetro corresponde con el número de veces que una población se multiplicará por generación.

Tiempo de generación:

$$T = \sum \frac{x l_x m_x}{R_0}$$

que es el intervalo medio de tiempo desde el nacimiento de la hembra de una generación hasta la siguiente (Birch, 1948).

Tasa intrínseca de crecimiento:

$$r_m = \sum e^{r_m x} l_m m_x$$

que es la capacidad innata de las especies de crecer en número. Biológicamente, este parámetro es el número de veces que una población se multiplicará por unidad de tiempo, y donde e^{r_m} es el antilogaritmo de la r_m (Birch, 1948).

Tiempo para doblar la población:

$$DT = \frac{\log_e 2}{r_m}$$

es el tiempo requerido para que la población crezca exponencialmente sin límite para doblar en tamaño la población por el incremento de la r_m (Mackauer, 1983).

Para estimar el error estándar asociado con r_m , R_0 , T y DT se usó la técnica de Jackknife, calculando por cápita r_m , R_0 , T y DT , cada vez, omitiendo una repetición, este proceso se repitió hasta omitir todos los casos posibles de pseudo-valores.

3.1.5. Análisis estadístico

Las diferencias entre los parámetros biológicos entre depredadores, el tiempo de desarrollo desde la emergencia de la ninfa hasta que alcanzaron el estado adulto, el número total de huevos consumidos desde huevo hasta adulto, y por estadio ninfal, la longevidad de las hembras, la proporción de sexos de la descendencia, y los 4 índices demográficos fueron analizados, por cada dieta, usando un test de *t*-Student. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$. Mientras, los datos de supervivencia de las ninfas fueron analizados usando las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y el efecto de la dieta fue analizado usando un test de Chi-cuadrado. Antes del análisis, los datos fueron analizados para saber su normalidad y homogeneidad de la varianza usando un test de Kolmogorov-Smirnov o un test de Cochran, y se realizó una transformación angular de los datos cuando se consideró necesaria.

3 2. Detección y preferencia de presa entre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) y *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) por el depredador *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Hemiptera: Miridae).



3.2.1. Insectos y material vegetal

Los insectos utilizados en este estudio provenían de la cría artificial llevada a cabo en las instalaciones del IRTA Cabrils en condiciones controladas de laboratorio: $25 \pm 2^\circ \text{C}$, y un fotoperiodo de 16:8 (L:O) horas. Todas las crías se iniciaron con insectos capturados en cultivos hortícolas cercanos a Barcelona. *Tuta absoluta* se crió sobre planta de tomate (var. Bond F1, DeRuiter Vegetable Seeds, Inc) mientras que *B. tabaci* se crió sobre plantas de col (var. Savoy King F1, Sakata Seeds Europe BV). La colonia de *N. tenuis* se mantuvo sobre plantas de tabaco (cv. Brazilian Blend) y se le ofreció huevos de *E. kuehniella* (*ad libitum*) como alimento. Todas las crías se llevaron a cabo en cajas de metacrilato (54 x 37 x 44 cm) (largo x ancho x alto).

3.2.2. Ensayo con el olfactómetro de tubo en forma de “Y”

El olfactómetro usado en este experimento consistía en un tubo de cristal en forma de Y (**Figura 3.2.1**), cuyos brazos medían 17 cm de longitud y 3,5 cm de diámetro. El ángulo entre ambos brazos era de 80° , y el ángulo entre cada brazo y el cuerpo principal era de 140° . Cada brazo estaba conectado a la tapa de un frasco de cristal de 2 litros de volumen mediante un tubo de poliuretano de 50 cm de longitud y 0,5 cm de diámetro. A su vez la tapa de cada frasco contenía un tubo de entrada de aire que lo conectaba a una bomba de aire (Nathura®, ECIS, Bessanvido, Italia), la cual producía una corriente constante de aire desde los frascos pasando por los brazos del olfactómetro hasta la base del tubo principal. Esta corriente de aire se mantuvo a una velocidad constante de $0,20 \pm 0,02 \text{ m/s}$ pasando a través del

tubo de entrada del frasco, y posteriormente por el tubo de salida que conectaba el frasco con los brazos del olfactómetro. Los tubos de salida estaban cubiertos con una malla de 0,3 mm de luz en la parte interior del frasco, para evitar que los insectos pudiesen escapar (**Figura 4.1**).

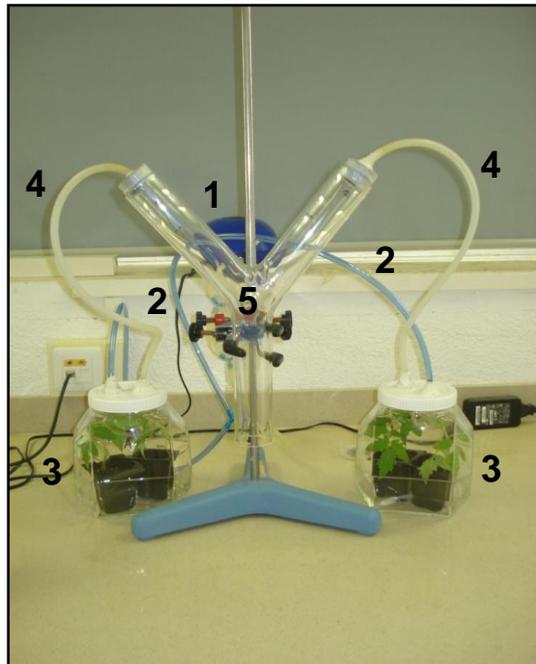


Figura 3.2.1. Olfactómetro vertical en forma de “Y”. Se observa la bomba de aire (1), los tubos de entrada (2) que llevan el aire hasta los frascos (3), los tubos de salida (4) que van desde los frascos llevan el aire impregnado de olor hasta los brazos del olfactómetro (5).

Se comparó la atracción de las hembras de *N. tenuis* por varias fuentes de olor. Las diferentes combinaciones de olores que se compararon se muestran en la **tabla 3.2.1**.

Fuentes de olor	
Plantas infestadas con:	Plantas infestadas con:
Huevos de <i>T. absoluta</i>	Nada
Huevos de <i>B. tabaci</i>	Nada
Larvas de <i>T. absoluta</i>	Nada
Ninfas de <i>B. tabaci</i>	Nada
Huevos de <i>T. absoluta</i>	Huevos de <i>B. tabaci</i>
Larvas de <i>T. absoluta</i>	Ninfas de <i>B. tabaci</i>

Tabla 3.2.1. Diferentes combinaciones de fuentes de olor a las que se expusieron las hembras de *N. tenuis*.

Para obtener plantas infestadas con huevos de *T. absoluta* se colocaron dos plantas de tomate de aproximadamente 10 cm de altura y con 5 hojas formadas (var. Bond) en una caja cilíndrica de metacrilato (20 cm de diámetro y 30 cm de altura). En dicha caja se liberaron 40 adultos de *T. absoluta* durante 4 días, tiempo suficiente para que las hembras de *T. absoluta* liberadas realizaran puesta sobre la planta. Pasado este tiempo, los insectos se retiraron. El mismo procedimiento se siguió para obtener plantas infestadas con huevos de *B. tabaci*. En este caso se liberaron 80 adultos de *B. tabaci*.

Para obtener plantas infestadas con larvas de *T. absoluta* o ninfas de *B. tabaci* se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente. Tras retirar los adultos de ambas especies las plantas con puestas o bien de *T. absoluta* o bien de *B. tabaci* se dejaron en una cámara climática durante 7 días a $25 \pm 2^\circ$ C, y un fotoperiodo de 16:8 (L:O) horas. Tiempo suficiente

para que eclosionaran los huevos de ambas especies y conseguir larvas de *T. absoluta* o ninfas de *B. tabaci*.

Para realizar un preacondicionamiento alimentario del depredador, 60 hembras de *N. tenuis* de menos de 5 días de vida se colocaron durante 3 días en un frasco de cristal de 2 litros de capacidad junto con 2 plantas de tomate aproximadamente de 10 cm de longitud y 5 hojas ya formadas, donde previamente se habían liberado 20 adultos de *T. absoluta* y 40 de *B. tabaci*. Tras este periodo, las hembras del depredador se sometieron a un ayuno de 24 horas. Para ello, se introdujeron en frascos similares a los que se usaron para el preacondicionamiento alimentario. Dentro del frasco solo había un trozo de papel arrugado y un tubo de ensayo de 10 ml de capacidad relleno con agua sellado con un tapón de algodón humedecido. Una vez transcurrido el ayuno las hembras de *N. tenuis*, se individualizaron en tubos de ensayo de 10 ml de capacidad. Tras este periodo, se introdujeron individualmente en el olfactómetro a través del tubo principal y se observaban durante 10 minutos. Se consideraba como elección del brazo (y por lo tanto del olor proveniente del frasco conectado), cuando la hembra caminaba más de 6 cm dentro de éste. Las hembras que no eligieron ninguno de los brazos en 10 minutos se registraron como no respuesta. Cada hembra fue probada solo una vez y se usaron 40 individuos del depredador para cada combinación binaria.

El olfactómetro se limpiaba cada 5 hembras expuestas con alcohol al 96%. En cada limpieza se invertía el tubo 180° sobre su mismo eje. A su vez, cada 10 hembras ensayadas se cambiaban los frascos de posición para garantizar

que la elección por parte de las hembras no estaba influida por factores externos.

3.2.3. Preferencia de presa y consumo

Con la finalidad de conocer la preferencia de presa de *N. tenuis* (hembras y ninfas de 4º estadio) por *T. absoluta* y *B. tabaci*, se diseñaron dos tipos de experimento. Ambos experimentos se llevaron a cabo en una cámara climática a $25 \pm 2^\circ$ C, y un fotoperiodo de 16:8 (L:O) horas.

3.2.3.1. Preferencia entre dos presas ofrecidas en exceso

Para este experimento, se usaron hembras de *N. tenuis* de menos de 5 días de edad y ninfas de 4º estadio. Se ofrecieron cinco dietas diferentes, en tres de ellas solo se ofreció una de las presas: huevos de *T. absoluta*, adultos de *B. tabaci* o ninfas de *B. tabaci*; mientras en las otras dos se ofreció la combinación de dos de las presas: huevos de *T. absoluta* junto con adultos de *B. tabaci* o huevos de *T. absoluta* junto con ninfas de *B. tabaci*.

Como arena experimental se utilizó una caja circular de plástico transparente (4,7 cm de diámetro en la parte inferior, 7 cm en la parte superior y 4,8 cm de altura) donde se depositó un disco de hoja de tomate (var. Bond.) con el envés hacia arriba y el haz en contacto con una capa de 25 ml de agar (0,5 % p:v) previamente depositada (**Figura 3.2.2**). La arena experimental se cerraba mediante una tapa transparente, en la que se habían realizado varios agujeros mediante el uso de una aguja entomológica para evitar el exceso de humedad. Además, presentaba un

agujero en la parte central de 1 cm de diámetro sellado con un algodón, por donde se introducían los individuos de *N. tenuis* o los adultos de *B. tabaci*.

Para infestar las arenas experimentales con huevos de *T. absoluta*, éstas se colocaron en una caja de cría donde se liberaron más de 300 adultos del lepidóptero durante 48 horas. Las ninfas de 3º estadio de *B. tabaci* se cogieron con mucho cuidado, directamente de las hojas de col con la ayuda de una aguja entomológica y se situaban a continuación sobre la arena experimental. Los adultos de *B. tabaci* se capturaron con la ayuda de un aspirador entomológico y se liberaron en el interior de la arena experimental a través del agujero de 1 cm de diámetro que se realizó en la tapa y posteriormente se sellaba con un algodón.

El número de presa que se ofreció a las hembras de *N. tenuis* fue: $94,1 \pm 0,7$ huevos de *T. absoluta*, 20 adultos de *B. tabaci* y 50 ninfas de *B. tabaci*; mientras que a las ninfas de 4º estadio se les ofreció: $66,5 \pm 1,5$ huevos de *T. absoluta*, 20 adultos de *B. tabaci* y 40 ninfas de *B. tabaci*.

Antes del comienzo del experimento, ambos estados del depredador fueron sometidos a un precondicionamiento alimentario de 7 días. Para ello, se liberaron por separado hembras de *N. tenuis* de menos de 5 días de edad y ninfas de 2º y 3º estadio en frascos de 2 litros de capacidad, que contenían 2 plántulas de tomate de aproximadamente 10 cm de altura y 5 hojas, 20 adultos de *T. absoluta* y 40 adultos de *B. tabaci* $25 \pm 2^\circ$ C, y un fotoperiodo de 16:8 (L:O) horas.

Al final del precondicionamiento, las ninfas de 2º y 3º estadio habían alcanzado el estadio deseado (4º estadio). Tras este periodo, los

depredadores fueron sometidos a un ayuno de 24 horas. Las hembras y las ninfas de 4º estadio se introdujeron por separado en frascos similares a los que se usaron para el preacondicionamiento alimentario. Dentro del frasco solo había un trozo de papel arrugado y un tubo de ensayo de 10 ml de capacidad relleno con agua sellado con un tapón de algodón humedecido. Se llevaron a cabo 15 repeticiones por tratamiento para cada estado del depredador. Para evaluar la mortalidad de las presas debida al manejo de las mismas se prepararon 10 arenas por tratamiento en las que el depredador estaba ausente. Veinticuatro horas tras el inicio del experimento, se evaluó el número de presa depredada con la ayuda de un microscopio binocular. No hubo reemplazo de presa durante el experimento.

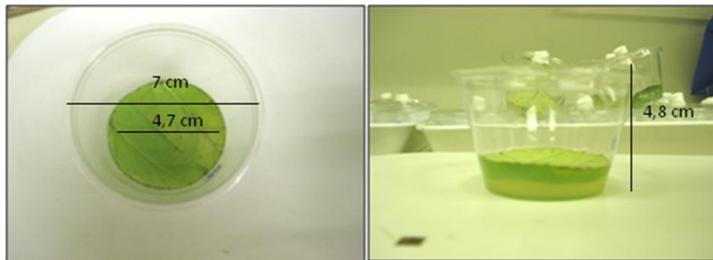


Figura 3.2.2. Arena experimental usada para el ensayo de preferencia y consumo entre dos presas.

3.2.3.2. Preferencia entre presas ofrecidas en número limitado

Al igual que en el experimento anterior, se usaron hembras de *N. tenuis* de menos de 5 días de edad y ninfas de 4º estadio. Se colocó un disco de hoja de tomate (var. Bond) con el envés hacia arriba y el haz en contacto con una capa de agar de 25 ml (0,5 % p:v) en unas placas Petri de plástico

transparentes de 4 cm de diámetro. Estas presentaban en su tapa dos orificios sellados con esparadrapo hipoalergénico que permite la transpiración para eliminar el exceso de humedad impidiendo el escape de los insectos a través de los agujeros (**Figura 3.2.3**). El depredador fue liberado dentro de las cajas junto con cuatro presas diferentes ofrecidas simultáneamente en un experimento conocido como de cafetería. Este tipo de experimento consiste en ofrecer a un depredador varios tipos de alimento en igual abundancia de forma que la disponibilidad de presa no influye directamente en la preferencia. Al no reemplazarse la presa depredada, la presa preferida es la que es consumida primero (Krebs, 1999). Las presas ofrecidas fueron: huevos jóvenes de *T. absoluta*, huevos jóvenes de *B. tabaci* (coloración amarilla), ninfas de *B. tabaci* de 3º estadio y adultos de *B. tabaci*. Se ofrecieron 5 individuos de cada una de las presas. Tanto las hembras como las ninfas de *N. tenuis* fueron sometidas a un ayuno de 24 horas, en las mismas condiciones que las descritas en el apartado anterior. Se realizaron 20 repeticiones por cada estado del depredador. Además se prepararon 10 arenas en las que no se liberó depredador para evaluar la mortalidad de las presas debido a su manejo. La presa depredada se evaluó con la ayuda del microscopio binocular 2, 4, 8 y 24 horas después del inicio del experimento. No se reemplazó la presa depredada durante el experimento.



Figura 3.2.3. Arena experimental usada en el ensayo de preferencia de cafetería.

3.2.4. Análisis estadístico

En el estudio con el olfactómetro en Y, para conocer la preferencia por un olor determinado, se analizó mediante un test binomial (two-sided) (SAS software 2002, SAS Institute, Cary, NC, USA). Los insectos que no respondieron a ningún estímulo olfatorio, no se incluyeron en el análisis.

El número de presa depredada cuando ésta se ofreció como única presa o en combinación con otra de las presas, para cada estado del depredador, se comparó usando un test *t*-Student. Se consideró que habían diferencias significativas cuando $P < 0,05$.

Para analizar la preferencia de presa del depredador cuando se ofrecieron 2 presas conjuntamente se utilizó el índice de β -Manly (Krebs, 1999). Este índice se usa cuando no es posible reponer la presa depredada y solo se puede usar cuando el número de presa que queda sin depredar es superior a 10 individuos, usando la siguiente fórmula:

$$\beta_1 = \log (e_1/A_1) / \log (e_2/A_2) + \log (e_1/A_1)$$

Donde: “ β_1 ” es el índice de preferencia para la presa 1; “ e_1 ” y “ e_2 ” son el número de presa 1 ó 2 que queda viva al final del experimento “A1” y “A2” son el número de presa 1 ó 2 presentes al inicio del experimento. El valor de β está entre 0 y 1. Por lo que, la elección de presa por parte del depredador es al azar si $\beta = 0.5$. Para comparar los valores del índice entre cada estado del depredador se usó un test *t*-Student.

Para analizar la preferencia de presa en el experimento de cafetería, se utilizó el índice de Rodgers (Krebs, 1999). Para calcular el índice de Rodgers, se calculó el área por debajo de cada curva de consumo acumulado y para cada especie de presa frente al tiempo. Los valores obtenidos se normalizaron a un rango entre 0-1 siguiendo la siguiente fórmula:

$$R_i = A_i / \max(A_i)$$

Donde: “ R_i ” es el índice de preferencia de Rodgers para las especies “ i ”; “ A_i ” es el área de consumo acumulada por especie “ i ”; “ $\max(A_i)$ ” es el valor máximo de “ A_i ”.

Para cada individuo del depredador, la presa favorita viene dada por un valor de preferencia de 1, y el valor de la presa menos preferida viene dado por el menor valor de preferencia. Los índices de preferencia de presa de Rodgers obtenidos para cada estado del depredador y el número total de presa depredada por ambos estados del depredador al final del experimento de cafetería se analizaron mediante un test de análisis de la varianza de un factor (ANOVA). Cuando se detectaron diferencias estadísticas se aplicó un post-test de Tukey ($P = 0,05$).

3.3.1. Instalaciones

El experimento se llevó a cabo en un invernadero de 40 × 10 m, equipado con un sistema de riego por goteo, localizado en el IVIA en Moncada (Valencia, España) (**Figura 3.3.1**). El acceso al invernadero es a través de una puerta doble de malla. El invernadero está dividido en 12 jaulas de malla antitrips de poliestireno de 220 × 331 µm de intersticio, y el suelo está cubierto con malla de poliestireno negro de 2 mm de grosor. Cada jaula experimental medía 2,5 × 2 × 2,5 m (largo × alto × ancho) y se accedía por una puerta cerrada con cremallera.



Figura 3.3.1. Invernadero de malla, situado en el IVIA (Moncada) con cierre de doble puerta utilizado en este experimento.

3.3.2. Condiciones ambientales

En la jaula central, se colocó un datalogger (model TESTO 175-H2, Amidata S.A. Pozuelo de Alarcón, Madrid) para registrar la temperatura y la humedad relativa. La temperatura media durante el experimento varió

entre 30,9°C el 23 de julio de 2009 y 18,7°C el 28 de septiembre de 2009, con un mínimo y un máximo absoluto de 13,1°C y de 41°C, respectivamente. La humedad relativa media varió entre 98,5% el 6 de septiembre de 2009 y 52,3% el 18 de julio de 2009, con valores absolutos de 99,9 % y 23,7 %, respectivamente.

3.3.3. Manejo del cultivo

Con la finalidad de obtener un cultivo homogéneo de plantas libres de plaguicidas, el día 31 de Marzo de 2009, se sembraron semillas de tomate tolerante a TYLCV, variedad “Virgilio” (Clause Vegetable Seeds, Reino Unido) en bandejas de poliestireno de 70 × 45 cm con un tamaño de celda de 5,4 cm². La semilla se depositó en la celda donde había como sustrato una mezcla de arena y turba (1:2 p/p) y se dejaron en una cámara de crecimiento (CMP, Conviron Europe Ltd. Cambridgeshire, UK) a una temperatura de 25 ± 2° C, 60 ± 10% de humedad relativa, y un fotoperiodo de 16:8 h (L:O). El 15 de mayo de 2009, las plantas previamente sembradas, fueron individualizadas en macetas de polietileno de una capacidad de 20 l. Las macetas se rellenaron con el medio de cultivo descrito anteriormente y se colocaron en el interior de las jaulas experimentales del invernadero en dos filas de 5 plantas cada una (1,25 plantas m²) (**Figura 3.3.2**).

