

**Universidad Nacional de La Plata**  
**Facultad De Ciencias Naturales y Museo**

**Efectos letales y subletales de insecticidas sobre**  
***Bemisia tabaci* y su principal parasitoide**  
***Eretmocerus mundus* e impacto**  
**sobre aspectos comportamentales del mismo**

**Tesis Doctoral**

**Lic. Natalia Francesena**

Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE)  
(CCT La Plata - CONICET - UNLP)

Directora: Dra. Marcela Inés Schneider

Co-director: Dr. Teodoro Stadler

**2015**

## *Agradecimientos*

- ❖ *Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, por haber financiado el doctorado a través del otorgamiento de las becas que me permitieron desarrollar mis investigaciones.*
- ❖ *A la Dra. Marcela Schneider, mi directora de tesis y al Dr. Teodoro Stadler, mi co-director de tesis, por brindarme su experiencia en lo referente a estos estudios.*
- ❖ *A los miembros del jurado por sus valiosos aportes ya que han enriquecido la versión final de esta tesis doctoral.*
- ❖ *Al Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) por brindarme lugar de trabajo. A la Dirección Dras. Alda González y Graciela Navone, al personal administrativo (Aníbal y Gastón), técnicos (Guillermo, Emilio y Jorge) y a los colegas de los demás laboratorios.*
- ❖ *A mis compañeros de laboratorio, los de ahora y los de antes, que directa o indirectamente me brindaron su ayuda.*
- ❖ *A mis padres, Liliana y Sergio y a mi hermana Maricel, por todo su cariño, afecto y por alentarme a seguir adelante.*
- ❖ *A mis hermosos sobrinos Juan Andrés, Francisco y Delfina, a mi ahijado Tomás y a “Copito” por alegrarme tanto.*
- ❖ *A mi amiga Mel, por ser incondicional conmigo siempre.*
- ❖ *Al Grupo de los “Biologos”, Mariana, Romina, Aldana, Lucia, Alvaro y Guille por todo el apoyo, el aguante, la buena onda y la colaboración desinteresada. En especial gracias Aldi por apoyarme y ayudarme tanto en este último y tormentoso tiempo.*

- ❖ *A mi amiga Marianela y a las familias Barbonetti, Comasco y Laurencena, con los cuales la “Chica Verde” compartió alegrías, tristezas y un montón de momentos inolvidables. Gracias por todo su cariño estos años y siempre.*
- ❖ *A Naty y Almita gracias por estar conmigo siempre a pesar de la distancia.*
- ❖ *A Yayi gracias por tantas charlas, mates calentitos, contención, consejos y la ayuda de siempre y más especialmente durante esta etapa.*
- ❖ *A mis amigos de siempre, quienes han sido, son y serán imprescindibles para crecer en esta vida.*
- ❖ *A todos los que de forma directa o indirecta me han ayudado a superar los obstáculos surgidos durante estos años.*
- ❖ *A la Biología que hace años elegí y me apasiona.*

## Índice

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	8
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>12</b>
1.1 La Agricultura en la República Argentina y la Producción Hortícola.....	13
1.2 Plagas agrícolas.....	15
1.2.1 Plagas asociadas a los Cultivos Hortícolas.....	16
1.3 Control de plagas.....	17
1.3.1 Control Químico.....	18
1.3.1.1 Insecticidas biorracionales.....	20
1.3.1.1a Neonicotinoides.....	21
1.3.1.1 b Insecticidas reguladores del crecimiento de los insectos.....	21
1.3.1.1 c Inhibidores de la síntesis de lípidos.....	22
1.3.1.1 d Botánicos.....	22
1.3.1.2 Control de plagas en el Cinturón Hortícola Platense.....	23
1.3.2 Control Biológico.....	24
1.3.2.1 Enemigos Naturales.....	25
1.4 Manejo Integrado de Plagas.....	26
1.5 Plagas suscopadoras.....	27
1.5.1 <i>Bemisia tabaci</i> (mosca blanca).....	28
1.5.1.1 Sistemática y descripción morfológica.....	28
1.5.1.2 Distribución geográfica.....	30
1.5.1.3 Daños e importancia económica.....	30
1.5.1.4 Control.....	31
1.6 Los himenópteros parasitoides y el control de plagas.....	31
1.6.1 <i>Eretmocerus mundus</i> Mercet.....	32
1.6.1.1 Sistemática y descripción morfológica.....	32
1.6.1.2 Distribución geográfica.....	34
1.6.1.3 Importancia económica.....	34
1.7 Importancia de los estudios ecotóxicológicos sobre los organismos benéficos.....	35
<b>CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
2.1 Hipótesis general.....	37
2.2 Objetivo general.....	37
2.3 Objetivos específicos.....	37