Para este experimento se utilizaron las técnicas usuales de cultivo en invernadero de España. Cada planta se entutoró a una caña (*Arundo donax* L.) (**Figura 3.3.2**), en el cual se ataba el tallo principal con la ayuda de una banda plástica de polietileno, se podaban los brotes secundarios semanalmente, y se aplicaba una solución nutritiva estándar para tomate

mediante el sistema de auto-riego con una irrigación frecuente ajustada a las condiciones ambientales y un tiempo de 15 minutos.



Figura 3.3.2. Vista del interior de las jaulas usadas para el experimento. Se puede apreciar la disposición de las plantas, las cañas usadas para el entutorado y las gomas del sistema de riego por goteo.

3.3.4. *Tuta absoluta* y enemigos naturales

Los individuos de *T. absoluta* utilizados en este experimento provenían de la cría artificial de este fitófago localizada en el IVIA. Esta cría se inició con individuos capturados en campos de tomate localizados en el norte de la provincia de Castellón, y se liberaron en jaulas de cría (120 x 70 x 125 cm). En cada unidad de cría (jaula) se introducían semanalmente 6 plantas de tomate de aproximadamente 30 cm de altura. La cría se mantuvo a $25 \pm 1^\circ$ C, $60 \pm 5\%$ HR y bajo fotoperiodo natural.

Los individuos de *N. tenuis* (NESIBUG®) liberados inicialmente, provenían de Koppert Biological Systems, S.L., Águilas, Murcia. La formulación comercial basada en *B. thuringiensis* utilizada en este experimento fue Costar® (*B. thuringiensis* var. *Kurstaki*, 90,4 MUI l⁻¹, WG) distribuido en España por Syngenta Agro. S.A. (Madrid). Esta formulación comercial demostró una gran eficacia sobre *T. absoluta* en cultivo de tomate tanto en invernadero como al aire libre durante la temporada de cultivo de 2009 (González-Cabrera et al., 2011).

3.3.5. Diseño experimental

Se probó la combinación de tratamientos con *B. thuringiensis* con la suelta inoculativa de *N. tenuis* para el control de *T. absoluta* en las 12 jaulas del invernadero (10 plantas por jaula, ver **Figura 3.3.2**). La distribución de los 4 tratamientos en las diferentes jaulas fue al azar, de forma que cada tratamiento se repitió 3 veces (**Figura 3.3.3**). En 3 de los 4 tratamientos, se realizaron aplicaciones con *B. thuringiensis* semanalmente a una concentración de 180,8 MUI l⁻¹ (2g l⁻¹), durante un tiempo de 2 meses (Bt1), 3 meses (Bt2) y durante todo el experimento (Bt3), en el último de los tratamientos se aplicó agua y fue usado a modo de control. Las aplicaciones con *B. thuringiensis* se realizaron con una mochila de pulverización (SuperAgro 20, Matabi, Antzuola, Guipuzcua, España).

Para simular un ataque fuerte y constante de *T. absoluta* en el cultivo, en cada jaula se liberaron 10 parejas de *T. absoluta* semanalmente, empezando el día 21 de mayo de 2009.

Para que el control de *T. absoluta* con *B. thuringiensis* sea efectivo, es crucial empezar los tratamientos en el momento correcto (González-Cabrera et al. 2011). En condiciones de campo, se recomienda empezar los tratamientos inmediatamente después de que aparezcan los primeros individuos de *T. absoluta* capturados en las trampas de feromona. Como no fue posible colocar las trampas de feromona dentro de las jaulas, se decidió revisar cuidadosamente todas las plantas del invernadero. Dos semanas después de la primera suelta de *T. absoluta*, se detectaron los primeros huevos y las primeras larvas de primer estadio de *T. absoluta* (4 de junio de 2009), momento en el que se decidió comenzar con las aplicaciones de *B. thuringiensis*. El 9 de junio de 2009, se liberó 1 *N. tenuis* por planta en todas las jaulas donde se aplicó *B. thuringiensis*. Un *N. tenuis* por planta es la dosis recomendada en el cultivo de tomate (Calvo et al., 2009, 2010) para este tipo de sueltas inoculativas. Los tratamientos con *B. thuringiensis* acabaron el 7 de agosto de 2009 para el tratamiento Bt1, y el 4 de septiembre para el Bt2. El cultivo terminó el 16 de octubre de 2009. El 3 de julio, se trataron todas las jaulas con spiromesifen (Oberon® 24% p:v; Bayer Cropscience, España) para controlar una infestación accidental de *Aculops lycopersici* (Masse) (Acari: Eriophyidae). Se seleccionó spiromesifen por su alta efectividad sobre *A. lycopersici* (Elbert et al., 2005), y su baja toxicidad sobre míridos (Nicolaus et al., 2005; Bielza et al., 2009; Bayer CropScience, 2010).

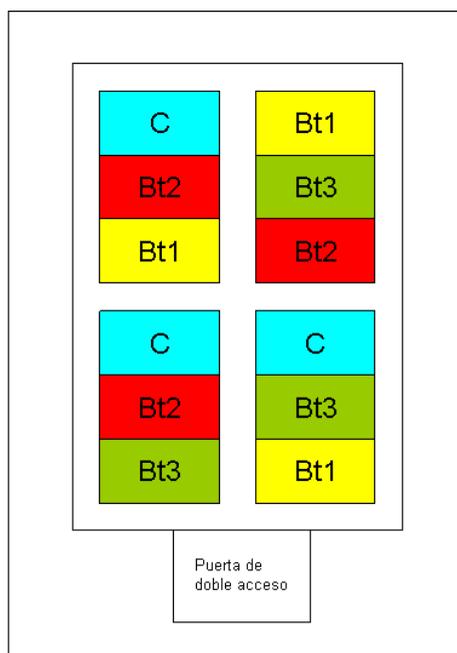


Figura 3.3.3. Diseño experimental de bloques al azar en el invernadero donde se realizó el experimento (C= Control; Bt1= *B. thuringiensis* durante 1 mes; Bt2= *B. thuringiensis* durante 2 meses y Bt3= *B. thuringiensis* todo el ciclo de cultivo).

3.3.6. Muestreos

Se realizó un muestreo durante 18 semanas de 4 plantas escogidas al azar en cada una de las jaulas. Este muestreo comenzó el 17 de junio de 2009. Dicho muestreo consistió por un lado en contar el número de hojas por planta y el número de folíolos y frutos infestados por *T. absoluta* por planta, mientras que por otro lado se evaluó en el tercio apical de la planta el número de *N. tenuis* (tanto adultos como ninfas) y el número de anillos necróticos (en hojas, flores y brotes). Además, se pesó la cosecha de tomates recolectados. Para reducir el riesgo de una contaminación

accidental entre los diferentes tratamientos, se entró primero en las jaulas del control (sin *N. tenuis*) y luego, en las jaulas donde se liberó *N. tenuis*.

3.3.7. Análisis estadístico

El efecto de los tratamientos sobre el daño producido en planta expresado como el número de foliolos infestados, la variación en las poblaciones de *N. tenuis* (tanto de las ninfas como de los adultos) y el número de anillos necróticos fueron analizados usando un modelo lineal mixto con medidas repetidas y con el tiempo como factor aleatorio. Cuando aparecían diferencias significativas, se realizó un post-test de Bonferroni para separar las medias ($P < 0,05$). Al final del experimento, los datos obtenidos sobre el peso acumulado de los frutos, y el porcentaje de frutos atacados fue analizado mediante un análisis de la varianza de un factor, junto a un post-test de Bonferroni para separar las medias ($P < 0,05$). Se realizó una transformación angular de los datos de porcentaje, para asumir normalidad y la homogeneidad de la varianza.

3 4. Daños producidos en planta por *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Hemiptera: Miridae), en presencia de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae).



3.4.1. Instalaciones

Este experimento se llevó a cabo en el mismo invernadero de malla localizado en el IVIA en Moncada (Valencia, España), descrito en el apartado 3.3.1 (Figura 3.3.1).

3.4.2. Condiciones ambientales

Para registrar los datos de temperatura y humedad relativa, se colocó un Datalogger (model TESTO 175-H2, Amidata S.A. Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain) en la jaula central. La temperatura media durante el experimento estuvo entre 29,7° C, el 17 de julio de 2011, y 20,9° C, el 3 de junio de 2011, con un mínimo y un máximo absolutos de 12,3° C y 41,2° C respectivamente, durante la duración del experimento. La humedad relativa media estuvo entre 86,8%, el 30 de Julio de 2011 y 45,6%, el 3 de junio de 2011, con valores máximo y mínimo absolutos de 96,8% y 14,6%, respectivamente.

3.4.3. Manejo del cultivo

En este experimento el manejo del cultivo se llevó a cabo de igual forma que en el experimento de combinación de *N. tenuis* y *B. thuringiensis* (ver apartado 3.3.3). Para este experimento se usaron plántula de tomate tolerante a TYLCV, variedad "Óptima" (Clause Vegetable Seeds, Reino Unido) que venian en bandejas de poliestireno de 70 × 45 cm con un tamaño de celda de 5,4 cm². Las plántulas se trasplantaron en macetas de 8 x 8 x 8 cm donde había como sustrato una mezcla de arena y turba (1:2

p:p), y se dejaron en un invernadero libre de plagas durante 15 días para eliminar cualquier residuo de plaguicidas que pudiesen tener. El 2 de mayo de 2011, fueron individualizadas en macetas de polietileno de una capacidad de 20 l. Las macetas se rellenaron con el medio de cultivo descrito anteriormente y se colocaron en el interior de las jaulas experimentales del invernadero en dos filas de 5 plantas cada una (1,25 plantas/ m²) (**Figura 3.3.2**).

Para este experimento se utilizaron las técnicas usuales de cultivo en invernadero de España. Cada planta se entutoró a una caña (*Arundo donax* L.) (**Figura 3.3.2**), en el cual se ataba el tallo principal con la ayuda de una banda plástica de polietileno, se podaban los brotes secundarios semanalmente, y se aplicaba una solución nutritiva estándar para tomate mediante el sistema de auto-riego con una irrigación frecuente ajustada a las condiciones ambientales y un tiempo de 15 minutos.

3.4.4. *Tuta absoluta* y enemigos naturales

Los individuos de *T. absoluta* utilizados en este experimento provenían de la cría artificial de este fitófago localizada en el IVIA. Esta cría se inició con individuos capturados en campos de tomate localizados en el norte de la provincia de Castellón, que se liberaron en jaulas de cría (120 x 70 x 125 cm). En cada unidad de cría (jaula) se introducían semanalmente 6 plantas de tomate de aproximadamente 30 cm de altura. La cría se mantuvo a 25 ± 1° C, 60 ± 5% HR y bajo fotoperiodo natural.

Los individuos de *N. tenuis* (NESIBUG®) liberados inicialmente, provenían de Koppert Biological Systems, S.L., Águilas, Murcia. Las formulaciones

comerciales basadas en *B. thuringiensis* utilizadas en este experimento fueron Costar[®] (*B. thuringiensis* var. *Kurstaki*, 90,4 MUI l⁻¹, WG) y Xentari[®] (*B. thuringiensis* var. *azawai*, 15 MUI l⁻¹, GD). Estas formulaciones comerciales demostraron una gran eficacia sobre *T. absoluta* en cultivo de tomate tanto en invernadero como al aire libre durante la temporada de cultivo de 2009 (González-Cabrera et al., 2011).

3.4.5. Diseño experimental

Se compararon 4 tratamientos en las 12 jaulas experimentales (10 plantas por jaula), usando un diseño de bloques al azar con los 4 tratamientos repetidos 3 veces (**Figura 3.4.1**). En dos de los tratamientos se realizó suelta de *N. tenuis*, pero la estrategia seguida fue diferente. En uno de ellos, la suelta de 1 *N. tenuis*/ planta se combinó con tratamientos semanales de *B. thuringiensis* (90,4 MUI l⁻¹) (a partir de aquí tratamiento post-trasplante) hasta que se observó un buen establecimiento del depredador en el cultivo (26 de agosto de 2011). En el otro tratamiento, se realizó la liberación de 1 *N. tenuis* cada 2 plantas en semillero una semana antes del trasplante (a partir de aquí tratamiento pre-trasplante). En los dos tratamientos restantes, en uno de ellos se realizaron solamente tratamientos semanales con *B. thuringiensis* (90,4 MUI l⁻¹) (a partir de aquí tratamiento Bt), y en el otro solamente se trató con agua y se usó como tratamiento control. Los tratamientos con *B. thuringiensis* se realizaron con una mochila (SuperAgro 20, Matabi[®], Antzuola, Guipuzcua, España).

En el tratamiento post-trasplante se liberó 1 *N. tenuis*/ planta tres semanas después de que se transplantaran las plantas en el invernadero experimental (23 de mayo de 2011) y se trató semanalmente con *B.*

thuringiensis (90,4 MIU l⁻¹) hasta el 26 de agosto del 2011, fecha en que se alcanzó entorno a 5 adultos y 5 ninfas de *N. tenuis* por planta, lo cual se consideró una buena instalación (Mollá et al., 2011). Esta dosis de suelta de *N. tenuis* es la recomendada en el cultivo de tomate (Calvo et al., 2009, Calvo et al., 2010). En este tratamiento, así como en el tratamiento Bt se alternaron cada 3 tratamientos con intervalo semanal, dos formulaciones comerciales de *B. thuringiensis* con diferente cepa (Costar: var. *kurstaki*, y Xentari: var. *aizawai*), de cara a evitar evitar la aparición de resistencias por parte de *T. absoluta* a *B. thuringiensis* (González-Cabrera et al., 2011). En el tratamiento de semillero, donde se liberó 1 *N. tenuis* cada 2 plantas el 27 de abril de 2011, los depredadores se mantuvieron 7 días en las plantas en semillero, y el 2 mayo de 2011 se transplantaron al campo (Calvo et al., 2012a). En ambos tratamientos donde se liberó *N. tenuis*, se ofrecieron huevos de *E. kuehniella* (aproximadamente 0,1 g/planta) como alimento para *N. tenuis* durante 4 semanas, tiempo suficiente para que *T. absoluta* se estableciera en el cultivo y *N. tenuis* pudiese mantener sus poblaciones alimentándose de ésta.

Para estimular un ataque fuerte y continuo de *T. absoluta* en el cultivo, cada una de las jaulas se infestó semanalmente con 10 parejas de *T. absoluta*, empezando el 10 de junio de 2011. Tres semanas después de la primera liberación, se detectaron los primeros huevos y las primeras larvas de primer estadio de *T. absoluta* (30 de junio de 2011), fue entonces cuando se iniciaron los tratamientos semanales con *B. thuringiensis*.

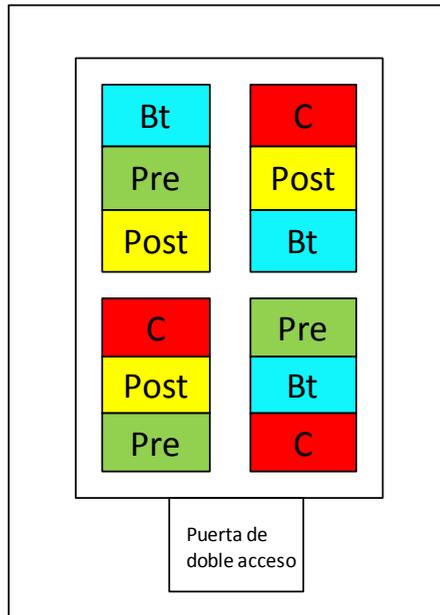


Figura 3.4.1. Diseño experimental de bloques al azar en el invernadero donde se realizó el experimento (C= Control; Bt= *B. thuringiensis*; Post= Suelta de *N. tenuis* en post-trasplante y Pre = Suelta de *N. tenuis* en pretrasplante).

3.4.6. Muestreos

Se realizó un muestreo durante 17 semanas de 4 plantas escogidas al azar en cada una de las jaulas. Este muestreo comenzó el 17 de mayo de 2011. Dicho muestreo consistió por un lado en contar el número de hojas por planta y el número de folíolos y frutos infestados por *T. absoluta* por planta, mientras que por otro lado se evaluó en el tercio apical de la planta el número de *N. tenuis* (tanto adultos como ninfas) y el número de anillos necróticos (en hojas, flores y brotes). Además, se pesó la cosecha de tomates recolectados. Para reducir el riesgo de una contaminación

accidental entre los diferentes tratamientos, se entró primero en las jaulas del control (sin *N. tenuis*) y luego, en las jaulas donde se liberó *N. tenuis*.

3.4.7. Análisis estadístico

El efecto de los tratamientos sobre el número de folíolos infestados por *T. absoluta*, la evolución de las poblaciones de *N. tenuis* (tanto de ninfas como de adultos) y el número de anillos necróticos se analizaron mediante un Modelo Lineal Mixto Generalizado. El tratamiento se consideró como factor fijo y el tiempo como factor aleatorio. Cuando se encontraron diferencias significativas, se realizaron contrastes a pares de los niveles de factor fijo mediante el test de mínimas diferencias significativas (DNS) ($P < 0,05$). Al final del experimento, los datos obtenidos sobre el peso acumulado de los frutos, y el porcentaje de frutos atacados fue analizado mediante un análisis de la varianza de un factor (ANOVA), junto a un post-test de Bonferroni para separar las medias ($P < 0,05$). Se realizó una transformación angular de los datos de porcentaje, para asumir normalidad y la homogeneidad de la varianza.

4. Resultados y desarrollo argumental



4. 1. Estudio comparativo de los parámetros biológicos de dos míridos depredadores sobre huevos de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) y de *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyrelidae) sobre tomate: Implicaciones para el control biológico.



4.1.1. Resultados

4.1.1.1. Tiempo de desarrollo y supervivencia de los estadios juveniles

La supervivencia de las ninfas cuando ambos depredadores se alimentaron con huevos de *T. absoluta* fue de 89% para *N. tenuis* y de 92% para *M. pygmaeus* no encontrándose diferencias significativas entre ambos depredadores (Gehan-Breslow-Wilcoxon $\chi^2 = 0,09707$; $df = 1$; $P = 0,7554$). Por el contrario, cuando ambos depredadores fueron alimentados con huevos de *E. kuehniella*, la supervivencia de las ninfas de *N. tenuis* (89%) fue significativamente mayor que la de las ninfas de *M. pygmaeus* (85%) (Gehan-Breslow-Wilcoxon $\chi^2 = 4,362$; $df = 1$; $P < 0,05$) (**Figura 4.1.1**).

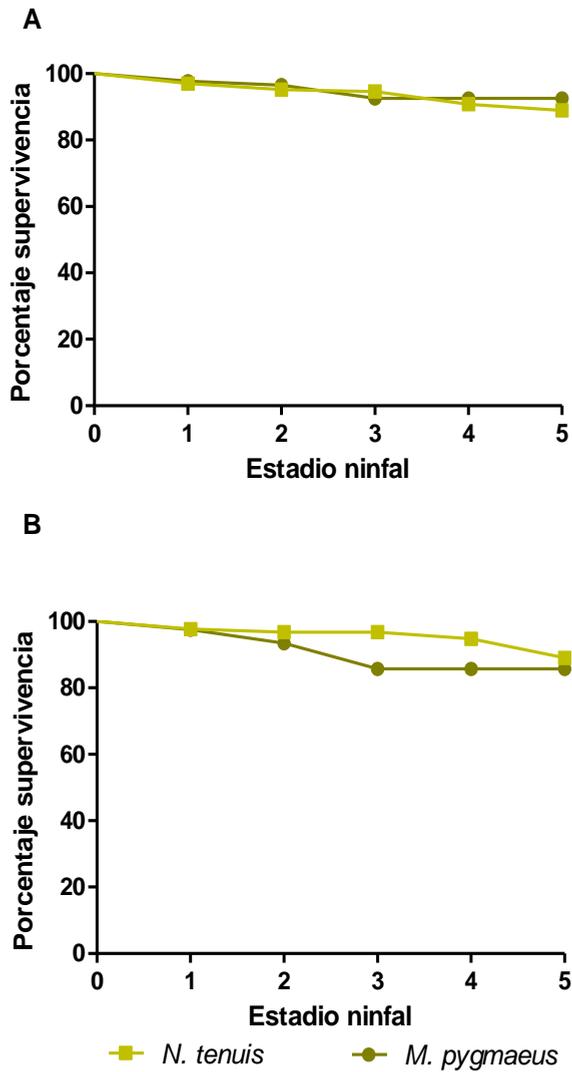


Figura 4.1.1. Supervivencia (% \pm ES) de los diferentes estadios ninfales de *N. tenuis* y *M. pygmaeus* cuando fueron alimentados con huevos de *T. absoluta* (A) o huevos de *E. kuehniella* (B) sobre hoja de tomate a 25° C y un fotoperiodo de 16:8 h L:O.

El tiempo de desarrollo de los estadios inmaduros fue significativamente más corto para *N. tenuis* que para *M. pygmaeus* ($13,1 \pm 0,1$ y $16,0 \pm 0,2$ días, respectivamente) cuando se alimentaron tanto con huevos de *T. absoluta* como con huevos de *E. kuehniella* ($12,8 \pm 0,1$ y $15,4 \pm 0,3$ días, respectivamente). Estas diferencias aparecieron en los estadios N_4 y N_5 , mientras la duración del desarrollo de los estadios más jóvenes no mostró diferencias significativas entre depredadores, independientemente de la presa ofrecida (**Tabla 4.1.1**).

El número total de huevos depredados por todos los estadios ninfales fue significativamente menor para *N. tenuis* que para *M. pygmaeus* cuando se alimentaron de huevos de *T. absoluta* ($138,4 \pm 2,8$ y $175,0 \pm 4,8$, respectivamente). Al comparar el número de huevos depredados entre los diferentes estadios ninfales entre depredadores, las diferencias en el número de huevos de *T. absoluta* consumidos es significativo desde el estadio N_3 hasta el adulto (**Tabla 4.1.2**). Por el contrario, no hubo diferencias significativas en el número de huevos depredados entre *N. tenuis* ($104,9 \pm 2,7$) y *M. pygmaeus* ($114,8 \pm 6,9$) cuando se ofrecieron huevos de *E. kuehniella* (**Tabla 4.1.2**).

Estadio	<i>T. absoluta</i>			<i>E. kuehniella</i>			Estadísticos	
	<i>N. tenuis</i>	<i>M. pygmaeus</i>		<i>N. tenuis</i>	<i>M. pygmaeus</i>		t_{94}	t_{86}
	(n = 63)	(n = 33)	P-valor	(n = 64)	(n = 24)	P-valor		
N₁	2,9 ± 0,1a	3,0 ± 0,1a	0,5453	2,7 ± 0,1a	3,0 ± 0,1a	0,6807	0,6069	0,4979
N₂	2,5 ± 0,1a	2,7 ± 0,1a	0,1306	2,4 ± 0,1a	2,7 ± 0,1a	1,680	1,525	0,0964
N₃	2,0 ± 0,1a	2,5 ± 0,1b	0,0002	2,2 ± 0,1a	2,3 ± 0,1a	0,8664	3,853	0,3886
N₄	2,6 ± 0,1a	3,4 ± 0,1b	< 0,05	2,3 ± 0,1a	3,2 ± 0,1b	6,354	5,549	< 0,05
N₅	3,1 ± 0,1a	4,4 ± 0,1b	< 0,05	3,1 ± 0,1a	4,2 ± 0,1b	5,429	7,161	< 0,05
Total	13,1 ± 0,1a	16,0 ± 0,2b	< 0,05	12,8 ± 0,1a	15,4 ± 0,3b	8,753	12,64	< 0,05

Tabla 4.1.1. Tiempo medio de desarrollo de los diferentes estadios ninfales de *N. tenuis* y *M. pygmaeus* en función de si fueron alimentados con *T. absoluta* o *E. kuehniella* (± ES) sobre hoja de tomate a 25° C y un fotoperíodo de 16:8 h L:O.

Estado	<i>T. absoluta</i>		Estadísticos		<i>E. kuehniella</i>			Estadísticos	
	<i>N. tenuis</i> (n = 63)	<i>M. pygmaeus</i> (n = 33)	<i>t</i> ₉₄	P-valor	<i>N. tenuis</i> (n = 64)	<i>M. pygmaeus</i> (n = 24)	<i>t</i> ₈₆	P-valor	
N₁	10,0 ± 0,6a	9,6 ± 0,9a	0,3982	0,6914	7,0 ± 0,5a	7,9 ± 1,2a	0,7829	0,4358	
N₂	17,3 ± 0,9a	19,6 ± 1,6a	1,374	0,1727	11,5 ± 0,8a	11,7 ± 1,2a	0,1450	0,8851	
N₃	20,1 ± 0,8a	24,3 ± 2,3b	2,069	< 0,05	15,4 ± 0,8a	16,1 ± 2,0a	0,3836	0,7022	
N₄	35,7 ± 1,3a	50,1 ± 2,4b	5,793	< 0,05	27,1 ± 1,2a	34,2 ± 2,8b	2,752	< 0,05	
N₅	55,7 ± 2,2a	71,3 ± 4,4b	3,533	< 0,05	43,8 ± 2,31a	44,8 ± 4,9a	0,2205	0,8206	
Total	138,4 ± 2,9a	175,0 ± 4,8 b	7,055	< 0,05	104,9 ± 2,75a	114,8 ± 6,9a	1,613	0,1103	

Tabla 4.1.2. Número de huevos consumidos de *T. absoluta* o *E. kuehniella* (± ES) por los diferentes estadios ninfales de *N. tenuis* y *M. pygmaeus* sobre hoja de tomate a 25° C y un fotoperiodo de 16:8 h L:O.

4.1.1.2. Parámetros reproductivos

Las curvas de fertilidad de edad específica, representadas como el número de ninfas producidas por día durante la vida de las hembras de *N. tenuis* y *M. pygmaeus* alimentadas con huevos de *T. absoluta* o *E. kuehniella* se muestran en la **figura 4.1.2**. *Nesidiocoris tenuis* tuvo mayor fertilidad que *M. pygmaeus*, tanto diariamente como a lo largo de su vida, independientemente de la presa ofrecida. La longevidad de las hembras fue menor para *N. tenuis* que para *M. pygmaeus* especialmente cuando se ofrecieron huevos de *T. absoluta*, mientras la proporción de sexos de la progenie (proporción de hembras en la descendencia) fue similar entre las dos especies independientemente de la presa ofrecida (**Tabla 4.1.3**).

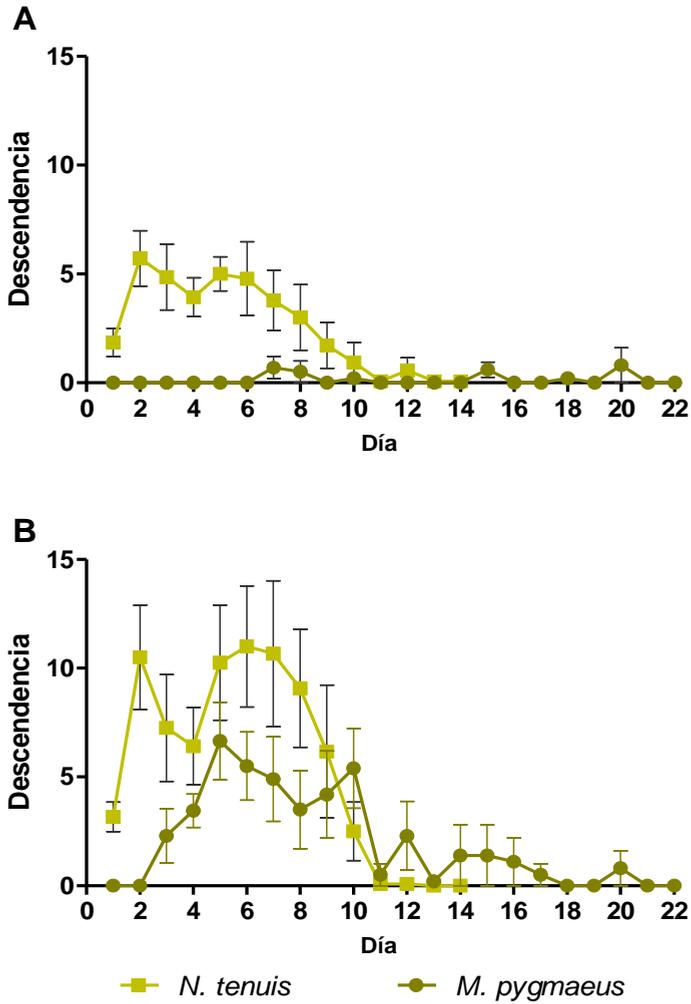


Figura 4.1.2. Descendencia cada dos días (nº de N1 por hembra) de *N. tenuis* y *M. pygmaeus* cuando depredaron sobre huevos de *T. absoluta* (A) o de *E. kuehniella* (B) sobre tomate a 25° C y un fotoperiodo de 16:8 h L:O.

Parámetro	Huevos de <i>T. absoluta</i>		Estadísticos		Huevos de <i>E. kuehniella</i>		Estadísticos	
	<i>N. tenuis</i>	<i>M. pygmaeus</i>	t_{21}	P-valor	<i>N. tenuis</i>	<i>M. pygmaeus</i>	t_{62}	P-valor
Fertilidad	38,9 ± 6,9a	3,0 ± 1,7b	4,457	0,0002	83,7 ± 15,0a	48,1 ± 10,7b	6,640	<0,0001
Fertilidad diaria	2,0 ± 0,2a	0,1 ± 0,0b	5,935	< 0,001	4,3 ± 0,6a	3,1 ± 0,7a	1,269	0,2208
Proporción de sexos	48,5 ± 1,3a	44,5 ± 18,3a	0,338	0,7470	48,6 ± 0,4a	49,2 ± 0,6a	0,758	0,4768
Longevidad de las hembras	18,3 ± 1,6b	29,5 ± 2,5a	3,566	0,0018	18,2 ± 1,6a	22,0 ± 2,5a	1,347	0,1946

Tabla 4.1.3. Media de la fertilidad (descendencia), fertilidad diaria (descendencia/ día), proporción de sexos (número de hembras en la descendencia/ total), y longevidad (días) de *N. tenuis* y *M. pygmaeus* cuando se alimentaron exclusivamente con huevos de *T. absoluta* o huevos de *E. kuehniella* sobre hoja de tomate a 25° C y un fotoperiodo de 16:8 h L:O.

4.1.1.3. Índices demográficos

El tiempo generacional (T) fue significativamente mayor para *M. pygmaeus* que para *N. tenuis* independientemente de la presa ofrecida, reflejando una reproducción más acelerada para *N. tenuis* como se ha mencionado anteriormente (**Tabla 4.1.4**). El tiempo para doblar una generación (DT) fue significativamente más corto y la tasa neta de reproducción estimada (R_0) fue significativamente más elevada para *N. tenuis* que para *M. pygmaeus* independientemente de la presa ofrecida. La tasa intrínseca de crecimiento (r_m) también fue significativamente mayor para *N. tenuis* que para *M. pygmaeus* independientemente de la presa ofrecida (**Tabla 4.1.4**).

Resultados y desarrollo argumental

Parámetro	T. absoluta			E. kuehniella			Estadísticos	
	N. tenuis	M. pygmaeus	t ₂₁	P-valor	N. tenuis	M. pygmaeus	t ₆₂	P-valor
r _m	0,127 ± 0,000a	0,005 ± 0,000b	89,53	< 0,001	0,160 ± 0,000a	0,103 ± 0,001b	34,67	< 0,001
R ₀	15,28 ± 0,42a	1,21 ± 0,07b	27,59	< 0,001	32,97 ± 0,59a	20,04 ± 0,55b	15,41	< 0,001
T	21,81 ± 0,09b	42,88 ± 1,74a	14,36	< 0,001	23,00 ± 0,07b	28,63 ± 0,27a	21,98	< 0,001
DT	5,57 ± 0,05b	96,21 ± 12,53a	9,146	< 0,001	4,56 ± 0,02b	6,08 ± 0,06a	23,90	< 0,001

Tabla 4.1.4. Tasa intrínseca de desarrollo r_m (huevos hembra/hembra/día), tiempo de generación (T), tasa neta de reproducción, R₀ (Huevos hembra/ hembra) y tiempo para doblar la población (DT) (días) de N. tenuis y M. pygmaeus cuando depredaron sobre huevos de T. absoluta o E. kuehniella sobre tomate a 25° C y un fotoperíodo de 16:8 h L:O (x ± SE).

4.1.2. Discusión

En este estudio, se muestra un análisis detallado de varias características biológicas de *N. tenuis* y *M. pygmaeus* depredando sobre huevos de *T. absoluta* (plaga invasora), y sobre huevos de *E. kuehniella* (presa idónea para estos depredadores) sobre tomate. Nuestros resultados mostraron que los parámetros biológicos de ambas especies variaron, especialmente en función de la especie de presa disponible. El tiempo de desarrollo juvenil fue alrededor de 3 días más corto para *N. tenuis* que para *M. pygmaeus*, independientemente de la presa ofrecida. Estos valores de desarrollo coinciden con los obtenidos por otros autores, en estudios similares sobre otros fitófagos plaga en planta de tomate (Castañe y Zapata, 2005; Sánchez et al., 2009; Urbaneja et al., 2005; Vandekerkhove y De Clercq, 2010). La supervivencia de los estadios inmaduros de ambos depredadores fue superior al 80% independientemente de la presa ofrecida. Castañe y Zapata, (2005) y Vandekerkhove y De Clercq, (2010) obtuvieron supervivencias similares usando otras dietas como polen o una dieta artificial a base de carne.

Los estadios jóvenes de ambos depredadores depredaron un mayor número de huevos de *T. absoluta* que de huevos de *E. kuehniella*. Estas diferencias podrían estar atribuidas al menor tamaño de los huevos de *T. absoluta* en comparación a los de *E. kuehniella*. Las ninfas de *M. pygmaeus* consumieron aproximadamente 40 huevos de *T. absoluta* más que *N. tenuis*. Esto podría deberse a que *M. pygmaeus* presentó un tiempo de desarrollo más largo que *N. tenuis*, y a una menor idoneidad de los huevos de *T. absoluta* para el desarrollo de este.

En cuanto a la capacidad reproductiva, fue mucho mayor para *N. tenuis* que para *M. pygmaeus*, tanto en términos de valores diarios como de fertilidad acumulada a lo largo de la vida de la hembra. Sorprendentemente, *M. pygmaeus* produjo muy poca progenie cuando depredó huevos de *T. absoluta* en tomate, sugiriendo que esta presa no es una presa idónea para este depredador. Una nutrición adecuada es esencial para los organismos con la finalidad de alcanzar su máximo potencial reproductivo, y esos efectos necesitan ser integrados para determinar el impacto sobre las dinámicas de la población (Tompson, 1999). Consecuentemente, los índices de crecimiento poblacional estimados de *M. pygmaeus* en tomate fueron altamente dependientes de la presa ofrecida. Los valores de r_m estimados en este estudio para este depredador fueron 0,103 y 0,005 sobre huevos de *E. kuehniella* y *T. absoluta*, respectivamente. Mientras, la R_0 fue 20,04 cuando depredó sobre *E. kuehniella* y 1,21 cuando depredó sobre los huevos de la nueva presa. Perdakis y Lykouressis, (2002) estimaron para este depredador una r_m de 0.097 cuando se le ofrecieron como presa varios estados de *T. vaporariorum*. Estos resultados son particularmente importantes para remarcar el rol de la presa en la nutrición del depredador y para evaluar sus efectos en términos demográficos. Un valor de la tasa neta de reproducción R_0 (el número de veces que una población se multiplica por generación) inferior a 1 y una $r_m \leq 0$, como los obtenidos para *M. pygmaeus* alimentándose sobre la nueva presa (*T. absoluta*), indican que los niveles de población de este depredador pueden decrecer hasta la extinción (Stark y Banks, 2003).

Por el contrario, ambos depredadores mostraron un control eficiente del daño producido por *T. absoluta* bajo condiciones de invernadero (Urbaneja

et al., 2008). En este experimento la presencia simultanea de la presa alternativa, *B. tabaci*, podría haber mejorado el estado reproductor de los depredadores y por lo tanto su control sobre ambas plagas. Los resultados obtenidos por Bompard et al., (2013) apoyarían esta hipótesis, ya que la adición de *T. absoluta* en el sistema tomate/*B. tabaci*/*M. pygmaeus* incrementó las densidades del depredador y disminuyó las poblaciones de mosca blanca. Esta tendencia en la que la presencia de dos plagas pueden mejorar el control por parte del depredador fue también observada en el ácaro depredador *Amblyseius swirskii* (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae) por Messelink et al., (2008). Este depredador mostró un mejor control de *F. occidentalis* cuando este coexistía con *T. vaporariorum*. Todas estas evidencias confirman que las presas distintas en el cultivo favorecen a los depredadores generalistas (Symondson et al., 2002). El hecho de que la mezcla de dos presas pueda incrementar los niveles de población de un depredador generalista ofrece nuevas oportunidades para mejorar el control biológico de plagas optimizando la dieta de los depredadores.

El uso de estrategias de control biológico sobre artrópodos plaga en cultivos de Solanáceas ha resultado ser efectivo y seguro. Este enfoque proporciona un control de plagas a largo término que tiene varios beneficios comparado con el control químico, como la ausencia de residuos de los pesticidas sobre los productos comestibles o de desarrollo de resistencias por parte de la plaga, así como bajos efectos sobre el resto de organismos presentes en el cultivo (van Lenteren y Woets, 1988; Hawkins et al., 1997). Hoy en día, el reto más importante para el control biológico es la continua introducción de nuevas plagas exóticas en nuevas zonas. En este contexto, los enemigos naturales generalistas autóctonos, pueden jugar un papel clave a la hora de

desarrollar nuevas estrategias de control sobre las nuevas plagas que puedan aparecer (Ehler, 1998; Messelink et al., 2012). La finalidad de este estudio, fue estudiar la idoneidad a largo término de la plaga invasora del tomate, *T. absoluta*, como presa para dos míridos depredadores ampliamente distribuidos por el área Mediterránea.

Nuestros resultados de desarrollo de los estadios inmaduros de los míridos y sobre el elevado número de huevos depredados confirman estudios previos sobre el papel que ambos depredadores tienen como agentes de control biológico de *T. absoluta*. Aunque los estadios inmaduros de *M. pygmaeus* depredaron significativamente más huevos que los de *N. tenuis*, su papel en el control de *T. absoluta* en tomate podría ser considerado irrelevante en ausencia de otras fuentes de alimento. Nuestros resultados muestran que las hembras de *M. pygmaeus* no son capaces de reproducirse cuando se alimentan exclusivamente de huevos de *T. absoluta* y tomate; por lo tanto, es improbable que los estadios jóvenes de esta especie estén presentes en el cultivo bajo estas condiciones. Por lo tanto, para asegurar un establecimiento exitoso de *M. pygmaeus* en el cultivo de tomate y por lo tanto, un control a largo término de *T. absoluta*, se debería tener en cuenta la presencia de otras fuentes de alimento en el cultivo como moscas blancas, en las estrategias de liberación de este mírido. Por el contrario, el control biológico de *T. absoluta* con *M. pygmaeus* en ciertos agro-ecosistemas, como el tomate en invernadero, necesitaría programas de liberación inundativas que, en muchos casos, resultarían poco atractivas para su uso debido al elevado coste (van Lenteren, 2012).

Alternativamente, para mejorar el establecimiento de *M. pygmaeus* en el cultivo, se debe considerar la adición de fuentes de alimento como huevos de *E. kuehniella* o polen (Vandekerkhove y De Clercq, 2010). Estudios previos, han sugerido, la aplicación de fuentes de alimento adicional como una herramienta muy importante para mejorar la supervivencia y la fecundidad de los depredadores generalistas tanto en condiciones de laboratorio como en condiciones de campo para que estos puedan aumentar sus poblaciones (Thompson, 1999; Lundgren y Wiedenmann, 2004; Pina et al., 2012; Urbaneja-Bernat et al., 2013).

Por otro lado, nuestros resultados muestran que *N. tenuis* se ha adaptado exitosamente a utilizar esta nueva plaga como presa. Su habilidad para desarrollarse hasta el estado adulto, para reproducirse y para aumentar rápidamente sus poblaciones en el sistema de *T. absoluta*/tomate son factores esenciales a tener en cuenta para llevar a cabo un control adecuado de ésta, basándose en estrategias de liberación artificial y conservación de *N. tenuis* para mejorar la presencia natural de este depredador en los cultivos de tomate.

4. 2. Detección y preferencia de presa entre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) y *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) por el depredador *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Hemiptera: Miridae).



4.2.1. Resultados

4.2.1.1. Ensayo con el olfactómetro vertical en forma de “Y”

Aproximadamente el 92% de las hembras fueron atraídas por alguno de los olores (148 hembras de 160 hembras probadas).

Las hembras de *N. tenuis* expuestas a plantas infestadas (huevos o larvas de *T. absoluta* y huevos o ninfas de *B. tabaci*) frente a plantas no infestadas (**Figura 4.2.1A**) mostraron preferencia por el olor de las plantas infestadas independientemente de con qué presa fueron infestadas. En orden decreciente, el porcentaje de hembras de *N. tenuis* atraídas fue de un 90% por las plantas infestadas con larvas de *T. absoluta* ($\chi^2 = 4,96$; $df = 1$; $P < 0,05$), un 79% por las plantas infestadas con ninfas de *B. tabaci* ($\chi^2 = 3,56$; $df = 1$; $P < 0,05$), un 75% por las plantas infestadas con huevos de *B. tabaci* ($\chi^2 = 3,00$; $df = 1$; $P < 0,05$) y un 69% por las plantas infestadas por huevos de *T. absoluta* ($\chi^2 = 2,19$; $df = 1$; $P < 0,05$), frente a las correspondientes plantas no infestadas.