<b>CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES</b> .....	38
3.1 Metodología de recolección de organismos a campo.....	39
3.1.1 Recolección de <i>Bemisia tabaci</i> .....	40
3.1.2 Recolección de <i>Eretmocerus mundus</i> .....	41
3.2 Cría y mantenimiento de organismos para los estudios de laboratorio.....	41
3.2.1 Cría y mantenimiento de <i>B. tabaci</i> .....	41
3.2.2 Cría y mantenimiento de <i>E. mundus</i> .....	42
3.3 Condiciones generales de cría de insectos y ensayos de toxicidad.....	44
3.4 Metodología general de preparación y aplicación de los insecticidas objeto de estudio.....	44
3.4.1 Preparación de soluciones de insecticidas.....	44
3.4.2 Metodología general de exposición a insecticidas.....	45
3.5 Esquema de la metodología utilizada para la evaluación de la toxicidad de insecticidas sobre el parasitoide <i>E. mundus</i> y su huésped <i>B. tabaci</i> en condiciones de laboratorio.....	47
3.6 Análisis estadístico.....	47
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	48
4. Evaluación de la toxicidad de acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat sobre ninfas de segundo estadio de <i>Bemisia tabaci</i> .....	48
4.1 Introducción.....	49
4.2 Materiales y Métodos.....	49
4.2.1 Obtención del material para los bioensayos de toxicidad.....	49
4.2.2 Bioensayos.....	50
4.2.3 Análisis estadístico.....	53
4.3 Resultados.....	53
4.4 Discusión.....	57
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	62
5. Estudios ecotóxicológicos de los efectos secundarios de acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat sobre pupas de <i>Eretmocerus mundus</i> .....	62
5.1 Introducción.....	63
5.2 Materiales y Métodos.....	64
5.2.1 Bioensayos.....	64
5.2.2 Análisis estadístico.....	67
5.3 Resultados.....	68
5.4 Discusión.....	77

---

<b>CAPÍTULO 6</b> .....	82
6- Estudios ecotóxicológicos de los efectos secundarios de acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat sobre adultos de <i>Eretmocerus mundus</i> .....	82
6.1 Introducción.....	83
6.2 Materiales y Métodos.....	84
6.2.1 Obtención de adultos para los bioensayos de ecotoxicidad.....	84
6.2.2 Bioensayos.....	84
6.2.2.1 Bioensayo de toxicidad sobre adultos del parasitoide <i>E. mundus</i> .....	84
6.2.2.2 Bioensayos de efectos a largo plazo a nivel comportamental en adultos del parasitoide <i>E. mundus</i> .....	86
6.2.2.3 Bioensayo de efectos a largo plazo sobre la demografía del parasitoide <i>E. mundus</i> .....	91
6.2.3 Análisis estadístico.....	92
6.3 Resultados.....	95
6.4 Discusión.....	111
<b>CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES</b> .....	119
<b>APÉNDICE I: Producción Científica</b> .....	123
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	126

## Resumen

El control biológico de plagas mediante enemigos naturales (parasitoides, depredadores y entomopatógenos) es una de las estrategias de control que promueve en sus premisas el Manejo Integrado de Plagas (MIP). En los últimos años ha habido un incremento sobre la importancia económica de estos enemigos en la agricultura y de las restricciones de los métodos tradicionales de control a través del uso de plaguicidas. En este sentido, el empleo de enemigos naturales para el control biológico de plagas ha aumentado considerablemente a nivel mundial, a través de la importación de especies (control biológico clásico y neoclásico), el control biológico aumentativo o por conservación. El control biológico por conservación es la técnica más implementada en países en vías de desarrollo, a través de la reducción en el uso de plaguicidas y del manejo del hábitat.

Sin embargo, el control químico a través del uso de plaguicidas (fungicidas, insecticidas y herbicidas) sigue siendo la estrategia de control más utilizada, principalmente en la Región Neotropical y particularmente en Argentina. Frente a la compatibilización de estrategias en el marco del MIP, el estudio de la selectividad de los plaguicidas es relevante.