Cuando las hembras de *N. tenuis* fueron expuestas a plantas infestadas con huevos de *T. absoluta*, frente a plantas infestadas con huevos de *B. tabaci*, no hubo diferencias significativas en la atracción por cualquiera de los dos olores ($\chi^2 = 1,89$; $df = 1$; $P = 0,08$) (**Figura 4.2.1B**). Finalmente, cuando las hembras de *N. tenuis* fueron expuestas a plantas infestadas con larvas de *T. absoluta* frente a ninfas de *B. tabaci*, mostraron una atracción mayor por las plantas infestadas con larvas de *T. absoluta*, que por las plantas infestadas con ninfas de *B. tabaci* ($\chi^2 = 2,24$; $df = 1$; $P < 0,05$) (**Figura 4.2.1B**).

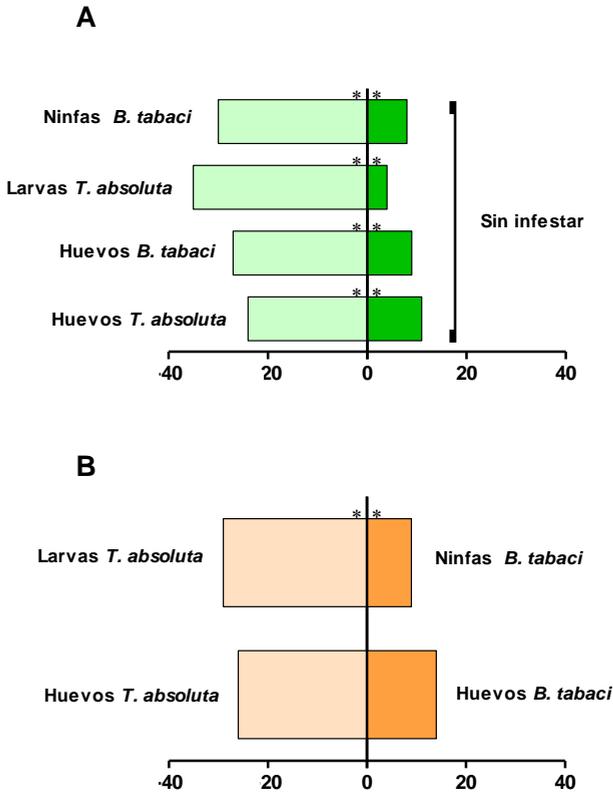


Figura 4.2.1. Respuesta de la hembras de *N. tenuis* en el olfactómetro vertical en forma de “Y” cuando fueron expuestas a plantas sin infestar frente a plantas infestadas (A) o dos plantas infestadas (B). Las diferencias estadísticas están marcadas con (**) ($P < 0,05$).

4.2.1.2. Preferencia de presa y consumo

4.2.1.2.1. Preferencia entre dos presas ofrecidas en exceso

Tanto las hembras como las ninfas de 4º estadio de *N. tenuis* depredaron el mismo número de huevos de *T. absoluta* independientemente de si éstos se ofrecieron como única presa, o se ofrecieron junto con adultos de *B. tabaci* (Hembras: $t = 0,06$; $df = 1, 28$; $P = 0,8124$; ninfas: $t = 1,20$; $df = 1, 29$; $P = 0,2835$). Las hembras de *N. tenuis* depredaron un mayor número de adultos de *B. tabaci* cuando se ofrecieron como única presa que cuando se ofrecieron junto con huevos de *T. absoluta* ($t = 24,17$; $df = 1, 27$; $P < 0,05$). En cambio las ninfas de 4º estadio de *N. tenuis* no mostraron diferencias significativas en el número de adultos de *B. tabaci* depredados en función de si se ofrecieron como única presa o junto a huevos de *T. absoluta* ($t = 2,31$; $df = 1, 29$; $P = 0,1401$) (**Figura 4.2.2A**).

Tanto las hembras de *N. tenuis* como las ninfas de 4º estadio depredaron un menor número de huevos de *T. absoluta* cuando éstos se ofrecieron junto a ninfas de *B. tabaci* que cuando fueron la única presa (Hembras: $t = 9,58$; $df = 1, 29$; $P < 0,05$; ninfas: $t = 48,54$; $df = 1, 27$; $P < 0,05$). Las hembras de *N. tenuis* depredaron un menor número de ninfas de *B. tabaci* cuando se ofrecieron junto con huevos de *T. absoluta* que cuando se ofrecieron como única presa ($t = 68,48$; $df = 1, 25$; $P < 0,05$). Por el contrario, las ninfas de 4º estadio de *N. tenuis* no mostraron diferencias significativas en el número de ninfas depredadas independientemente de que se les ofrecieran junto con huevos de *T. absoluta* o como única presa ($t = 2,37$; $df = 1, 27$; $P = 0,136$) (**Figura 4.2.2B**).

Cuando los resultados anteriores se evaluaron mediante el uso del índice de preferencia de β -Manly, se observó que las hembras de *N. tenuis* prefirieron los huevos de *T. absoluta* frente a los adultos o las ninfas de *B. tabaci*, mientras que las ninfas prefirieron los huevos de *T. absoluta* frente a los adultos de *B. tabaci*, pero no frente a las ninfas de *B. tabaci*. (**Tabla 4.2.1**).

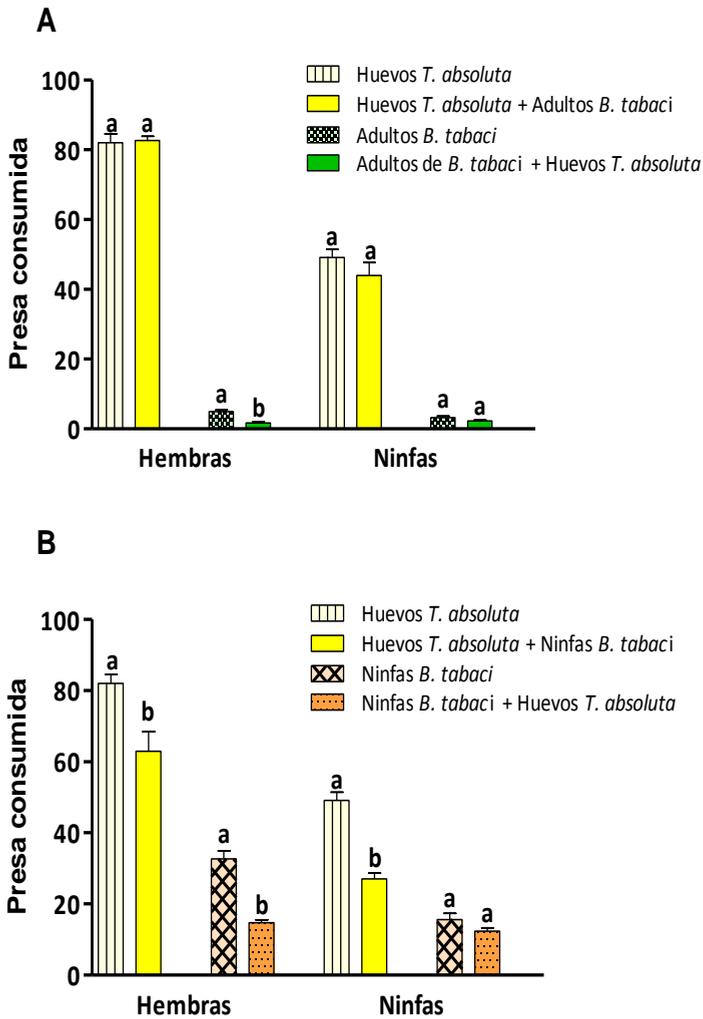


Figura 4.2.2. Presa consumida (Media \pm ES) por hembras y ninfas de *N. tenuis*, cuando ésta se ofreció sola o en dieta mixta: huevos de *T. absoluta* y adultos de *B. tabaci* (A) huevos de *T. absoluta* y ninfas de *B. tabaci*. Las diferentes letras entre pares de columnas muestran diferencias significativas ($P < 0,05$).

	Hembras	t	P-valor	Ninfas	t	P-valor
Adultos de <i>B. tabaci</i>	0,95 ± 0,01	41,19	< 0,05	0,73 ± 0,03	6,95	< 0,05
Ninfas de <i>B. tabaci</i>	0,88 ± 0,01	20,08	< 0,05	0,57 ± 0,04	1,84	0,0895

Tabla 4.2.1. Valores del índice de β -Manly de huevos de *T. absoluta* para hembras y ninfas de *N. tenuis* (media \pm SE), cuando se ofrecieron conjuntamente con adultos o ninfas de *B. tabaci*. Al presentarse dos presas conjuntamente, el índice de β -Manly muestra preferencia cuando su valor es superior a 0,5.

4.2.1.2.2. Preferencia entre presas ofrecidas en número limitado

Al final del experimento, las ninfas de 4^º estadio de *N. tenuis* depredaron un mayor número de huevos de *T. absoluta*, seguidos por las ninfas de *B. tabaci*, los adultos de *B. tabaci* y los huevos de *B. tabaci*. Se encontraron diferencias significativas entre todas las presas ofrecidas ($F = 34,818$; $df = 3, 79$; $P < 0,05$). Las hembras de *N. tenuis* depredaron un menor número de adultos de *B. tabaci* que del resto de presas ofrecidas para las cuales no se obtuvieron diferencias significativas entre ellas ($F = 22,532$; $df = 3, 79$; $P < 0,05$) (**Figura 4.2.3**).

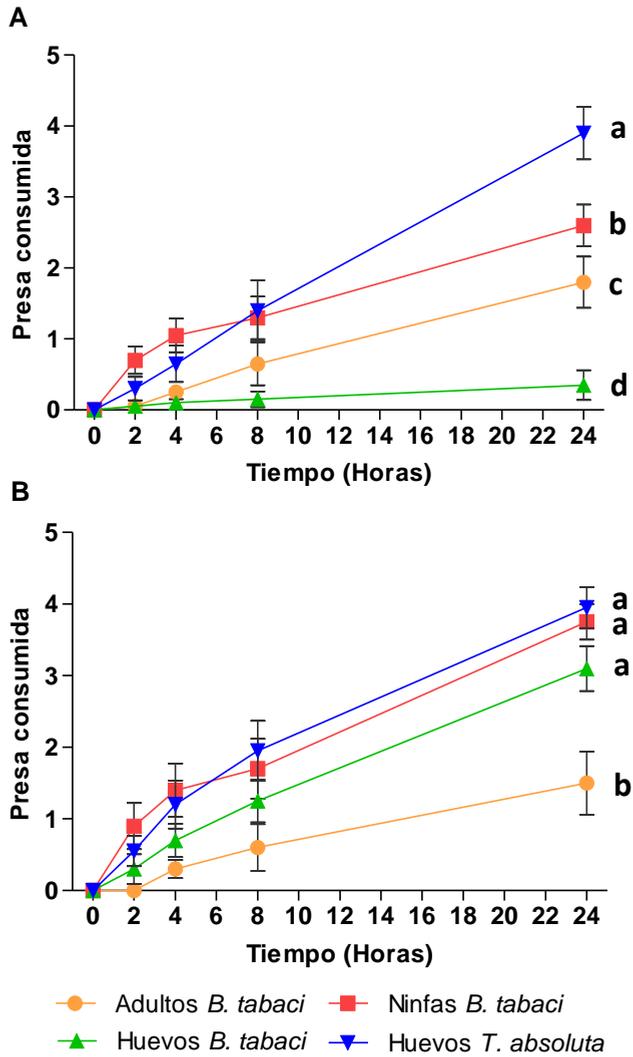


Figura 4.2.3. Número acumulado de presa depredada por las ninfas de 4^o estadio de *N. tenuis* (A) y por las hembras (B) en el ensayo de cafetería. Las diferentes letras al final de cada curva, muestran diferencias significativas en el número total de presa consumida al final del experimento ($P < 0,05$).

Al analizar los resultados anteriores mediante el uso del índice de preferencia de presa de Rodgers para ensayos de cafetería, se observó que tanto las hembras como las ninfas de 4º estadio de *N. tenuis* mostraron diferencias significativas en la preferencia entre las presas ofrecidas (Hembras: $F = 28,05$; $df = 3, 79$; $P < 0,001$, Ninfas: $F = 35,17$; $df = 3, 79$; $P < 0,001$, respectivamente). Los huevos de *T. absoluta* y las ninfas de *B. tabaci* fueron las presas preferidas por ambos estados del depredador. Sin embargo, las hembras de *N. tenuis* mostraron una preferencia mayor por los huevos de *B. tabaci* que por los adultos, mientras las ninfas mostraron preferencia por los adultos de *B. tabaci* frente a los huevos de ésta (Tabla 4.3).

Presa	<i>N. tenuis</i>	
	Hembras	Ninfas
Adultos de <i>B. tabaci</i>	0,23 ± 0,06 c	0,35 ± 0,06 b
Ninfas de <i>B. tabaci</i>	0,84 ± 0,05 a	0,69 ± 0,07 a
Huevos de <i>B. tabaci</i>	0,61 ± 0,07 b	0,07 ± 0,04 c
Huevos de <i>T. absoluta</i>	0,84 ± 0,05 a	0,86 ± 0,06 a

Tabla 4.2.2. Valores del índice de Rodgers (media ± SE) para las hembras y las ninfas de cuarto estadio de *N. tenuis*, cuando se presentaron simultáneamente frente a 4 presas a 25° C. Las diferentes letras dentro de la misma columna muestran diferencias significativas entre las presas para cada estado del depredador ($P < 0,05$).

4.2.2. Discusión

En este estudio, se muestra un análisis detallado sobre la capacidad de las hembras de *N. tenuis* en detectar plantas infestadas con *T. absoluta*, la plaga invasora más reciente del cultivo de tomate, y *B. tabaci*, fitófago que hasta la aparición de *T. absoluta* había sido considerada la plaga clave en tomate. Por otro lado, se estudió la preferencia de las hembras y ninfas de 4º estadio de *N. tenuis* entre ambas presas.

Nuestros resultados mostraron que las hembras de *N. tenuis* son capaces de detectar las plantas infestadas tanto por huevos como por los estadios inmaduros de ambas plagas. Las hembras escogieron siempre las plantas infestadas con alguno de los estados de la plaga elegidos, frente a plantas sin infestar. La capacidad de detectar plantas infestadas por un fitófago ha sido observada en hembras de otras especies de míridos. Las hembras de *Dicyphus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae) mostraron una mayor atracción por hojas de pimiento infestadas con ninfas de la mosca blanca de los invernaderos, *T. vaporariorum* o por el pulgón *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) que por hojas sin infestar (McGregor y Gillespie, 2004). De igual modo, las hembras de *M. caliginosus* también mostraron preferencia por plantas de pimiento infestadas con el pulgón *M. persicae* o la araña roja *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) frente a plantas sin infestar (Moayeri et al., 2006). Este comportamiento de los depredadores se atribuye a la capacidad que tienen estos de utilizar como señal los volátiles que liberan las plantas en respuesta al ataque de un fitófago (Tumlinson et al., 1993; Dicke y vet, 1999) y se ha observado previamente tanto en depredadores como en parasitoides (Ciarla et al., 2005; Moayeri et al., 2006; Chiu-Alvarado et al., 2009; Belda y Riudavets,

2010). Cuando se evaluó la preferencia de las hembras de *N. tenuis* entre plantas infestadas con larvas de *T. absoluta* frente a plantas infestadas por ninfas de *B. tabaci*, se observó una clara preferencia por las plantas infestadas por larvas de *T. absoluta*. La composición de volátiles liberados por la planta puede variar en función del fitófago que ataca la planta (Dicke, 1999). Este hecho provoca que el depredador pueda mostrar preferencia por las plantas en función del fitófago que esta atacándola. En este caso, se compararon dos fitófagos plaga con diferentes hábitos alimenticios, pues *T. absoluta* mastica la hoja alimentándose del mesófilo foliar, produciendo un mayor daño a la planta que *B. tabaci*, la cual inyecta el estilete para alimentarse del floema produciendo un menor daño mecánico sobre la planta. Rodríguez-Saona et al., (2002, 2003) estudiaron los volátiles liberados por las plantas cuando eran atacadas por las larvas de *S. exigua* o por las ninfas de *B. tabaci*. Estos autores concluyeron que el ataque de un fitófago “masticador”, como es el caso de las larvas de un lepidóptero, aumenta la cantidad de volátiles liberados por la planta, mientras el ataque de un fitófago succionador que se alimenta del floema de la planta, como es el caso de las ninfas de *B. tabaci* no aumenta la cantidad de volátiles que libera la planta. Esta teoría explicaría por qué las hembras de *N. tenuis* mostraron preferencia por las plantas infestadas con *T. absoluta*.

Por el contrario, el depredador fue incapaz de discriminar entre las plantas infestadas con los huevos de cada una de las especies de fitófago. Esto podría deberse a que la puesta por parte del fitófago produce una respuesta diferente a la que se produce cuando el fitófago se alimenta sobre la planta (Hilker y Meiners, 2002). En esta respuesta a la puesta, la planta no emitiría volátiles y no habría atracción por parte de

depredadores, pero si que podría haberla por parte de parasitoides de huevos. Por esta razón, el depredador no sintió atracción por los huevos de ninguna de las dos especies y la elección de las plantas fue al azar.

Esto podría parecer contradictorio con lo observado en los ensayos de detección de presa, donde se observó que las hembras de *N. tenuis* se mostraron más atraídas por las plantas infestadas con huevos de cualquiera de las dos especies frente a plantas sin infestar. Este comportamiento se podría explicar por la presencia de kairomonas en las plantas infestadas, dado que previamente hubo presencia de adultos. Hislop y Prokopy, (1981) y Sengonca y Liu, (1994) observaron que los depredadores pueden usar las kairomonas emitidas por los fitófagos o sus residuos también a modo de señal.

En cuanto al estudio de consumo y preferencia de presa, nuestros resultados mostraron que tanto las ninfas de 4º estadio como las hembras de *N. tenuis* fueron capaces de alimentarse de huevos de *T. absoluta* en presencia de huevos, ninfas y adultos de *B. tabaci*. La capacidad de *N. tenuis* depredando sobre estas plagas ya había sido observada previamente por varios autores (Urbaneja et al., 2009; Arnó et al., 2009a; Calvo et al., 2009). Cuando se ofrecieron huevos de *T. absoluta* conjuntamente con adultos de *B. tabaci* en exceso, ambos estados del depredador mostraron preferencia por los huevos de *T. absoluta*. Esta preferencia por los huevos de *T. absoluta* frente a los adultos de *B. tabaci*, se observó también cuando las presa se ofreció en número limitado. Estos resultados, podrían explicarse por el comportamiento depredador de *N. tenuis*. Este depredador es un cazador activo con gran capacidad de búsqueda y por ello

prefiere depredar sobre presas inmóviles, al igual que ocurre con otras especies de depredadores (Breene et al., 1992; Breene et al., 1994; Nordlund y Legaspi, 1996). Esta preferencia por las presas inmóviles se debería a la capacidad de escape que presentan las presas móviles, como es el caso de los adultos de *B. tabaci*. Bardanas et al., (1998), ya observó en un ensayo de consumo de no elección, como *M. caliginosus* y *D. tamaninii* consumían muy pocos adultos de *B. tabaci*, lo que atribuyó a la capacidad de escape que presentan éstos frente a los depredadores. Este mismo comportamiento fue observado por Cohen y Byrne, (1992) con el depredador *Geocoris punctines* (Say) (Hemiptera: Geocoridae) cuando se le ofrecieron adultos de *B. tabaci*.

Al comparar la preferencia de presa entre huevos de *T. absoluta* y ninfas de *B. tabaci*, se observó que las ninfas de 4º estadio de *N. tenuis* no mostraron preferencia por ninguna de las dos presas independientemente de si estas presas se ofrecieron en exceso o en número limitado. En cambio, las hembras de *N. tenuis* prefirieron los huevos de *T. absoluta* a las ninfas de *B. tabaci* cuando ambas presas se presentaron en exceso, pero no cuando ambas presas se ofrecieron en número limitado. En este caso, tanto los huevos de *T. absoluta* como las ninfas de *B. tabaci*, son presas inmóviles, por lo que la preferencia que mostraron las hembras por los huevos de *T. absoluta* cuando ambas presas se ofrecieron en exceso no vendría dada por el comportamiento depredador de *N. tenuis*. La diferencia en la preferencia entre estas dos presas mostrada por ambos estados del depredador, podría deberse a que cada uno de los estados del depredador presenta requerimientos nutricionales diferentes en función de sus necesidades. Los requerimientos nutricionales de las hembras de *N. tenuis* estarían

enfocados a aumentar su fecundidad, mientras que los requerimientos nutricionales de las ninfas de *N. tenuis* estarían más enfocados a completar su ciclo biológico. Dentro de los nutrientes no abundantes, la metionina juega un papel importante en la fecundidad y la supervivencia de los adultos (Grandinson et al., 2009). En el caso particular de hembras de *Drosophila* spp. alimentadas con una dieta rica en metionina aumentaron su fecundidad frente a las que se alimentaron con una dieta baja en metionina (Flatt, 2009; Grandinson et al., 2009). Cohen y Brummett, (1997) demostraron que los huevos de lepidóptero contienen un mayor contenido en metionina que las ninfas de mosca blanca, lo que explicaría la preferencia de presa presentada por las hembras de *N. tenuis* sobre los huevos de *T. absoluta* cuando ambas presas se presentaron en exceso.