La evaluación de la selectividad de los plaguicidas hacia organismos benéficos contempla el estudio de los efectos secundarios. Dentro de los efectos secundarios de los plaguicidas sobre los enemigos naturales, los efectos subletales son los que han adquirido mayor importancia en los últimos años, ya que consideran como parámetros de evaluación ecotoxicológica aquellos relacionados con el rol de los enemigos naturales en la reducción de los niveles poblacionales de las plagas en los cultivos. En este sentido, la ecotoxicología moderna considera que no solo la mortalidad debería ser considerada como único punto final de evaluación. Atributos tales como el tiempo de desarrollo, fecundidad, fertilidad y comportamiento así como los parámetros demográficos, son de suma importancia, ya que influyen sobre el desempeño de los enemigos naturales como agentes de control biológico de plagas.

*Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae), es un microhimenóptero endoparásitoide de la mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) plaga de importancia económica a nivel mundial por sus daños directos y por ser vector de virus fitopatógenos. Uno de los principales problemas para el establecimiento del parasitoide en las zonas de cultivo es la alta contaminación con plaguicidas. Dentro de los ambientes agrícolas los sistemas hortícolas bajo cubierta o "protegidos" muestran un alto disturbio ecológico. Los insecticidas de amplio espectro son los responsables en gran parte de este disturbio, cuyo uso indiscriminado ha reducido la diversidad de organismos asociados a los cultivos, principalmente los benéficos.

El objetivo principal de esta tesis fue evaluar los efectos ecotoxicológicos letales y subletales de insecticidas convencionales y biorracionales sobre *B. tabaci* y su principal parasitoide *E. mundus*, a fin de establecer estrategias de control que minimicen el impacto de plaguicidas sobre organismos no blanco. Los resultados de estos estudios servirán a futuro para la implementación de programas de MIP en cultivos hortícolas.

Para evaluar los efectos de los insecticidas de uso habitual en cultivos bajo cubierta del Cinturón Hortícola Platense (CHP, noreste de la provincia de Buenos Aires, Argentina) sobre el parasitoide *E. mundus* y su huésped se realizó la puesta a punto de métodos de bioensayos de toxicidad, seguido de la posterior aplicación para estudiar a nivel ecotoxicológico el impacto de cinco insecticidas de amplio uso en la

región para el control de plagas suscopificadoras (cipermetrina, acetamiprid, piriproxifén, azadiractina y spirotetramat). El material biológico para los estudios se obtuvo a partir de muestreos en invernáculos pertenecientes al CHP con bajo uso de plaguicidas y/o cultivos orgánicos. A partir de este se establecieron las colonias de organismos en laboratorio de donde se obtuvieron los individuos para los ensayos de toxicidad. Los bioensayos de laboratorio se realizaron sobre distintos estados de desarrollo del parasitoide (pupa y adulto), considerando un estado protegido (desarrollado dentro del huésped) y un estado de vida libre. La exposición de los insectos a los diferentes productos comerciales de los insecticidas seleccionados para la evaluación se realizó utilizando diferentes vías de exposición: contacto por inmersión, contacto residual a través de superficies tratadas y contacto a través del huésped contaminado, evaluando las máximas concentraciones recomendadas para su uso a campo (MCRC), y en algunos casos también concentraciones menores.

**Evaluación de la toxicidad de acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat sobre ninfas de segundo estadio de *Bemisia tabaci*:** los ensayos de evaluación de insecticidas sobre las ninfas de segundo estadio (estadio preferido por el parasitoide *E. mundus* para la oviposición) se realizaron utilizando la vía de exposición por contacto a través de la vía de inmersión. Se evaluaron las MCRC así como concentraciones menores para cada uno de los productos. Todos los insecticidas redujeron la supervivencia de las ninfas de segundo estadio de *B. tabaci*. Azadiractina y spirotetramat mostraron un mayor efecto provocando una elevada disminución en la supervivencia, tanto a la MCRC como en concentraciones que se encuentran por debajo de ella. El valor de  $CL_{50}$  para spirotetramat fue muy cercano a la MCRC. Los insecticidas neurotóxicos cipermetrina y acetamiprid y el IGR piriproxifén dejaron una mayor proporción de ninfas supervivientes, mostrando que estas son menos susceptibles a estos insecticidas. También estos tres insecticidas tuvieron valores de  $CL_{50}$  superiores a la MCRC. Adicionalmente se realizaron ensayos para evaluar la toxicidad de la MCRC de spirotetramat en huevos (tratamiento por inmersión) y sobre el comportamiento de oviposición en adultos (tratamiento residual - superficies tratadas - hojas de pimiento) de *B. tabaci*. No se observó efecto ovicida para este insecticida. Además tampoco se observaron efectos letales ni en la fase móvil ni en la fase sésil del primer estadio ninfal 24 h después de la fijación. Sin embargo, se observó una mortalidad del 100 % en este estadio a las 96 h postratamiento. En la evaluación sobre el comportamiento de oviposición de hembras de *B. tabaci* se observó que la misma fue escasa o casi nula en la mayoría de las hojas en todas las franjas horarias observadas. El efecto disuasorio de la oviposición fue > 90 %.