Ambos estadios del depredador también mostraron preferencia de presa por los huevos de *T. absoluta* frente a los huevos de *B. tabaci*. Este mismo comportamiento fue observado en otros depredadores, que mostraron baja preferencia por los huevos de *B. tabaci*, como es el caso de *M. caliginosus* (Bonato et al., 2006) y de otros depredadores del orden hemiptera *Orius laevigatus* y *O. majusculus* (Arnó et al. 2008). Esta preferencia por los huevos de *T. absoluta* frente a los de *B. tabaci* podrían deberse a que los huevos de *B. tabaci* son una presa de baja calidad para estos depredadores. Fauvel et al., (1987) observaron un desarrollo de *M. caliginosus* más rápido cuando ofrecieron como presa ninfas de mosca blanca que cuando se ofrecieron huevos de mosca blanca.

La capacidad de las hembras de *N. tenuis* en detectar plantas infestadas con estos fitófagos plaga facilitaría la localización de focos iniciales de ambas plagas en el cultivo. Además, su capacidad de depredar sobre ambas plagas

aunque éstas coexistan en una misma planta, contribuiría en gran medida a su instalación. Estas dos características podrían dar explicación parcial al gran éxito que este depredador ha conseguido en el control biológico de estos dos fitófagos en programas de gestión integrada de plagas en tomate en los últimos años (Urbaneja et al., 2012). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los resultados presentados en este trabajo, se obtuvieron a partir de ensayos de laboratorio. En el medio natural, la existencia de una mayor variedad de presas, y los factores tanto bióticos, como abióticos podrían hacer que el depredador se comportara de forma diferente, lo que hace necesario llevar a cabo un estudio más minucioso en condiciones reales de cultivo.

4. 3. Uso combinado de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) y *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Hemiptera: Gelechiidae) en el control de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae).



4.3.1.Resultados

4.3.1.1. Daño en planta

La liberación semanal de 10 parejas de *T. absoluta* por jaula, resultó en la infestación de todos los foliolos de las plantas del tratamiento control, al final del experimento (**Figura 4.3.1**). El número máximo de foliolos atacados se detectó el 22 de julio de 2009, con un total de $364,18 \pm 26,76$ foliolos atacados por planta. A partir de este momento, el número de foliolos atacados decreció manteniéndose constante entre 200 y 230 foliolos atacados por planta, hasta el final del experimento (**Figura 4.3.2**). Por el contrario, en el resto de tratamientos, donde la infestación con *T. absoluta* se realizó de la misma forma, pero se trato con Bt/ *N. tenuis*, se observó una reducción de daño del 97% con respecto al control ($F = 264,2$; $gl = 3, 195$; $P < 0,0001$). Estas diferencias significativas no estuvieron presentes entre los diferentes tratamientos con Bt/ *N. tenuis* (Bt1 vs Bt2, Bt1 vs Bt3, Bt2 vs Bt3: $gl = 1, 195$ y $P = 1,000$).

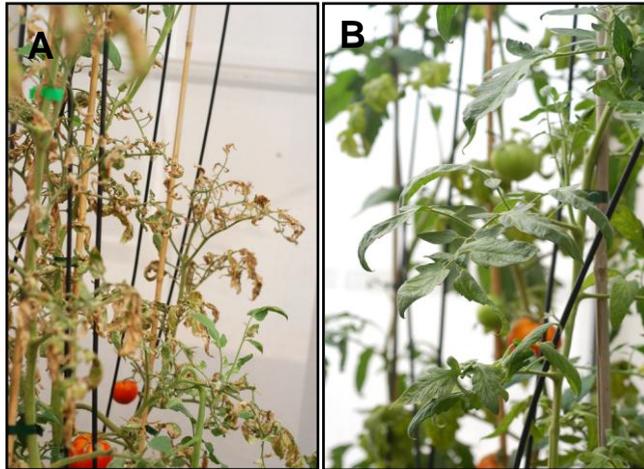


Figura 4.3.1. Aspecto de las plantas en el tratamiento control (A) y en uno de los tratamientos donde se trató semanalmente con *B. thuringiensis* y se liberó 1 *N. tenuis* por planta 3 semanas después de la infestación (B).

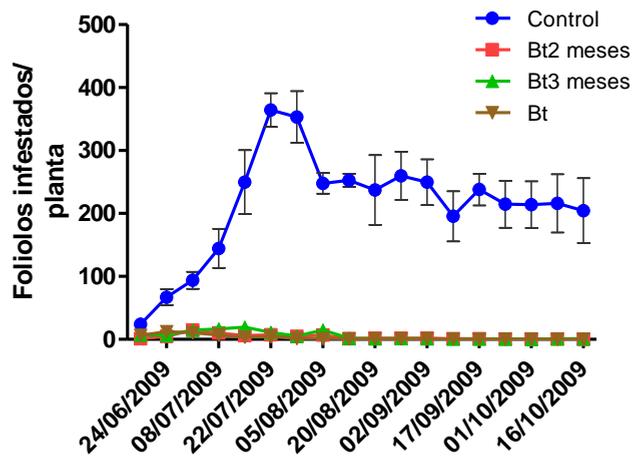


Figura 4.3.2. Número de foliolos atacados por planta (media \pm ES) para las plantas infestadas semanalmente con 10 parejas de *T. absoluta* y tratadas semanalmente con *B. thuringiensis*. Se liberó 1 *N. tenuis* por planta 3 semanas después de la infestación.

4.3.1.2. Poblaciones de *N. tenuis*

La suelta de 1 *N. tenuis* por planta fue suficiente para que se instalaran los móridos en las jaulas experimentales. El número tanto de adultos como de ninfas fue creciendo regularmente desde su liberación hasta el final del experimento. El análisis estadístico mostró que hubo diferencias significativas entre el control y los tratamientos donde se liberó *N. tenuis* (adultos: $F = 20,472$; $gl = 3, 195$; $P < 0,0001$; ninfas: $F = 18,662$; $gl = 3, 195$; $P < 0,0001$). Por el contrario, el número de adultos y ninfas no fue diferente significativamente entre los tratamientos Bt/ *N. tenuis* (Bt1 vs Bt2, Bt1 vs Bt3, Bt2 vs Bt3: $gl = 1, 195$ y $P = 1,000$).

En dos de los tratamientos (Bt1 y Bt2), las aplicaciones con *B. thuringiensis* se detuvieron antes del final del experimento. Por lo que, en estos casos, el control de *T. absoluta* recayó exclusivamente en *N. tenuis*. El número de individuos presente en el tercio apical, en el tratamiento Bt1 cuando se detuvieron los tratamientos fue de $0,75 \pm 0,25$ individuos por planta, mientras que en el tratamiento Bt2 fue $1,25 \pm 0,25$ (**Figura 4.3.3**).

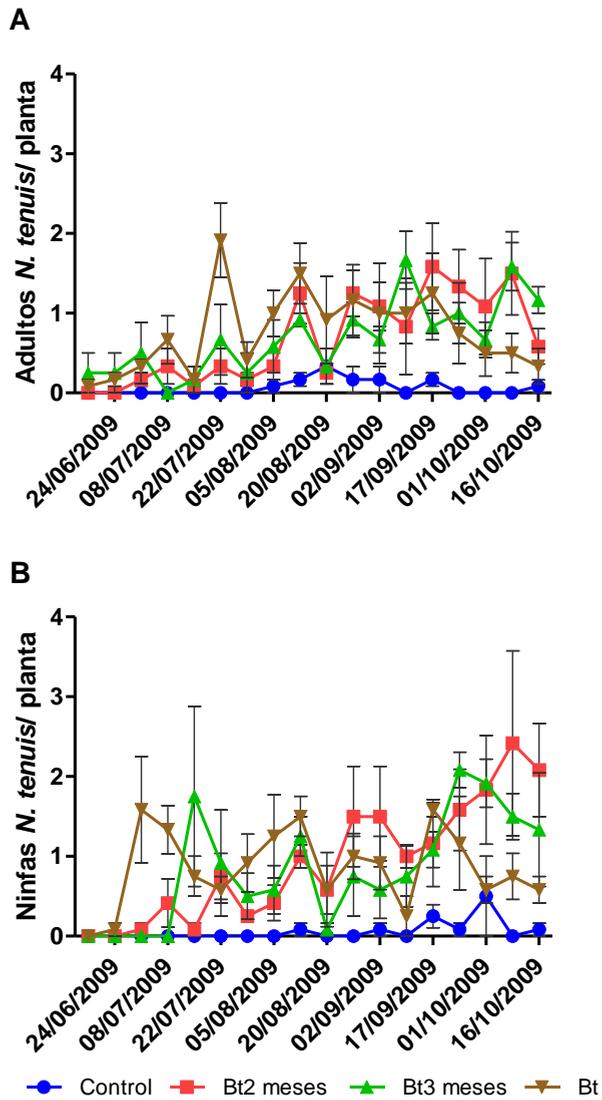


Figura 4.3.3. Número de *N. tenuis* tanto de adultos (A) como de ninfas (B) por planta (media \pm ES) para las plantas infestadas semanalmente con 10 parejas de *T. absoluta* y tratadas semanalmente con *B. thuringiensis*. Se liberó 1 *N. tenuis* por planta 3 semanas después de la infestación.

4.3.1.3. Anillos necróticos

Dado que *N. tenuis* presenta un comportamiento zoofitófago bajo determinadas condiciones, semanalmente se examinaron las plantas para comprobar la presencia de anillos necróticos en el cultivo. Los primeros anillos necróticos se detectaron casi al final del experimento (desde el 25 de septiembre de 2009) (**Figura 4.3.4**). No se detectó la presencia de anillos necróticos en las plantas del tratamiento control. El valor máximo de anillos necróticos por planta se dio en el tratamiento Bt1 el 16 de octubre de 2009, con un número de $5,25 \pm 1,80$ (media \pm ES) anillos por planta. El número de anillos necróticos fue diferente significativamente entre los tratamientos donde se liberó *N. tenuis* ($F = 17,822$; $gl = 3, 41$; $P < 0,0001$). El número de anillos necróticos fue menor en el tratamiento Bt3 comparado con el Bt1 (Bt3 vs Bt1: $gl = 1, 41$ y $P = 0,0007$; Bt3 vs Bt2: $gl = 1, 41$ y $P = 0,1195$; y Bt1 vs Bt2: $gl = 1, 41$ y $P = 1,000$). A pesar de la presencia de los anillos necróticos, no se observó la presencia de abortos florales a lo largo del experimento, en ninguno de los tratamientos donde se liberó *N. tenuis*.

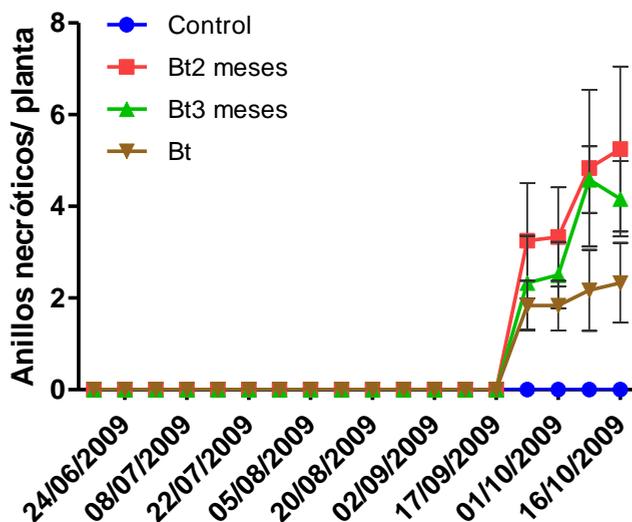


Figura 4.3.4. Número de anillos necróticos por planta (media \pm ES) para las plantas infestadas semanalmente con 10 parejas de *T. absoluta* y tratadas semanalmente con *B. thuringiensis*. Se liberó 1 *N. tenuis* por planta 3 semanas después de la infestación.

4.3.1.4. Efecto de los tratamientos Bt/ *N. tenuis* en la producción

El impacto de *T. absoluta* sobre la producción fue muy elevado. El peso de los frutos recolectados en las plantas control fue significativamente inferior al peso de los frutos recolectados en los tratamientos Bt/ *N. tenuis* ($F = 17,99$; $gl = 3, 11$; $P = 0,0006$) (**Figura 4.3.5A**). Sin embargo, la producción no fue diferente significativamente entre los tratamientos con Bt/ *N. tenuis* ($P < 0,05$). El porcentaje de frutos atacados fue significativamente mayor en el control que en los tratamientos con Bt/ *N. tenuis* ($F = 386,3$; $gl = 3, 11$; $P < 0,0001$). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con Bt/ *N. tenuis* ($P < 0,05$) (**Figura 4.3.5B**).

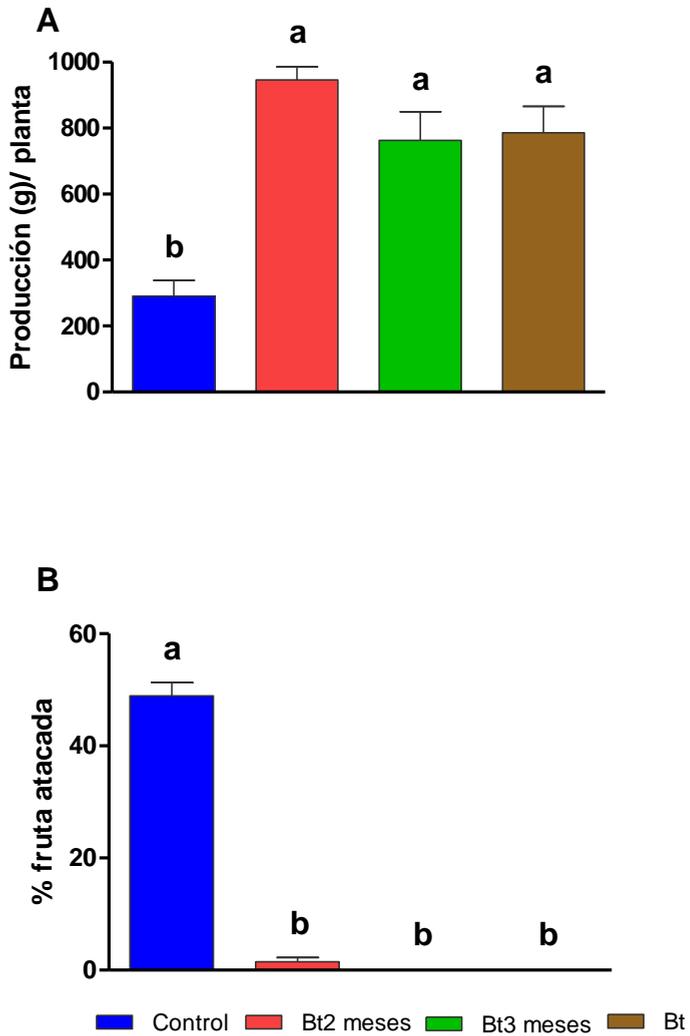


Figura 4.3.5. Peso total de fruta (g) obtenido por planta (A) (media \pm ES) y porcentaje de fruta atacada (B) para las plantas infestadas semanalmente con 10 parejas de *T. absoluta* y tratadas semanalmente con *B. thuringiensis*. Se liberó 1 *N. tenuis* por planta 3 semanas después de la infestación.

4.3.2. Discusión

El uso combinado de las sueltas inoculativas del depredador *N. tenuis* junto con los tratamientos periódicos con *B. thuringiensis*, resultaron altamente efectivos en la reducción del daño producido por *T. absoluta*. Independientemente del tiempo en el que se detuvieron los tratamientos con *B. thuringiensis* (2 ó 3 meses), las plantas que recibieron tratamientos con *B. thuringiensis* y *N. tenuis* no mostraron daños en fruto, y la reducción de daño en foliolo fue de un 97% frente al control. Los efectos de los tratamientos entre estas plantas no mostraron diferencias significativas. Esto demuestra que cuando *N. tenuis* está bien instalado en el cultivo es capaz de controlar a la plaga. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos en los que se observó que *N. tenuis* es capaz de controlar a *T. absoluta* una vez está instalado en el cultivo (Arnó et al., 2009b; Mollá et al., 2009; Gabarra y Arnó, 2010).

La hipótesis planteada en este estudio se basó en el hecho de que *B. thuringiensis* es altamente efectivo sobre las larvas jóvenes de *T. absoluta* (González-Cabrera et al., 2011). Esto permitiría que *N. tenuis* aumente sus poblaciones alimentándose de los huevos de *T. absoluta* que habría disponibles. Sin embargo, en la práctica, implementar esta estrategia puede no ser tan simple como parece, ya que, el momento en el que los tratamientos con *B. thuringiensis* deben detenerse dependerá del número de depredadores presentes en el cultivo. Además, el nivel poblacional de *N. tenuis* dependerá de factores como el estado fisiológico de la planta, la temperatura, la presión de plaga o la presencia o no de presa alternativa. Basándonos en nuestra experiencia, en un campo comercial, la decisión de

cuando parar los tratamientos con *B. thuringiensis* se haría tras hacer una evaluación de los factores anteriores. Estos factores deberían ser considerados a partir de su evolución en el tiempo y no a partir de un momento puntual del ciclo de cultivo.

El comportamiento zoofitófago de *N. tenuis*, hace necesario estudiar el daño potencial que puede producir éste en el cultivo. Cuando este depredador se alimenta directamente de las partes reproductivas y vegetativas de la planta, produce lo que se conoce como anillos necróticos en tallos y pecíolos de las hojas, además puede producir abortos florales, punteaduras en los frutos y posiblemente como consecuencia una reducción de la producción (Sánchez, 2008). La intensidad con la que *N. tenuis* se alimenta de la planta de tomate en condiciones Mediterráneas ha sido descrita por varios autores (Sánchez y Lacasa, 2008; Calvo et al., 2009; Sánchez, 2009; Arnó et al., 2010), quienes llegaron a la conclusión de que el daño causado por estos míridos en las plantas de tomate está directamente relacionado con la abundancia de *N. tenuis* e inversamente relacionado con la interacción entre el número de *N. tenuis* y el número de presa. Todos los estudios anteriormente citados se llevaron a cabo usando como presa la mosca blanca *B. tabaci*. Por lo tanto, la presencia de una nueva presa abundante como es *T. absoluta* en el agroecosistema del tomate podría modificar el comportamiento zoofitófago de *N. tenuis*. Esta consideración haría necesaria una actualización de los umbrales de densidad de establecimiento de este depredador.

En nuestro estudio, no se observaron abortos florales y el máximo de anillos necróticos se encontró 18 semanas después de liberar 1 *N. tenuis*/

planta con un valor de $5,25 \pm 1,80$. Sin embargo, es difícil comparar estos valores con los estudios previos ya que al liberar 10 parejas de *T. absoluta* semanales por jaula siempre había huevos de *T. absoluta* disponibles como alimento.

La producción en el tratamiento control fue menor que en los otros tratamientos. Esta diferencia fue debida al daño producido por *T. absoluta* en los folíolos, el cual redujo la capacidad fotosintética de la planta. Además, la mitad de los frutos cosechados fueron descartados ya que presentaban daño producido por las larvas al alimentarse directamente de ellos. Por el contrario, no hubo infestación de frutos en las plantas donde se trató con *B. thuringiensis* y se liberó *N. tenuis*, probablemente debido a la elevada mortalidad de larvas jóvenes. Como resultado de esta elevada mortalidad, el número de larvas de tercer y cuarto estadio fue bajo. Estos estadios son los principales responsables de infestación de frutos (Desneux et al., 2010).

Como fue de esperar, *B. thuringiensis* resultó inocuo y compatible con *N. tenuis*. Sin embargo, las formulaciones comerciales de *B. thuringiensis* pueden impactar indirectamente sobre las poblaciones de *N. tenuis* de dos formas diferentes. Por un lado, pueden aparecer efectos secundarios subletales, no por *B. thuringiensis* directamente, si no por los coadyugantes presentes en la formulación comercial. Algunos coadyugantes pueden tener potencial para molestar (y/ o matar) otros artrópodos por asfixia si son usados mucho tiempo (Purcell y Schroeder, 1996; Acheampong y Stark, 2004; Desneux et al., 2006). Además, los tratamientos con *B. thuringiensis* pueden impactar sobre *N. tenuis* a través de un efecto demográfico sobre

sus presas en el agroecosistema (y por lo tanto pueden llevar a la extinción de las poblaciones del depredador en el sistema). Estos dos factores podrían explicar el bajo número de *N. tenuis* y anillos necróticos presentes en el tratamiento Bt3, durante la última semana de experimentación. Sería necesario llevar a cabo una investigación más a fondo para dar respuesta a este posible fenómeno.