**Estudios ecotóxicológicos de los efectos secundarios de acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat sobre pupas de *Eretmocerus mundus*:** los ensayos de evaluación de la toxicidad de insecticidas sobre pupas se realizaron utilizando la vía de exposición por contacto a través de la metodología de inmersión. Se evaluaron las MCRC y la mitad de la misma para cada uno de los productos sobre dos estados morfológicos bien diferenciados (pupa 48 h de edad y pupa donde se observa el adulto farado) dentro del desarrollo pupal de *E. mundus*. El porcentaje de emergencia y la longevidad de los adultos emergentes del parasitoide dependieron del tipo de tratamiento realizado y del estado morfológico expuesto. Todos los insecticidas con excepción de spirotetramat provocaron una disminución en la emergencia y en la longevidad de los adultos emergidos. El mayor porcentaje de emergencia y de longevidad se obtuvo en las pupas tratadas en el estado



de adulto farado. Se observaron efectos subletales teratológicos (malformaciones) en las pupas tratadas con cipermetrina, acetamiprid, azadiractina y piriproxifén. El desarrollo normal durante el periodo intermuda pupa-adulto fue modificado por todas las concentraciones de los insecticidas evaluados. Conjuntamente con la evaluación del efecto directo o a corto plazo de los cinco insecticidas sobre el estado de pupa también fueron evaluados los efectos subletales de tres de ellos, azadiractina, cipermetrina y spirotetramat, sobre la capacidad reproductiva de hembras sobrevivientes al tratamiento con insecticidas. Azadiractina afectó el parasitismo efectivo (acumulado durante 5 días consecutivos), el porcentaje de emergencia y la longevidad de la progenie. Cipermetrina tuvo efecto sobre el parasitismo efectivo y la longevidad de la progenie. Spirotetramat no mostró ningún efecto perjudicial sobre la capacidad reproductiva de las hembras, solo se observó una disminución en la longevidad de la progenie.

**Estudios ecotoxicológicos de los efectos secundarios de acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat sobre adultos de *Eretmocerus mundus*:** en los ensayos de evaluación de insecticidas sobre adultos se evaluaron los efectos letales (supervivencia) y subletales (capacidad reproductiva en hembras y patrones de comportamiento) de las MCRC y diluciones de la misma de acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat. Se prestó especial atención a los efectos subletales que los insecticidas anteriormente mencionados tenían sobre el comportamiento del parasitoide. Adicionalmente se estudió el posible efecto del insecticida spirotetramat sobre parámetros demográficos (tasa intrínseca de crecimiento poblacional  $r$ , tasa reproductiva neta  $R_0$  y tiempo generacional  $T$ ) de *E. mundus*. Para la evaluación de los efectos letales se utilizó una metodología de exposición residual por medio de superficie tratada (vidrio–hoja). Todos los insecticidas evaluados disminuyeron la supervivencia adulta de *E. mundus*. Cipermetrina fue el insecticida más tóxico y spirotetramat el menos tóxico. La superficie de exposición que mostró un mayor efecto sobre la longevidad adulta fue la hoja vegetal. La evaluación de los efectos subletales se llevó a cabo a través de la realización de diferentes tipos de bioensayos. Se midió el efecto de la MCRC del insecticida spirotetramat y el efecto de la mitad de la MCRC de los insecticidas acetamiprid, azadiractina, cipermetrina y piriproxifén sobre la capacidad reproductiva de hembras sobrevivientes al tratamiento residual en vidrio. Ninguno de los insecticidas evaluados incidió sobre el parasitismo efectivo. Azadiractina, cipermetrina y piriproxifén redujeron el porcentaje de emergencia de la progenie en el primer día de exposición al huésped. Al finalizar los cinco días de exposición, acetamiprid y piriproxifén fueron diferentes respecto del control. La proporción de sexos no fue significativamente diferente del control para todos los insecticidas evaluados en el primer día de exposición al huésped. Al finalizar los cinco días de exposición cipermetrina provocó un sesgo hacia la proporción de machos cercano al 92%. Acetamiprid, azadiractina y piriproxifén disminuyeron la longevidad en la progenie. Conjuntamente a estos ensayos se realizaron bioensayos comportamentales para seguir evaluando los efectos subletales de los insecticidas. Se utilizaron diferentes vías de exposición (residual y contacto por inmersión) y se evaluaron los posibles tipos de respuestas que podían manifestar los adultos del parasitoide frente a residuos de insecticidas y el impacto de estos sobre los mecanismos de cópula, búsqueda del huésped, oviposición y parasitismo. Las respuestas encontradas para el comportamiento frente a residuos de insecticidas fueron variadas: inhibición de la alimentación, aumento de la frecuencia de los mecanismos de aseo, temblores, volteo, hiperactividad; observándose una elevada susceptibilidad de los adultos de *E. mundus* a cuatro (acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén) de los cinco insecticidas