La elevada tasa de reproducción de *T. absoluta*, junto con estudios previos que hacen referencia a la aparición de resistencias por parte de otros insectos a las formulaciones basadas en *B. thuringiensis* (Ferré y Van Rie, 2002; Gassmann et al., 2009) hacen altamente necesaria la alternancia de los tratamientos con *B. thuringiensis* con otros tratamientos que contengan otros ingredientes activos. Estos ingredientes deberán ser selectivos con los míridos y efectivos contra las larvas de *T. absoluta*. Esta estrategia además, podría incluir el uso alternado de diferentes formulaciones de *B. thuringiensis* basadas en subespecies con toxina diferente (por ejemplo subsp. *kurstaki* o *aizawai*) (Schnepf et al., 1998). Estas formulaciones pueden ser efectivas en un 95% o más si se aplican en una concentración adecuada (González-Cabrera et al., 2011).

En resumen, nuestros resultados sugieren que la combinación de *N. tenuis* y *B. thuringiensis* puede resultar en una estrategia muy efectiva en el manejo de plagas en el cultivo de tomate, ya que el número de tratamientos químicos se vería reducido de forma drástica. Estos dos agentes de control pueden actuar juntos en el control de *T. absoluta*. Además, *N. tenuis* una vez instalado en el cultivo, podría ayudar en el control de otras plagas como las moscas blancas (Mollá et al., 2009), mientras los tratamientos con *B.*

thuringiensis prevendrían el ataque de otras especies de lepidópteros como *H. armigera* (Avilla et al., 2005). Además, esta estrategia es respetuosa con el medio ambiente y puede proporcionar una producción de tomate sin residuos, incrementando la calidad de los frutos.

4.4. Daños producidos en planta por *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Hemiptera: Gelechiidae), en presencia de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae).



4.4.1. Resultados

4.4.1.1 Daño en planta

La liberación semanal de 10 parejas de *T. absoluta* por jaula, resultó en la infestación de todos los folíolos de las plantas del tratamiento control, al final del experimento (**Figura 4.4.1**). En el tratamiento control, el 16 de agosto de 2011 se detectó el mayor número de folíolos infestados por *T. absoluta* por planta con un valor de $311,7 \pm 24,5$ (**Figura. 4.4.2**). A partir de esa fecha, el número de folíolos infestados por semana se mantuvo constante con valor aproximado de $253,1 \pm 18,3$. El número de folíolos infestados por *T. absoluta* fue significativamente menor en los tres tratamientos ensayados que en el control ($F = 6,921$, $gl = 3$, 544 , $P < 0,05$) (**Figura. 4.4.2**). La incidencia de *T. absoluta* fue significativamente menor en el tratamiento pre-trasplante que en los tratamientos post-trasplante y Bt (**Tabla 4.4.1**). En el tratamiento pre-trasplante el número mayor de folíolos atacados ($9,1 \pm 2,8$) se detectó el 23 de agosto de 2011 representando una reducción relativa respecto al control del 97,1%. El número de folíolos infestados por *T. absoluta* fue menor en el tratamiento post-trasplante (máximo de $48,8 \pm 10,8$ el 19 de julio de 2011) que en el tratamiento Bt (máximo de $127,1 \pm 25,1$ el 2 de agosto de 2011), con una reducción respecto al control del 84,3% y 59,2%, respectivamente (**Tabla 4.4.1**).

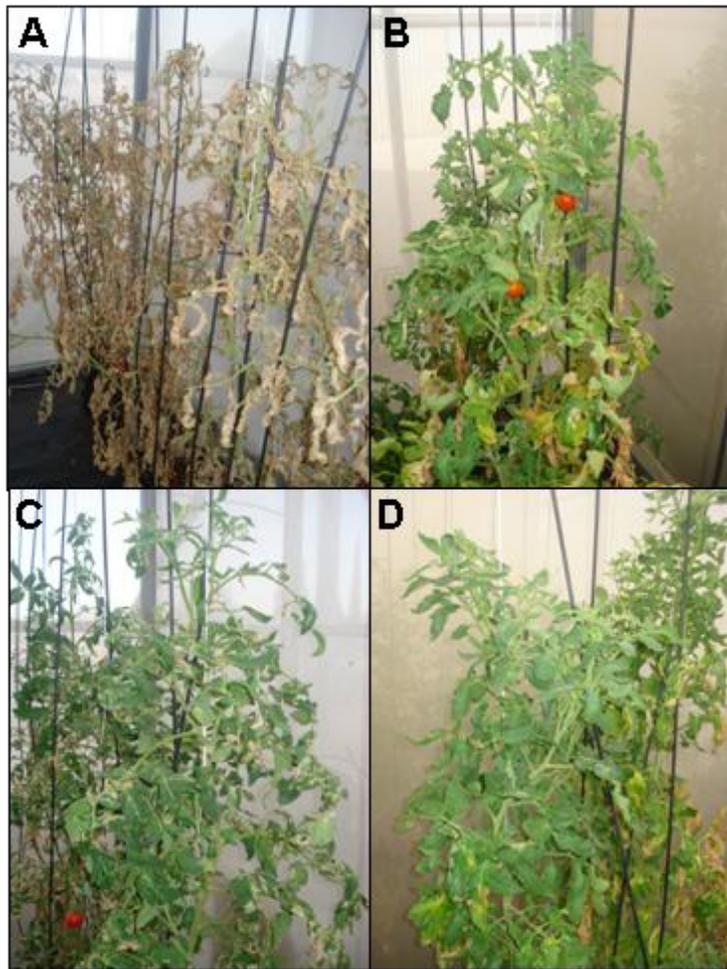


Figura 4.4.1. Aspecto de las plantas en el tratamiento control (A), en el tratamiento de post-trasplante (B), en el tratamiento de Bt (C) y en el tratamiento de pre-trasplante (D).

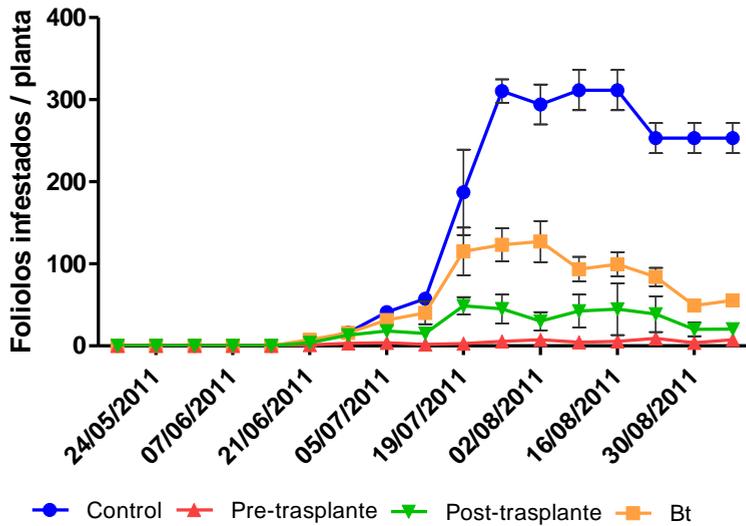


Figura 4.4.2. Número de foliolos infestados (media \pm ES) por *T. absoluta* cuando en las plantas se liberó *N. tenuis*, se trató con *B. thuringiensis* o se combinaron ambos enemigos naturales.

4.4.1.2. Poblaciones de *N. tenuis*

Las dos estrategias de liberación de *N. tenuis* probadas fueron suficientes para el establecimiento del mírido en las jaulas experimentales. El número tanto de ninfas como de adultos creció regularmente desde su liberación hasta el final del experimento en ambos tratamientos (**Figura 4.4.3**). Sin embargo, en el tratamiento pre-trasplante la instalación de *N. tenuis* se produjo de manera casi inmediata tras el trasplante, mientras que en el tratamiento post-trasplante tomó 6-7 semanas. Este hecho motivó que el número de ninfas como de adultos de *N. tenuis* en ambos tratamientos fuera distinto y mayor en el tratamiento pre-trasplante (adultos: $t = 3,023$; $gl = 1, 247$; $P < 0,05$, ninfas: $t = 3,748$; $gl = 1, 270$; $P < 0,05$).

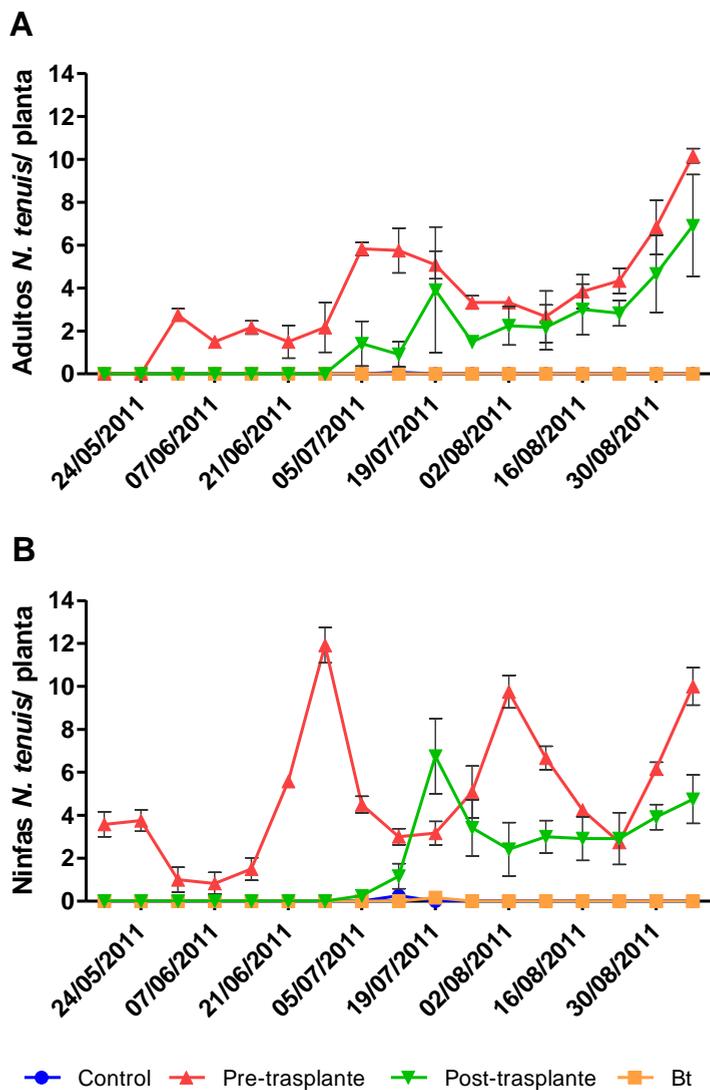


Figura 4.4.3. Número de adultos (A) y ninfas (B) de *N. tenuis* (media \pm ES) por planta cuando se liberó 1 *N. tenuis*/ planta 3 semanas después del trasplante (post-trasplante) o 1 *N. tenuis*/ 2 plantas en el semillero (pre-trasplante).

4.4.1.3. Anillos necróticos

El número de anillos necróticos creció regularmente desde la liberación de *N. tenuis* hasta el final del experimento en ambos tratamientos donde se liberó. En el tratamiento pre-trasplante la aparición de los primeros anillos necróticos se dio 3 semanas tras el comienzo del experimento (30 de mayo de 2011), mientras en el tratamiento de post-trasplante aparecieron 5 semanas más tarde (5 de julio de 2011). Esto conllevó un número de anillos necróticos significativamente mayor en el tratamiento pre-trasplante que en el de post-trasplante ($t = 3,688$; $gl = 1, 266$; $P < 0,05$) (**Figura 4.4.4**).

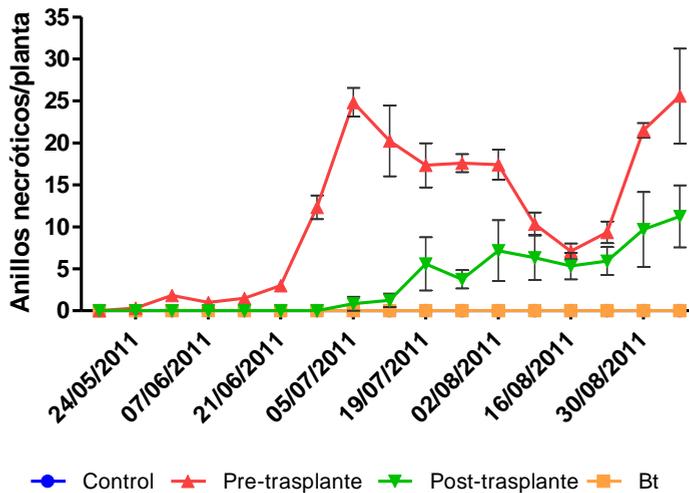


Figura 4.4.4. Número de anillos necróticos (media \pm ES) por planta cuando se liberó 1 *N. tenuis*/ planta 3 semanas después del trasplante (post-trasplante) o 1 *N. tenuis*/ 2 plantas en el semillero (pre-trasplante).

4.4.1.4. Efecto de los móridos en la producción

El número total de frutos por planta fue diferente significativamente entre los diferentes tratamientos ($F = 17,322$; $gl = 3, 596$; $P < 0,05$), siendo mayor en el tratamiento que recibió únicamente Bt, seguido por el tratamiento de post-trasplante. El menor fue en el tratamiento control que no mostró diferencias significativas con el tratamiento pre-trasplante (**Tabla 4.4.1** y **Figura 4.4.5A**).

El número de frutos infestados por *T. absoluta*, por planta fue diferente significativamente entre los diferentes tratamientos ($F = 12,183$; $gl = 3, 141$; $P < 0,05$). El mayor número de frutos infestados se dio en el tratamiento control, mientras que el menor fue en el tratamiento de pre-trasplante. No hubo diferencias significativas en el número de frutos atacados entre los tratamientos post-trasplante y Bt (**Tabla 4.4.1** y **Figura 4.4.5B**).

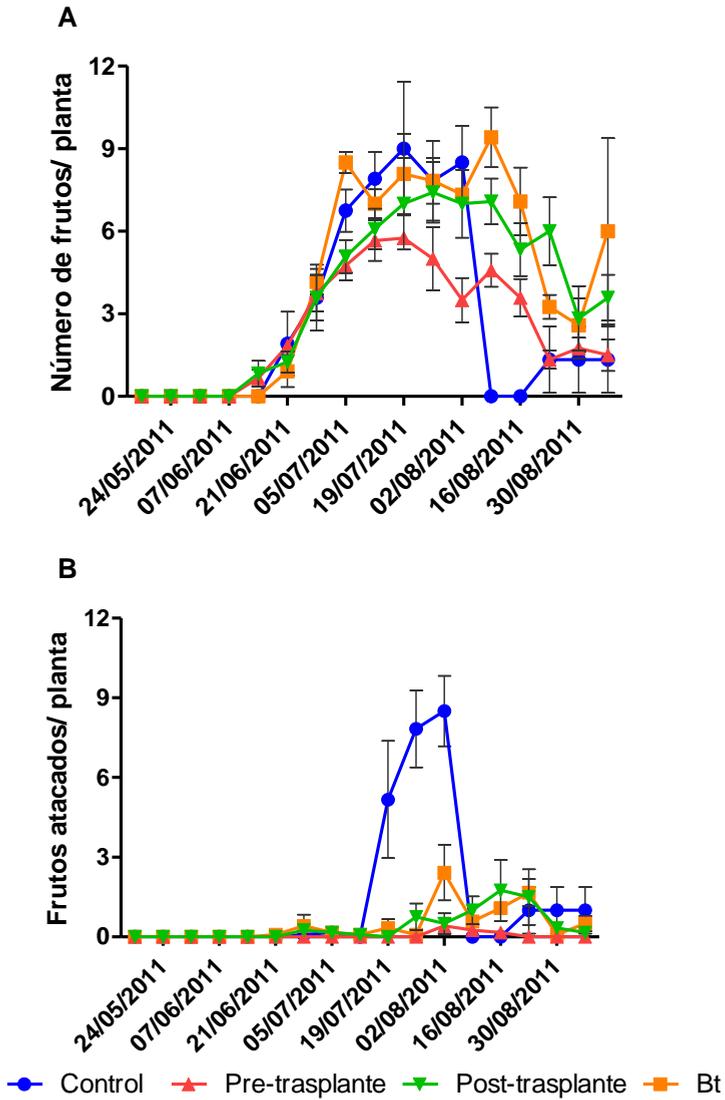


Figura 4.4.5. Número de frutos cosechados por planta (media \pm ES) (A) y número de frutos atacados por planta (B) cuando en las plantas se liberó *N. tenuis*, se trató con *B. thuringiensis* o se combinaron ambos enemigos naturales.

Factor	Contraste entre factores	Folios atacados		Frutos		Frutos atacados	
		t ₅₄₄	P	t ₆₂₀	P	t ₁₄₁	P
Tratamiento	Control vs Bt	4,195	< 0,05	4,987	< 0,05	5,121	< 0,05
	Control vs pre-trasplante	4,464	< 0,05	1,284	0,200*	5,939	< 0,05
	Control vs post-trasplante	4,407	< 0,05	2,989	0,003	4,831	< 0,05
	Bt vs pre-trasplante	4,448	< 0,05	6,271	< 0,05	2,975	0,003
	Bt vs post-trasplante	4,150	< 0,05	1,999	0,046	0,726	0,469*
	Pre-trasplante vs post-trasplante	4,390	< 0,05	4,272	< 0,05	3,310	0,001

Tabla 4.4.1. Valores de probabilidad del contraste por parejas del número de folios atacados, número de frutos cosechados y número de frutos atacados en los diferentes tratamientos utilizados en el experimento. Los valores seguidos por un asterisco denotan diferencias significativas entre tratamientos según el test de DNS (* $P < 0,05$).

4.4.2. Discusión

En ambas estrategias donde se liberó *N. tenuis* se consiguió un buen establecimiento del depredador en el cultivo. Sin embargo, en el tratamiento pre-trasplante el establecimiento de *N. tenuis* fue casi inmediato tras el trasplante en campo, lo que supuso un adelanto de aproximadamente 5 semanas en la instalación frente al tratamiento post-trasplante. Este hecho motivó que las poblaciones de *N. tenuis* fueran más elevadas en el tratamiento pre-trasplante. Aunque la estrategia de post-trasplante ha resultado ser muy efectiva tanto en el control de moscas blancas (principalmente *B. tabaci*) como de *T. absoluta* (Calvo et al., 2009; Urbaneja et al., 2009; Mollá et al., 2011), nuestros resultados muestran como el mayor número de *N. tenuis* alcanzado en el tratamiento de pre-trasplante asegura una reducción más elevada de las poblaciones de *T. absoluta*, con reducciones de daño en foliolo del 97,1% frente al 84,3% que se alcanzó con el post-trasplante. Estos resultados coinciden con lo ya observado por Calvo et al., (2012b), quienes ya mostraron la efectividad de *N. tenuis* liberado en pre-trasplante en el control de *B. tabaci* y *T. absoluta* en cultivos de tomate en Almería. Es en esta zona, donde al haber una presión de plaga inicial elevada desde la fecha de trasplante (plantación de verano) la estrategia pre-trasplante ha resultado ser muy exitosa desde la campaña del tomate del 2010 cuando se empezó a ensayar (Calvo et al., 2012a). Por el contrario, en otras zonas geográficas con fechas de plantación en épocas donde la presión de plaga es menor, como puede ser el caso de Murcia o Valencia, la liberación en post-trasplante resultaría suficiente.

Nesidiocoris tenuis presenta un comportamiento fitófago que se acentúa en condiciones extremas de escasez de presa (Sánchez, 2008; Arnó et al., 2010; Castañe et al., 2011). El número de anillos necróticos producidos por *N. tenuis* está directamente relacionado con la temperatura y el número de individuos presentes por planta e inversamente relacionado con la presa disponible (Sánchez, 2008; Calvo et al., 2009; Sánchez, 2009; Arnó et al., 2010; Calvo et al., 2012b). Además de la dependencia de presa, existen otros factores que muy probablemente influyan en el carácter fitófago de este mírido, como podría ser un mayor o menor estrés hídrico, la variedad o el estado fisiológico de la planta. Sin embargo, no existe información sobre este último punto. Los síntomas más evidentes de la fitofagia de *N. tenuis* son unas punteaduras circulares que aparecen rodeando los tallos y que reciben el nombre de anillos necróticos (Sánchez, 2008; Calvo et al., 2009; Arnó et al., 2010; Castañe et al., 2011). Estos anillos necróticos aparecen principalmente en los tallos, pero también en los peciolos de flores y frutos cuando sus poblaciones son muy elevadas, con lo que pueden llegar a producir el aborto de los mismos y por consiguiente disminuir el número de frutos obtenidos por planta, (Sánchez y Lacasa, 2008; Arnó et al. 2010). Calvo et al., (2012b), también observó un aumento en el número de abortos florales cuando las poblaciones de *N. tenuis* eran mayores en el campo. En nuestros resultados también se observó que debido a las altas poblaciones que se alcanzaron de *N. tenuis* en el tratamiento pre-trasplante hubo una reducción significativa del número de frutos por planta, respecto a los otros dos tratamientos, Bt y post-trasplante. Esta reducción en el número de frutos cosechados coincidió con un mayor número de anillos necróticos por planta en el tratamiento pre-trasplante. Arnó et al., (2010) concluyeron que el daño producido por *N. tenuis* en planta cuando la presa es escasa, estaría

relacionado con la duración de la interacción entre el depredador y la planta. En este estudio se observó que la reducción en el número de frutos comenzó 6 semanas después de que empezaran a aparecer los anillos necróticos. En nuestro ensayo, en el tratamiento de post-trasplante, estos anillos necróticos aparecen 6 semanas tras la liberación de *N. tenuis* coincidiendo con estudios previos (Calvo et al., 2009), mientras en el tratamiento pre-trasplante aparecieron mucho antes como ya fue observado por Calvo y colaboradores (2012b). Por ello la reducción en la cosecha en el tratamiento de pre-trasplante se debería al elevado daño producido por *N. tenuis*. Aun así, se debe tener en cuenta que el presente experimento se llevó a cabo en jaulas perfectamente cerradas y con poblaciones de *T. absoluta* constante. Nuestra finalidad fue evaluar si bajo ciertas condiciones de cultivo y en presencia de *T. absoluta* el daño producido por *N. tenuis* puede reducir la cosecha. En un invernadero comercial o en un campo al aire libre, donde *N. tenuis* puede emigrar a otros cultivos cuando la presa sea escasa, o que la presión de plaga sea mayor, debería de ser menos común que se de esta disminución del número de frutos cosechados. En Almería, por ejemplo, donde la presión tanto de moscas blancas como de *T. absoluta* es elevada, la estrategia de liberación de *N. tenuis* en pre-trasplante ha resultado tan exitosa en el control de ambas plagas que durante el 2012 se implementó en 8.000 ha de cultivo (KOPPERT B.S., 2012).

Sin embargo, no hay que contemplar la fitofagia como una característica perjudicial de este mírido, ya que en condiciones no extremas donde las poblaciones de este mírido no son muy elevadas, la fitofagia podría resultar beneficiosa en periodos de escasez de plaga, ya que serviría para ayudar a

mantener con vida a este mírido en el cultivo por un tiempo limitado (Naranjo y Gibson, 1996; Urbaneja et al., 2003; Sánchez et al., 2008). Además, las ninfas de *N. tenuis* son capaces de completar varios estadios ninfales alimentándose exclusivamente de la planta de tomate aunque no sean capaces de alcanzar el estado adulto (Urbaneja et al., 2005).

La fitofagia de *N. tenuis* y su repercusión en la cosecha invita a continuar con la búsqueda de otros míridos depredadores que provoquen menos daño en la planta. En resumen, la estrategia de pre-trasplante resultaría una estrategia más efectiva para la instalación de *N. tenuis* en el cultivo que la liberación en post-trasplante. El mayor número de individuos alcanzado por planta siguiendo esta estrategia aseguraría un mejor control del daño producido por *T. absoluta* tanto en foliolo como en fruto. La posibilidad de que *N. tenuis* produjese disminución de la cosecha dada su fitofagia haría necesario llevar a cabo un seguimiento de las poblaciones del mismo que en caso necesario podrían ser rebajadas mediante el uso de materias activas que disminuirían las poblaciones del mismo sin llevarlas a la extinción (Arnó et al., 2009b).

5. Conclusiones generales



De los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. *Nesidiocoris tenuis* puede mantener sus poblaciones en el cultivo de tomate alimentándose exclusivamente de huevos de *T. absoluta*, hecho que le convierte en un buen agente de control biológico para esta plaga exótica. En cambio, *M. pygmaeus* difícilmente se instalará en el cultivo en ausencia de otro alimento, dado que su descendencia es muy limitada cuando se alimenta exclusivamente de huevos de *T. absoluta*.
2. La capacidad de las hembras de *N. tenuis* de detectar plantas infestadas de *T. absoluta* y su capacidad para reproducirse en el cultivo de tomate depredando exclusivamente huevos de *T. absoluta* facilitará el control de la plaga al inicio del cultivo o cuando las densidades de plaga sean bajas.
3. Tanto las ninfas como las hembras de *N. tenuis* son capaces de depredar sobre *T. absoluta* y *B. tabaci* cuando ambas plagas se ofrecen conjuntamente. Esto sugiere que *N. tenuis* puede ser un buen agente de control biológico de ambas plagas, incluso cuando éstas coexisten en el cultivo.
4. El uso combinado de sueltas inoculativas de *N. tenuis* junto con tratamientos periódicos de *B. thuringiensis*, resultó altamente efectivo en la reducción del daño producido por *T. absoluta*. Con esta metodología, se pueden mantener bajas las poblaciones de *T.*

absoluta, mientras *N. tenuis* alcanza la población necesaria para controlar a la plaga por si solo.

5. Es recomendable realizar muestreos periódicos de las poblaciones de *N. tenuis* en el cultivo de tomate ya que a pesar de tener disponibilidad de presa, si las poblaciones de este depredador son muy elevadas, pueden provocar disminución de la cosecha.

A partir de este trabajo se puede concluir que *N. tenuis* es un agente de control biológico muy efectivo en el control de *T. absoluta* en el cultivo de tomate y gracias a su polifagia es capaz de regular las poblaciones de varios fitófagos plaga. Sin embargo, es necesario hacer un seguimiento regular de *N. tenuis* y sus posibles presas, de manera que se pueda reaccionar antes de que *N. tenuis* empiece a provocar daños en la planta por falta de presas. La utilización de este depredador en estrategias de gestión integrada de plagas, reducirá la dependencia de plaguicidas en el cultivo del tomate y con ello se reducirá el impacto negativo sobre la salud humana y el medio ambiente. Además facilitará la implementación de medidas legislativas que garanticen una mayor seguridad alimentaria.

6. Bibliografía



- Acheampong, S. y Stark, J. D.** (2004). Effects of the agricultural adjuvant Sylgard 309 and the insecticide pymetrozine on demographic parameters of the aphid parasitoid, *Diaeretiella rapae*. *Biological Control*, (31), 133-137.
- Alomar, O. y Albajes, R.** (1996). Greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) predation and tomato fruit injury by the zoophytophagous predator *Dicyphus tamaninii* (Heteroptera: Miridae). *Zoophytophagous Heteroptera: implications for life history and integrated pest management*, 155-177.
- Alomar, O., Goula, M. y Albajes, R.** (2002). Colonisation of tomato fields by predatory mirid bugs (Hemiptera: Heteroptera) in northern Spain. *Agriculture. Ecosystems & Environment*, (89), 105-115.
- Alomar, O., Riudavets, J. y Castañe, C.** (2006). *Macrolophus caliginosus* in the biological control of *Bemisia tabaci* on greenhouse melons. *Biological Control*, (36), 154-162.
- Apablaza, J.** (1992). La polilla del tomate y su manejo. *Tattersal*, (79), 12-13.
- Araujo-Gonçalves, A.** (2010). Alverde: la solución BASF para el control de *Tuta absoluta*. *Phytoma España : La revista profesional de sanidad vegetal*, (217), 21-22.
- Arnó, J., Castañe, C., Riudavets, J., Roig, J. y Gabarra, R.** (2006). Characterization of damage to tomato plants produced by the zoophytophagous predator *Nesidiocoris tenuis*. *IOBC/ WPRS Bulletin*, (29), 249-254.

- Arnó, J., Roig, J. y 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), 1-6.
- Arnó, J., Sorribas, R., Prat, M., Matas, M., Pozo, C., Rodríguez, D., Garreta, A., Gómez, A. y Gabarra, R.** (2009a). *Tuta absoluta*, a new pest in IPM tomatoes in the northeast of Spain. *IOBC/ WPRS Bulletin*, (49), 203–208.
- Arnó, J., Mussoll, A., Gabarra, R., Sorribas, R., Prat, M., Garreta, A., Gómez, A., Matas, M., Pozo, C. y Rodríguez, D.** (2009b). *Tuta absoluta* una nueva plaga en los cultivos de tomate. Estrategias de manejo. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (211), 16–22.
- Arnó, J., Gabarra, R., Estopá, M., Gorman, K., Peterschmitt, M. y Bonato, O.** (2009c). Implementation of IPM Programmes on European Greenhouse Tomato Production Areas: Tools and Constraints. *Edicions I Publicacions de la UdL*, Lleida, Spain.
- Arnó, J., Castañé, C., Riudavets, J., y Gabarra, R.** (2010). Risk of damage to tomato crops by the generalist zoophytophagous predator *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae). *Bulletin of entomological research*, 100(01), 105-115.
- Arnó, J. y Gabarra, R.** (2010). <http://www.endureinformationcentre.eu/>.
- Arnó, J. y Gabarra, R.** (2011). Side effects of selected insecticides on the *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) predators *Macrolophus*

- pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Pest Science*, (84), 513-520.
- Astor, E.** (2010). Estrategias DuPont en el control de *Tuta absoluta*. *Phytoma España : La revista profesional de sanidad vegetal*, (217), 107-111.
- Avilla, J., Albajes, R., Alomar, O., Castañé, C. y Gabarra, R.** (2004). Biological control of whiteflies in protected vegetable crops. *Biological Control of Arthropod Pests in Protected Culture*, 171-184.
- Avilla, C., Vargas-Osuna, E., González-Cabrera, J., Ferré, J. y González-Zamora, J. E.** (2005). Toxicity of several d-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Spain. *Journal of Invertebrate Pathology*, (90), 51-54.
- Bacci, L., Picanço, M. C., Sousa, F. F., Silva, E. M., Campos, M. R. y Tomé, H. V. T.** (2008). Inimigos naturais da traça do tomateiro. *Horticultura Brasileira*, (26), 2808-2812.
- Barnadas, I., Gabarra, R. y Albajes, R.** (1998). Predatory capacity of two mirid bugs preying on *Bemisia tabaci*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, (86), 215-219.
- Barrientos, Z. R., Apablaza, H. J., Norero, S. A. y Estay, P. P.** (1998). Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Ciencia e Investigación Agraria*, (25), 133-137.

- Batalla-Carrera, L., Morton, A. y García-del-Pino, F. (2010).** Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leafminer *Tuta absoluta* in laboratory and greenhouse conditions. *BioControl*, (55), 523-530.
- Bayer CropScience (2010).** Selectividad de los productos Bayer CropScience sobre los principales organismos de control biológico en cultivos hortícolas. <http://oberon.bayercropscience.es/tablas.pdf>. (Acceso 03/03/2011).
- Belda, C., y Riudavets, J. (2010).** Attraction of the parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Howard) (Hymenoptera: Pteromalidae) to odors from grain and stored product pests in a Y-tube olfactometer. *Biological Control*, 54(1), 29-34.
- Benavides, M. L. A., Rincon, F. C., Hakim, J. R. C., Rodríguez, D., Maldonado, D. E. P., Cuervo, J. B. y Riano, D. A. (2010).** Integración de conocimientos y tecnologías de polinización y control biológico, *Universidad Militar Nueva Granada Bogotá*, 20 p.
- Berlinger, M. J., Jarvis, W. R., Jewett, T. J. y Lebiush-Mordechi, S. (1999).** Managing the greenhouse, crop and crop Environment. *Integrated pest and disease management in greenhouse crops*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, 97-123.
- Berta, D. y Colomo, M. V. (2000).** Dos especies nuevas de *Bracon* F. y primera cita para la Argentina de *Bracon lucileae* Marsh (Hymenoptera, Braconidae), parasitoides de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera, Gelechiidae). *Insecta Mundi*, 307.

- Bielza, P., Fernandez, E., Gravalos, C. y 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.** (2010). La resistencia a insecticidas en *Tuta absoluta*. *Phytoma España : La revista profesional de sanidad vegetal*, 103-106.
- Birch, L. C.** (1948). The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *Journal of Animal Ecology*, (17), 15-26.
- Bompard, A., Jaworski, C., Bearez, P., y Desneux, N.** (2013). Sharing a predator: can an invasive alien pest affect the predation on a local pest? *Population Ecology*, (in press).
- Bonato, O., Couton, L., y Fargues, J.** (2006). Feeding preference of *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae) on *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of economic entomology*, 99(4), 1143-1151.
- Breene, R. G.** (1992). A new approach for matching biological control agents to pests. *The IPM Practitioner*, (14), 1-9.
- Breene, R. G., Dean, D. A. y Quarles, W.** (1994). Predators of sweetpotato whitefly. *The IPM Practitioner*, (16), 1-9.
- Cabello, T., Gallego, J. R., Vila, E., Soler, A., Pino, M. D., Carnero, A. y Hernández, E.** (2009a). Biological control of the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta* (Lep.: Gelechiidae), with releases of

Trichogramma achaeae (Hym.: Trichogrammatidae) in tomato greenhouses of Spain. *IOBC/ WPRS Bulletin*, (49), 225-230.

Cabello, T., Gallego, J. R., Fernández-Maldonado, F. J., Soler, A., Beltrán, D., Parra, A. y Vila, E. (2009b). The damsel bug *Nabis pseudoferus* (Hem.: Nabidae) as a new biological control agent of the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta* (Lep.: Gelechiidae), in tomato crops of Spain. *IOBC/ WPRS Bulletin*, (49), 219-223.

Cabello, T., Gallego, J. R., Fernandez, F. J., Gamez, M., Vila, E., Del Pino, M. y Hernandez, E. (2012). Biological control strategies for the South American tomato moth (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouse tomatoes. *Journal of Economic Entomology*, (105), 2085-2096.

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

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

Calvo, J., Bolckmans, K., Stansly, P. A. y Urbaneja, A. (2009). Predation by *Nesidiocoris tenuis* on *Bemisia tabaci* and injury to tomato. *BioControl*, 54(2), 237-246.

Calvo, F. J., Belda, J. E. y Giménez, A. (2010). Una nueva estrategia para el control biológico de mosca blanca y *Tuta absoluta* en tomate. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (216), 46-52.

- Calvo, F. J., Bolckmans, K., y Belda, J. E. (2012a).** Release rate for a pre-plant application of *Nesidiocoris tenuis* for *Bemisia tabaci* control in tomato. *BioControl*, (57), 809-817.
- Calvo, F. J., Lorente, M. J., Stansly, P. A., y Belda, J. E. (2012b).** Preplant release of *Nesidiocoris tenuis* and supplementary tactics for control of *Tuta absoluta* and *Bemisia tabaci* in greenhouse tomato. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 143(2), 111-119.
- Castañe, C. y Zapata, R. (2005).** Rearing the predatory bug *Macrolophus caliginosus* on a meat-based diet. *Biological Control*, (34), 66-72.
- Castañe, C., Arnó, J., Gabarra, R., y Alomar, O. (2011).** Plant damage to vegetable crops by zoophytophagous mirid predators. *Biological control*, 59(1), 22-29.
- Ciarla, M. V., Mareggiani, G., Heit, G., y Puhl, L. (2005).** *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) and *Capsicum annuum* (Solanaceae) volatiles: their effect on predators attraction. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 31.
- Chiu-Alvarado, P., Barrera, J. F., y Rojas, J. C. (2009).** Attraction of *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethyridae), a parasitoid of the coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae), to host-associated olfactory cues. *Annals of the Entomological Society of America*, 102(1), 166-171.

- Cohen, A. C. y Byrne, D. N.** (1992). *Geocoris punctipes* as a predator of *Bemisia tabaci*: A laboratory evaluation. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, (64), 195-202.
- Cohen, A. C. y Brummett, D. L.** (1997). The non-abundant nutrient (NAN) concept as a determinant of predator-prey fitness. *BioControl*, 42(1), 85-91.
- Costa, J. S., Junqueira, A. M. R., Silva, W. L. C. y França, F. H.** (1998). Impacto da irrigação via pivô-central no controle da traça-do-tomateiro. *Horticultura Brasileira*, (16), 19-23.
- Desneux, N., Denoyelle, R. y Kaiser, L.** (2006). A multi-step bioassay to assess the effect of the deltamethrin on the parasitic wasp *Aphidius ervi*. *Chemosphere*, (65), 1697-1706.
- Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys, K. A., Burgio, G., Arpaia, S., Narváez-Vasquez, C. A., González-Cabrera, J., Catalán-Ruescas, D., Tabone, E., Frandon, J., Pizzol, J., Poncet, C., Cabello, T. y Urbaneja, A.** (2010). Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of pest science*, 83(3), 197-215.
- Desneux, N., Luna, M. G., Guillemaud, T. y Urbaneja, A.** (2011). The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *Journal of Pest Science*, (84), 403-408.

- Dicke, M. y Vet, L. E. M.** (1999). Plant-carnivore interactions: evolutionary and ecological consequences for plant, herbivore and carnivore. *Pest and plants*, 483-520.
- Dicke, M.** (1999). Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 91(1), 131-142.
- Ehler, L. E.** (1998). Invasion biology and biological control. *Biological Control*, (13), 127-33.
- Elbert, A., Brück, E., Melgarejo, J., Schnorbach, H. J. y Sone, S.** (2005). Field development of Oberon_ for whitefly and mite control in vegetables, cotton, corn, strawberries, ornamentals and tea. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, (58), 441–468.
- EPPO.** (2006). European and Mediterranean Plant Protection Organization. Data sheets on quarantine pests. *Tuta absoluta* http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Tuta_absoluta/DSGNORAB.pdf (in press).
- EPPO.** (2008). European and Mediterranean Plant Protection Organization. Data sheets on quarantine pests. *Tuta absoluta* http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Tuta_absoluta/DSGNORAB.pdf (in press).
- Espinosa, P. J.** (2010). CAL-EX AVANCE EW: nueva alternativa en la estrategia de lucha control *Tuta absoluta*. *Phytoma España : La revista profesional de sanidad vegetal*, (217), 76-80.

- Estay, P. P.** (2000). Polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick). *Informativo La Platina*, (9).
- FAOSTAT.** (2010). Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Fauvel, G., Malausa, J. y Kaspar, B.** (1987). Etude en laboratoire des principales caracteristiques biologiques de *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae). *Entomophaga*, (32), 529-543.
- Fernández, S. y Montagne, A.** (1990). Biología del minador del tomate *Scrobipalpus absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Boletín de Entomología Venezolana*, 5(12), 89-99.
- Ferré, J. y Van Rie, J.** (2002). Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, (47), 501-533.
- Flatt, T.** (2009). Ageing: Diet and longevity in the balance. *Nature*, (462), 989-990.
- Gabarra, R., Arnó, J. y Riudavets, J.** (2008). Tomate, *In J. A. Jacas and A. Urbaneja* [eds.], Control biológico de plagas agrícolas. *Phytoma-España*, Valencia, Spain, (27), 410-422.
- Gabarra, R. y Arnó, J.** (2010). Resultados de las experiencias de control biológico de la polilla del tomate en cultivo de invernadero y aire libre en Cataluña. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (217), 65-68.

- García Roa, F.** (1989). Plagas del tomate y su manejo. *ICA Palmira, Colombia (US) (in Spanish)*.
- Gassmann, A. J., Carriere, Y. y Tabashnik, B. E.** (2009). Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, (54), 147-163.
- Gerling, D., Alomar, O. y Arno, J.** (2001). Biological control of *Bemisia tabaci* using predators and parasitoids. *Crop Protection*, (20), 779-799.
- Gilardón, E., Pocovi, M., Hernández, C. y Olsen, A.** (2001). Papel dos tricomas glandulares da folha do tomateiro na oviposição de *Tuta absoluta*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36(3), 585-588.
- Gillespie, D. R. y McGregor, R. R.** (2000). The functions of plant feeding in the omnivorous predator *Dicyphus hesperus*: water places limits on predation. *Ecological Entomology*. (25), 380-386.
- Giustolin, T. A.** (1996). Efeito de dois genótipos de *Lycopersicon* spp. associados aos entomopatógenos *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e *Beauveria bassiana* no desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lep., Gelechiidae). PhD Thesis. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo Sao Paulo.
- Giustolin, T. A., Vendramim, J. D., Alves, S. B. y Vieira, S. A.** (2001a). Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) criada em dois genótipos de tomateiro. *Neotropical Entomology*, (30), 417-421.