evaluados. Los ensayos de elección frente a huéspedes tratados y no tratados mostraron que las hembras de *E. mundus* fueron capaces de elegir las ninfas no tratadas para su parasitación. Todos los insecticidas mostraron un efecto disuasorio de la oviposición. Los bioensayos de cópula mostraron que el tiempo que tardaba el macho en encontrar a la hembra y la posición de este con respecto a la hembra en el momento de la cópula se vieron afectados por los insecticidas acetamiprid y azadiractina. El tiempo de duración de la cópula solo fue diferente del control para el insecticida azadiractina. Los ensayos de oviposición y parasitismo realizados con las hembras del parasitoide *E. mundus* mostraron que todos los insecticidas, con excepción de spirotetramat, retardaron el encuentro con el huésped y modificaron la secuencia normal de comportamientos seguidos al encuentro del mismo y previos a la oviposición. Los bioensayos demográficos realizados con el insecticida spirotetramat demostraron que este afectó los parámetros demográficos: tasa intrínseca de crecimiento poblacional  $r$ , tasa reproductiva neta  $R_0$  y tiempo generacional  $T$ , observándose una disminución en los mismos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente tesis, el segundo estadio ninfal de *B. tabaci* fue susceptible a los diferentes grupos de insecticidas evaluados. El insecticida azadiractina resultó ser el más tóxico y piriproxifén el menos tóxico.

El estado de desarrollo de pupa de *E. mundus* no representaría un estado de protección a xenobióticos como los insecticidas, aun siendo un endoparasitoide, ya que este estado fue muy susceptible a cuatro (acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén) de los cinco insecticidas evaluados. Para el insecticida spirotetramat, no se observaron efectos nocivos (letales ni subletales) sobre el estado de pupas del parasitoide en condiciones de laboratorio. La inocuidad del insecticida azadiractina, ampliamente utilizado en producción orgánica, es discutida de acuerdo a estos estudios, aunque debería ser corroborada en campo, como asimismo analizada su persistencia.

El estado adulto de *E. mundus* fue también altamente susceptible hacia los insecticidas acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y en menor medida hacia spirotetramat. La supervivencia fue drásticamente afectada por cipermetrina y en menor medida por spirotetramat. La capacidad reproductiva de las hembras sobrevivientes a los tratamientos con los diferentes insecticidas evaluados mostró que el parasitismo efectivo fue el único parámetro que no se vio afectado por la acción de los insecticidas. Los efectos subletales de los insecticidas evaluados a nivel comportamental mostraron que cuatro (acetamiprid, azadiractina, cipermetrina y piriproxifén) de los cinco insecticidas evaluados afectaron el desempeño normal tanto de los machos como de las hembras del parasitoide en los comportamientos asociados a los mecanismos de cópula, búsqueda del huésped, oviposición y parasitismo. Spirotetramat afectó los parámetros demográficos del parasitoide reduciendo la tasa intrínseca de crecimiento poblacional  $r$ , la tasa reproductiva neta  $R_0$  y el tiempo generacional  $T$ , con implicancias en el crecimiento poblacional de la especie.

## Abstract

Biological control of pests by natural enemies (parasitoids, predators and entomopathogens) is one of the control strategies that promotes Integrated Pest Management (IPM). In recent years, there has been an increase in the economic importance of natural enemies in agriculture at expenses of reducing traditional control methods based on the use of chemical pesticides. Hence, the use of natural enemies for the control of insect pests has greatly increased worldwide through the importation of species (classical and neoclassical biological control), as well as the augmentation and conservation of spontaneously occurring natural enemies in crops. Conservation biological control is the most implemented strategy in developing countries, achieved by the reduction of the use of chemical pesticides and habitat management practices.