- Giustolin, T. A., Vendramim, J. D., Alves, S. B., Vieira, S. A. y Pereira, R. M.** (2001b). Susceptibility of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep, Gelechiidae) reared on two species of *Lycopersicon* to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Journal of Applied Entomology*, (125), 551–556.
- González-Cabrera, J. y Ferré, J.** (2008) Bacterias Entomopatógenas. In: Jacas, J. y Urbaneja, A. (eds.) *Control biológico de plagas agrícolas. Phytoma/España*, 1. Valencia, 85-97.
- González-Cabrera, J., Mollá Hernández, O. y Urbaneja García, A.** (2009). Control biológico de "*Tuta absoluta*" (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) con *Bacillus thuringiensis* (Berliner). *Agrícola vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura*, (333), 476-480.
- González-Cabrera, J., Mollá, O., Montón, H., y Urbaneja, A.** (2011). Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) in controlling the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *BioControl*, 56(1), 71-80.
- Grandison, R. C., Piper, M. D., y Partridge, L.** (2009). Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature*, 462(7276), 1061-1064.
- Gutiérrez-Giulianotti, L.** (2010). Programa de IPM Certis para el control de *Tuta absoluta*. *Phytoma España : La revista profesional en sanidad vegetal*, (217), 60-65.
- Haji, F. N. P., Prezotti, L., Carneiro, J. D. S. y Alencar, J. A. D.** (2002). *Trichogramma pretiosum* para controle de pragas no tomateiro

industrial. In: Parra, J. R. P., Botelho, P. S. M., Ferreira, B. S. C. y Bento, J. M. S. (eds.) *Controle biológico no Brasil: Parasitóides e predadores*. Manole Ltda. São Paulo, 477-494.

Hawkins, B. A., Cornell, H. V. y Hochberg, M. E. (1997). Predators, parasitoids, and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations. *Ecology*, (78),2145-2152.

Hilker, M. y Meiners, T. (2002). Induction of plant responses to oviposition and feeding by herbivorous arthropods: a comparison. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 104(1), 181-192.

Hislop, R. G. y Prokopy, R. J. (1981). Mite predator responses to prey and predator-emitted stimuli. *Journal of Chemical Ecology*, 7(5), 895-904.

Koppert B.S. (2012). <http://www.koppert.es/noticias/mas-noticias/detalle/nesidiocoris-en-semillero-se-consolida-como-alternativa-en-tomate/>

Krebs, C. J. (1999). *Ecological methodology* (p. 620). Menlo Park: Addison Wesley Longman.

Lara, L., Salvador, E. y Téllez, M. M. (2010). Estudios de control biológico de la polilla del tomate *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera; Gelechiidae) en cultivos hortícolas de invernadero del Sureste Español. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, 221- 39.

- Larraín, P. S. (1986).** Total mortality and parasitism of *Dineulophus phtorimaeae* (De Santis) in tomato moth larvae, *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick). *Agricultura Técnica (Chile)*, (46), 227-228.
- Larraín, P. (1987).** Plagas del tomate, primera parte: Descripción, fluctuación poblacional, daño, plantas hospederas, enemigos naturales de las plagas principales. *IPA La Platina*, (39), 30-35.
- Larraín, P. (2001).** Polilla del tomate y su manejo integrado. *Informativo n 1 INIA Intihuasi. (On line)*.
- Lietti, M. M. M., Botto, E. y Alzogaray, R. A. (2005).** Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology*, (34), 113-119.
- López, E. (1991).** Polilla del tomate: Problema crítico para la rentabilidad del cultivo de verano. *Empresa y Avance Agrícola*, (1), 6-7.
- López, J. M., Martín, L., López, A., Correia, R., González, F., Sanz, E., Gallardo, M. y Cantus, J. M. (2010).** AFFIRM (Emamectina), una nueva arma contra la *Tuta absoluta* y otras orugas de lepidópteros. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (217), 90-94.
- Lucas, E. y Alomar, O. (2002).** Impact of *Macrolophus caliginosus* presence on damage production by *Dicyphus tamaninii* (Heteroptera: Miridae) on tomato fruits. *Journal of Economic Entomology*, 95(6), 1123-1129.

- Luna, M. G., Sanchez, N. E. y Pereyra, P. C.** (2007). Parasitism of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) by *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera, Braconidae) under laboratory conditions. *Environmental Entomology*, (36), 887-893.
- Lundgren, J.G. y Wiedenmann, R. N.** (2004). Nutritional suitability of corn pollen for the predator *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Insect Physiology*, (50), 567-575.
- Mackauer, M.** (1983). Quantitative assessment of *Aphidius smithi* (Hymenoptera: Aphidiidae): fecundity, intrinsic rate of increase, and functional response. *Canadian Entomologist*, (115), 399-415.
- MAGRAMA. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.** (2012). Anuario de estadística. <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/> (Acceso 03/12/2012).
- Marchiori, C. H., Silva, C. G. y Lobo, A. P.** (2004). Parasitoids of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) collected on tomato plants in Lavras, state of Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 64(3A), 551-552.
- Mascarin, G. M., Alves, S. B., Rampelotti-Ferreira, F. T., Urbano, M. R., Demetrio, C. G. B. y Delalibera, I.** (2010). Potential of a granulovirus isolate to control *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *BioControl*, (55), 657-671.

- McGregor, R. R. y Gillespie, D. R.** (2004). Olfactory responses of the omnivorous generalist predator *Dicyphus hesperus* to plant and prey odours. *Entomologia experimentalis et applicata*, 112(3), 201-205.
- Medeiros, M. A. de., Sujii, E. R. y Morais, H. C.** (2009). Effect of plant diversification on abundance of South American tomato pinworm and predators in two cropping systems. *Horticultura Brasileira*, (27), 300-306.
- Messelink, G. J., Maanen, R. V., van Steenpaal, S. E. y Janssen, A.** (2008). Biological control of thrips and whiteflies by a shared predator: Two pests are better than one. *Biological control*, 44(3), 372-379.
- Messelink, G. J., Sabelis, M. W. y Janssen, A.** (2012). Generalist predators, food web complexities and biological pest control. In: Larramendy ML, Soloneski S (Eds), *Greenhouse Crops, Integrated Pest Management and pest control - current and future tactics*. InTech, Rijeka, Croatia.
- Miranda, M. M. M., Picanço, M., Zanuncio, J. C. y Guedes, R. N. C.** (1998). Ecological life table of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Biocontrol Science and Technology*, 8(4), 597-606.
- Miranda, M. M. M., Picanço, M. C., Zanuncio, J. C., Bacci, L. y Silva, da E. M.** (2005). Impact of integrated pest management on the population of leafminers, fruit borers, and natural enemies in tomato. *Ciencia Rural*, (35), 204-208.

Michereff, M., Vilela, E. F., Jham, G. N., Attygalle, A., Svatos, A. y Meinwald, J. (2000a). Initial studies of mating disruption of the tomato moth, *Tuta absoluta* (Lepidoptera : Gelechiidae) using synthetic sex pheromone. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, (11), 621-628.

Michereff, M., Vilela, E. F., Attygalle, A. B., Meinwald, J., Svatos, A. y Jham, G. N. (2000b). Field trapping of tomato moth, *Tuta absoluta* with pheromone traps. *Journal of Chemical Ecology*, (26), 875-881.

Moayeri, H. R. S., Ashouri, A., Brødsgaard, H. F. y Enkegaard, A. (2006). Odour-mediated preference and prey preference of *Macrolophus caliginosus* between spider mites and green peach aphids. *Journal of Applied Entomology*, 130(9-10), 504-508.

Mollá, O., Montón, H., Beitia, F. y Urbaneja, A. (2008). La polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick), una nueva plaga invasora. *Terralia*, (69), 3-42.

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

- Mollá, O., Alonso-Valiente, M., Montón, H., Beitia Crespo, F. J., Verdú, M. J., González-Cabrera, J. y Urbaneja García, A.** (2010). Control Biológico de *Tuta absoluta*: catalogación de enemigos naturales y potencial de los míridos depredadores como agentes de control. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (217), 42-47.
- Mollá, O., González-Cabrera, J. y Urbaneja, A.** (2011). The combined use of *Bacillus thuringiensis* and *Nesidiocoris tenuis* against the tomato borer *Tuta absoluta*. *BioControl*, (56), 883-891.
- Monserat, A.** (2009a). La polilla del tomate *Tuta absoluta* en la Región de Murcia: bases para su control. *Conserjería de Agricultura y Agua, Murcia*.
- Monserat, A.** (2009b). Medidas básicas para el manejo de la polilla del tomate *Tuta absoluta*. *Agrícola Vergel. Fruticultura, horticultura, floricultura*, (333), 481-491.
- Monserat, A.** (2010). Estrategias globales en el manejo de *Tuta absoluta* en Murcia. *Phytoma España: La revista profesional en sanidad vegetal*, 81-86.
- Monserat, A.** (2012). Aplicaciones de las feromonas sexuales para el manejo de plagas de lepidópteros en cultivos hortícolas. *Agrícola Vergel, Fruticultura, horticultura, floricultura*, (356), 148-153.

- Naranjo, S. E. y Gibson, R. L.** (1996). Phytophagy in predaceous Heteroptera: effects on life history and population dynamics. *Zoophytophagous Heteroptera: implications for life history and integrated pest management*, 57-93.
- Navarro-Llopis, V., Alfaro, C., Vacas, S. y Primo, J.** (2010). Aplicación de la confusión sexual al control de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae). *Phytoma España : La revista profesional en sanidad vegetal*, 32-34.
- Nicolaus, B., Romijn, C. y Bowers, L.** (2005) Ecotoxicological profile of the insecticide Oberon. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, (58), 353–370.
- Niedmann, L. L. y Meza-Basso, L.** (2006). Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como una alternativa de manejo integrado de la polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) en Chile. *Agricultura Técnica*, (66), 235-246.
- Nordlund, D. A. y Legaspi, J.C.** (1996). Whitefly predators and their potential for use in biological control. In: Gerling D, Mayer RT, editors. *Bemisia 1995: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management*. 499-513. Andover, Hants, UK: Intercept Ltd.
- Oatman, E. R. y Platner, G. R.** (1989). Parasites of the potato tuberworm, tomato pinworm and other closely related Gelechiids. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*, (29), 23-30.

- Ortega, F., Astor, E. y De Scals, D.** (2008). El control de la polilla, *Tuta absoluta*. *Horticultura Internacional*, (64), 30-31.
- Parra, J. R. P. y Zucchi, R. A.** (2004). *Trichogramma* in Brazil: Feasibility of use after twenty years of research. *Neotropical Entomology*, (33), 271-281.
- Paula, S. V. d., Picanço, de M. C., Oliveira, I. R. y Gusmao, M. R.** (2004). Control of tomato fruit borers by surrounding crop strips. *Bioscience Journal*, (20), 33-39.
- Perdikis, D. C. y Lykouressis, D. P.** (2002). Life table and biological characteristics of *Macrolophus pygmaeus* when feeding on *Myzus persicae* and *Trialeurodes vaporariorum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 102(3), 261-272.
- Perdikis, D., Lucas, E., Garantonakis, N., Giatropoulos, A., Kitsi, P., Maselou, D., Panagakis, S., Paraskeropoulos, A., Lykouressis, D. y Fantinou, A.** (2009). Intraguild predation between *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis*. *IOBC/ WPRS Bulletin*, (49), 301-305.
- Pina, T., Argolo, P. S., Urbaneja, A. y Jacas, J. A.** (2012). Effect of pollen quality on the efficacy of two different life-style predatory mites against *Tetranychus urticae* in citrus. *Biological Control*, (61), 176-183.
- Polack, A.** (2007). Perspectivas para el control biológico de la polilla del tomate. *Horticultura Internacional*, (60), 24-27.

- Purcell M. F. y Schroeder, W. J.** (1996). Effect of Silwet L-77 and diazinon on three tephritid fruit flies (Diptera: Tephritidae) and associated endoparasitoids. *Journal of Economic Entomology*, (89), 1566–1570.
- Robles, J. L.** (2010). FENOS: nuevo insecticida de Bayer Cropscience para el control de *Tuta absoluta*. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (217), 87-89.
- Robredo, F. y Cardeñoso, J.M.** (2008). Estrategias contra la polilla del tomate, *Tuta absoluta*, Meyrick. *Agricultura*, (903), 70-74.
- Rodríguez, M., Gerding, M. y France, A.** (2006). Effectivity of entomopathogenic fungus strains on tomato moth *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae. *Agricultura Técnica*, (66), 159-165.
- Rodriguez-Saona, C., Crafts-brandner, S. J., Williams, L., III, y Paré, P. W.** (2002). *Lygus hesperus* feeding and salivary gland extracts induce volatile emissions in plants. *Journal of Chemical ecology*, (28), 1733-1747.
- Rodriguez-Saona, C., Crafts-Brandner, S. J. y Cañas, L. A.** (2003). Volatile emissions triggered by multiple herbivore damage: beet armyworm and whitefly feeding on cotton plants. *Journal of Chemical ecology*, 29(11), 2539-2550.
- Rojas, S.** (1981). Control de la polilla del tomate: enemigos naturales y patógenos. *IPA La Platina*, (8), 18-20.

- Salas, J.** (2001). Insectos plagas del tomate. Manejo integrado, Maracay. *Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro de Investigaciones Agropecuarias del estado Lara. (Serie B-Nº1)*, 102 pp.
- Salazar, E. R. y Araya, J. E.** (1997) Detección de resistencia a insecticidas en la polilla del tomate. *Simiente*, (67), 8-22.
- Sánchez, J. A., Martínez-Cascales, J. I. y Lacasa, A.** (2003). Abundance and wild host plants of predator mirids (Heteroptera: Miridae) in horticultural crops in the Southeast of Spain. *Bulletin OILB/ SROP*, (26), 147-151.
- Sánchez, J. A. 2008.** Zoophytophagy in the plantbug *Nesidiocoris tenuis*. *Agricultural and Forest Entomology*, (10), 75-80.
- Sánchez, J. A. y Lacasa, A.** (2008). Impact of the zoophytophagous plant bug *Nesidiocoris tenuis* (Heteroptera: Miridae) on tomato yield. *Journal of economic entomology*, 101(6), 1864-1870.
- Sánchez, J. A.** (2009). Density thresholds for *Nesidiocoris tenuis* (Heteroptera: Miridae) in tomato crops. *Biological Control*, 51(3), 493-498.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. y Dean, D. H.** (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Review*, (62), 775–806.

- Sengonca, C. y Liu, B.** (1994). Responses of the different instar predator, *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae), to the kairomones produced by the prey and non-prey insects as well as the predator itself. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 101.
- Shipp, J. L. y Wang, K.** (2006). Evaluation of *Dicyphus hersperus* (Heteroptera: Miridae) for biological control of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) on greenhouse tomato. *Journal of economic entomology*, 99(2), 414-420.
- Siqueira, H. A. A., Guedes, R. N. C. y Picanco, M. C.** (2000). Cartap resistance and synergism in populations of *Tuta absoluta* (Lep., Gelechiidae). *Journal of Applied Entomology*, (124), 233-238.
- Siqueira, H. A. A., Guedes, R. N. C., Fragoso, D. B. y Magalhaes, L. C.** (2001). Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera : Gelechiidae). *International Journal of Pest Management* 47, 247-251.
- SPSS Inc IBM Company.** 2010. IBM® SPSS® Statistic for Windows®. version 19.0.0, New York.
- Stansly, P. A., Sanchez, P. A., Rodriguez, J. M., Canizares, F., Nieto, A., Leyva, M. J. L., Fajardo, M., Suarez, V. y Urbaneja, A.** (2004) Prospects for biological control of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in greenhouse tomatoes of southern Spain. *Crop Protection*, (23), 701-712.

- Stark, J. D. y Banks, J. E.** (2003). Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annual Review of Entomology*, (48), 505-519.
- Stoltman, L., Mafra-Neto, A., Borges, R. y Zeni, D.** (2010). Pheromone tools for early detection and control of the invasive tomato leafminer, *Tuta absoluta*. *Entomological Society of America 58th Annual Meeting* paper 49615., <http://esa.confex.com/esa/2010/webprogram/Paper49615.html>- (Acceso 12/02/2011).
- Symondson, W. O. C., Sunderland, K. D. y Greenstone, M. H.** (2002). Can generalist predators be effective biocontrol agents? *Annual Review of Entomology*, (47), 561-594.
- Tapia, G., Ruiz, M. A., Navarro, D., Lara, L. y Telléz, M. M.** (2010). Estrategia de gestión de residuos vegetales en el control de *Tuta absoluta*. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (217), 124-125.
- Theoduloz, C., Vega, A., Salazar, M., González, E. y Meza-Basso, L.** (2003). Expression of a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin *cry1Ab* gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains that naturally colonize the phylloplane of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*, Mills). *Journal of Applied Microbiology*, (94), 375-381.
- Thompson, S. N.** (1999). Nutrition and culture of entomophagous insects. *Annual Review of Entomology*, (44), 561-592

- Torné, M., Martín, A. y Fernández, J.** (2010). Spintor 480SC: eficacia natural. *Phytoma España : La revista profesional de sanidad vegetal*, (217), 27-31.
- Tumlinson, J. H., Lewis, W. J., y Vet, L. E. M.** (1993). How parasitic wasps find their hosts. *Scientific American*, (268), 100–106.
- Uchoa-Fernandez, M., Della Lucia, T. y Vilela, E.** (1995). Mating, oviposition and pupation of *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, (24), 159-164.
- Urbaneja, A., Tapia, G., Fernández, E., Sánchez, E., Contreras, J., Gallego, A. y Bielza, P.** (2003). Influence of the prey on the biology of *Nesidiocoris tenuis* (Hem.: Miridae). *OILB/ SROP Bulletin* (26), 159.
- Urbaneja, A. y Stansly, P. A.** (2004). Host suitability of different instars of the whitefly *Bemisia tabaci* "biotype Q" for *Eretmocerus mundus*. *Biocontrol*, (49), 153-161.
- Urbaneja, A. Tapia, G. y Stansly, P.** (2005). Influence of host plant and prey availability on developmental time and survivorship of *Nesidiocoris tenuis* (Het.: Miridae). *BioScience and Technology*, (15), 513-518.
- Urbaneja, A., Vercher, R., Navarro Llopis, V., y García Marí, F.** (2007). La polilla del tomate, "*Tuta absoluta*". *Phytoma Espana: La revista profesional de sanidad vegetal*, (194), 16-23.

- Urbaneja, A., Montón, H., Vanaclocha, P., Mollá, O., y Beitia, F. J.** (2008). La polilla del tomate, "*Tuta absoluta*", una nueva presa para los míridos "*Nesidiocoris tenuis*" y "*Macrolophus pygmaeus*". *Agrícola vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura*, 27(320), 361-367.
- Urbaneja, A., Montón, H. y Mollá, O.** (2009). Suitability of the tomato borer *Tuta absoluta* as prey for *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis*. *Journal of Applied Entomology*, 133(4), 292-296.
- Urbaneja, A., Gonzalez-Cabrera, J., Arno, J. y Gabarra, R.** (2012). Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. *Pest Management Science*, (68), 1215-1222.
- Urbaneja-Bernat, P., Alonso-Valiente, M., Tena, A., Bolckmans, K. y Urbaneja, A.** (2013). Sugar as nutritional supplement for the zoophytophagous predator *Nesidiocoris tenuis*. *BioControl in press* Doi:10.1007/s10526-012-9466-
- van der Blom, J., Robledo, A., Torres, S. y Sánchez, 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. y Woets, J.** (1988). Biological and integrated pest control in greenhouses. *Annual Review of Entomology*, (33), 239-269.
- van Lenteren, J. C.** (2012). The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl*, (57), 1-20.

- Vandekerkhove, B. y De Clercq, P.** (2010). Pollen as an alternative or supplementary food for the mirid predator *Macrolophus pygmaeus*. *Biological Control*, (53), 238-242.
- Vargas, H.** (1970). Observaciones sobre la biología y enemigos naturales de la polilla del tomate. *IDESIA, Universidad del Norte (Chile)*, (1), 75-110.
- Velden, N, van der, Suay, R., Urbaneja, A., Giorgini, M., Ruocco, M., Poncet, C. y Lefèvre, A.** (2011). Recent developments and market opportunities for IPM in greenhouse tomatoes in southern Europe; Consequences for advanced IPM toolboxes and greenhouse engineering. LEI Memorandum
- Zappalà, L., Biondi, A., Siscaro, G., Tropea Garzia, G., Achterberg, K., y Desneux, N.** (2011). Adaptation of indigenous parasitoids to the invasive tomato pest *Tuta absoluta* in Italy: biology and behaviour of the braconid wasp *Bracon nigricans*. In *Proc. EPPO/IOBC/FAO/NEPPO Joint International Symposium on management of Tuta absoluta (Tomato borer)* (pp. 29-30).
- Zappalà, L., Siscaro, G., Biondi, A., Mollá, O., González-Cabrera, J., y Urbaneja, A.** (2012). Efficacy of sulphur on *Tuta absoluta* and its side effects on the predator *Nesidiocoris tenuis*. *Journal of Applied Entomology*, 136(6), 401-409.

Zucchi, R. A., Querino, R. B. y Monteiro, R. C. (2010). Diversity and hosts of *Trichogramma* in the New World, with emphasis in South America. In: Cõnsoli, F. L., Parra, J. R. P. and Zucchi, R. A. (eds.) *Egg Parasitoids in Agroecosystems with emphasis on Trichogramma*. Springer. Dordrecht, 219-236.