Despite the advent of biological control, chemical control through the use of pesticides (fungicides, insecticides and herbicides) is still the main pest control strategy of pest control today, mainly in the Neotropical Region, and particularly in Argentina. In view of trends towards the joint use of pest control strategies under the IPM concept, the assessment of pesticide selectivity on beneficials becomes a relevant issue.

The assessment of pesticide selectivity to beneficial organisms includes research on sublethal pesticide side-effects, a topic that has assumed greater importance in recent years since it takes into account ecotoxicological evaluation parameters. From this perspective, modern ecotoxicology considers that not only mortality should be considered a single endpoint for toxicity assessment on beneficials, but also further features such as developmental time, fecundity, fertility, behavior and demographic parameters, which are paramount because these also rule the performance of natural enemies as agents of biological pest control.

*Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) is a main microhymenopteran parasitoid of the whitefly, *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae). Whitefly populations produce economically important damage to crops worldwide by their direct feeding and also by transmitting plant viruses. One of the major problems in settlement of beneficials in cropping areas is the high levels of pesticide contamination. Also, horticultural crops under "protected" systems show high ecological disturbance due to indiscriminate use of broad-spectrum insecticides, which significantly accelerates the loss of biodiversity, mainly on beneficial species.

The main objective of this Thesis was to evaluate the lethal and sublethal ecotoxicological effects of conventional and biorational insecticides on *B.tabaci* and its major parasitoid *E. mundus*, in order to establish control strategies to minimize the impact of pesticides on non-target organisms. The results of these studies can help to design and implement Integrated Pest Management (IPM) programs in horticultural crops.

Five insecticides (cypermethrin, acetamiprid, pyriproxyfen, azadirachtin and spirotetramat) widely used in under cover crops in the horticultural belt that surrounds La Plata city, Buenos Aires province, Argentina, were selected to assess their toxicity and side effects on the parasitoid *E. mundus* and its host *B.tabaci*. The biological material for the studies was obtained from the collection of samples in greenhouses containing low-pressure pesticide and/or organic crops. Collected organisms were established in laboratory and reared for toxicity testing. Laboratory bioassays were conducted on different developmental stages of the parasitoid (pupa and adult), focusing on a protected stage (developing inside the host's body) and a free-living stage. The exposure of insects to the selected commercial products was performed throughout

dipping, residual contact-bioassays treated surfaces and hosts, by using the maximum recommended concentrations (MRFC) and lower.

**Evaluation of the toxicity of acetamiprid, azadirachtin, cypermethrin, pyriproxyfen and spirotetramat on the second stage nymphs of *Bemisia tabaci*:** toxicity bioassays of the insecticides on nymphs (N2, stage preferred by the parasitoid *E. mundus* for oviposition) were performed by using dipping test. MRFC and lowest concentrations for each product were assessed. Results show that all insecticides tested reduce the survival of *B. tabaci* nymphs of the second stage. Azadirachtin and spirotetramat showed a greater negative effect on nymphal survival both MRFC and concentrations below. The  $LC_{50}$  value for spirotetramat was very close to the MRFC. The neurotoxic insecticide cypermethrin and acetamiprid as well as the IGR pyriproxyfen allowed a higher surviving ratio of nymphs, showing that they are less susceptible to the products at the concentrations tested. Also, these three insecticides showed higher  $LC_{50}$  values for MRFC. Further, tests were conducted to evaluate the toxicity of MRFC spirotetramat on eggs (dipping test) and oviposition behavior in adults (surface treatment - residual - pepper leaves) of *B. tabaci*. No ovicidal effects were observed in bioassays with spirotetramat. Furthermore, lethal effects were not observed either in the mobile phase or in the sessile phase first instars nymphal of *B. tabaci* after fixation (24 h). However, the mortality of this stage was reached 100% at 96 h post-treatment. The evaluation on oviposition behavior of *B. tabaci* females was observed that it was low or almost zero in most of the leaves in all slots observed. The deterrent effect on oviposition was > 90 %.

**Ecotoxicological studies on the side effects of acetamiprid, azadirachtin, cypermethrin, spirotetramat and pyriproxyfen on *Eretmocerus mundus* pupae:** toxicity assessments of insecticides on *E. mundus* pupae were performed using dipping test. The MRFC and the half for each of the products were evaluated on two distinct morphological states (pupa 48 h old and pupa where the adult farado is observed) within the pupal development of *E. mundus*. The percentage of emergency and longevity of adult parasitoids emerging depended on the type of treatment performed (factor one) and exposed morphological state (factor two). All insecticides tested, except spirotetramat, origin a decrease in the emergency and longevity of emerged adults. The highest percentage of emergency and longevity was obtained treated in the pupa where the adult farado is observed. Sublethal effects were observed as teratological effects (malformations) in pupae treated with cypermethrin, acetamiprid, azadirachtin and pyriproxyfen. The development during the intermolt period was interrupted by all insecticides. Beside the evaluation of the direct effect or short-term effect of the five insecticides tested on the *E. mundus* pupal stage, sublethal effects of azadirachtin, cypermethrin and spirotetramat on the reproductive capacity of surviving females were evaluated. Azadirachtin showed a greater negative effect on effective parasitism (accumulated for 5 consecutive days) and the percent emergence and longevity of the progeny. Cypermethrin show a slight effect on the effective parasitism and longevity of progeny. Spirotetramat did not show detrimental effects on the reproductive capacity of the females, only a decrease in longevity of progeny was observed.

**Ecotoxicological studies on the side effects of acetamiprid, azadirachtin, cypermethrin, spirotetramat and pyriproxyfen on *Eretmocerus mundus* adults:** lethal (survival) and sublethal effects (reproductive capacity in females, behavior patterns) of MRFC and the half for each product were evaluated in adults treatments. Special attention was given to the sublethal effects that the insecticides had on

parasitoid behavior. Additionally, the possible effect of the spirotetramat on demographic parameters (intrinsic rate of increase  $r$ , net reproductive rate  $R_0$  and generation time  $T$ ) of *E. mundus* was studied. Residual exposure through surface treated methodology (glass-leaf) was used in assessing the lethal effects. All insecticides tested reduced the adult survival of *E. mundus*. Cypermethrin was the most toxic insecticide and spirotetramat the least toxic. The exposition area that showed a greater effect was the leaves circles. Evaluation of sublethal effects was carried out through the implementation of various types of bioassays. The effect of the MRFC of spirotetramat and the effect of the half the MRFC of acetamiprid, azadirachtin, cypermethrin and pyriproxyfen on reproductive capacity of surviving females of residual treatment in glass were evaluated. None of the insecticides affects the effective parasitism. Azadirachtin, pyriproxyfen and cypermethrin reduced the percentage of emergence of progeny on the first day of exposure to the host. At the end of the five-day exposition, acetamiprid and pyriproxyfen they were different compared to the control. The sex ratio was not significantly different from control for all insecticides tested on the first day of exposure to the host. At the end of five-days of exposure, cypermethrin caused a bias close to the proportion of 92% males. Acetamiprid, azadirachtin and pyriproxyfen decreased progeny longevity. Along with these trials, behavioral assays were performed to further evaluate the sublethal effects of insecticides. Different exposure pathways (residual and dipping) were used, and different types of responses that the adult parasitoids could manifest against insecticide residues and the impact of these on the copulation and oviposition mechanisms and host searching were evaluated. Behavioral responses found against insecticide residues were varied: feeding inhibition, increase of frequency of grooming, tremors, knock-down and hyperactivity, showing that *E. mundus* adults are sensitive to four (acetamiprid, azadirachtin, cypermethrin, pyriproxyfen) of the five insecticides evaluated. Choice tests with treated and untreated hosts showed that females of *E. mundus* were able to choose untreated nymphs for parasitism. All insecticides showed an oviposition deterrent effect. Mating bioassays showed that the time it took the male to find the female and the position of this with respect to the female at the time of mating were affected by insecticides acetamiprid and azadirachtin. The duration of mating was only different from control for insecticidal azadirachtin. Oviposition and parasitism assays made with the females of the parasitoid *E. mundus* showed that all insecticides, except spirotetramat, delay the meeting with the host and modify the normal sequence of behaviors to meet the same row and pre-oviposition. Demographic bioassays with spirotetramat showed that this affects demographic parameters, intrinsic rate of increase  $r$ , net reproductive rate  $R_0$  and generation time  $T$  causing a decrease in them.

According to the results obtained in this thesis, the second nymphal stage of *B. tabaci* was susceptible to different groups of insecticides evaluated. Azadirachtin was the most toxic and pyriproxyfen the least toxic.

The developmental state of *E. mundus* "pupa" does not represent a state of protection to xenobiotic such as insecticides, even as a endoparasitoid; since this state was very susceptible to four (acetamiprid, azadirachtin, cypermethrin, pyriproxyfen) of five insecticides evaluated. The safety of azadirachtin insecticide widely used in organic production, is discussed according to these studies but should be confirmed in the field, and its persistence should be analyzed.

The adult stage of *E. mundus* was also highly susceptible to the acetamiprid, azadirachtin, cypermethrin, pyriproxyfen and to a lesser extent spirotetramat. Survival was drastically affected by cypermethrin and spirotetramat to a lesser extent. The reproductive capacity in surviving females showed that the effective parasitism was the

only parameter that was not affected by the action of insecticides. Sublethal effects of insecticides evaluated at the behavioral level showed that four (acetamiprid, azadirachtin, cypermethrin, pyriproxyfen) of the five insecticides evaluated affected the normal performance of both males and females of the parasitoid in the behaviors associated with the mechanisms of copulation, host searching and oviposition. Spirotetramat affected demographic parameters of the parasitoid, reducing its intrinsic rate of increase  $r$ , net reproductive rate  $R_0$  and generation time  $T$ , with implications for the population growth of the species.

# **CAPÍTULO 1: “Introducción general”**

## **CAPÍTULO I: Introducción general**

Durante muchos años, la agricultura tradicional se ha basado en un modelo netamente productor fundado en la maximización de la ganancia en el corto plazo y despreocupado de las exigencias de protección del ambiente. La agricultura sostenible surge como una alternativa a este modelo, abogando por una producción agraria de largo plazo que considere a la variable ambiental como un factor tan importante como la tierra, el capital o el trabajo. La aplicación de este modelo productivo requiere de una Gestión Agraria Integrada, que permita un nivel de producción capaz de abastecer los mercados, mantener los precios al alcance de los consumidores, una adecuada calidad de los productos y la preservación del ambiente como una fuente importante del recurso (Girbal Blacha, 2001).

### **1.1 La Agricultura en la República Argentina y la Producción Hortícola**

La Agricultura constituye uno de los pilares de la economía argentina desde fines del siglo XIX, tanto por la exportación de materias primas como por el crecimiento de las empresas relacionadas con la Agroindustria en respuesta a la demanda del sector (Girbal Blacha, 2001). Durante el pasado siglo se podía reconocer una regionalización del país a partir de su producción agraria: cereales y forrajes (además de ganado vacuno de alta mestización) eran y son típicos en la región pampeana; vitivinicultura en el Oeste cuyano; caña de azúcar en el Noroeste; quebracho y algodón en la región del Nordeste argentino y fruticultura en los valles patagónicos. Si bien en la actualidad esta regionalización continúa existiendo, en los últimos años, el avance de las técnicas de cultivo intensivo, junto con la demanda creciente de ciertas especies cultivadas (soja, trigo, maíz) por parte del mercado internacional y el aumento de las ganancias asociadas a dichos cultivos, ha llevado a la disminución de esta tendencia, debido al desplazamiento de cultivos regionales (algodón, maíz, frutales, etc); cambios de actividades productivas (tambos) y desmonte de ecosistemas para incorporarlos a la actividad agrícola intensiva (yungas, bosques chacosalteños, etc) (Girbal Blacha, 2001; Zunino, 2007).

En el país, el área agrícola cultivada es de 30.524.814 hectáreas. Se estima que el área ocupada con cultivos comerciales de hortalizas es de aproximadamente 600.000 hectáreas, las que generan una producción aproximada de 10.500.000 toneladas (Colamarino *et al.*, 2006). El 93 % de la producción hortícola se destina al mercado



interno (40 % del área metropolitana) y el 7 % restante se exporta generando U\$S 206 millones en el año 2005 (INDEC, 2005).

Dentro de la provincia de Buenos Aires, se localiza en el Noreste el Cinturón Hortícola Platense (**CHP**), rodeando la ciudad de La Plata y comprendiendo el área de mayor envergadura del Cinturón Hortícola Bonaerense.

Este último abastece de verduras frescas a uno de los núcleos poblacionales más densos de la Argentina, Ciudad Autónoma de Buenos Aires y el Conurbano Bonaerense, el cual fue estimado en 11 millones de personas (Cieza, 2004). El CHP cuenta con un área de 7.538 ha cultivadas, de las cuales 4.677 ha corresponden a invernáculos<sup>1</sup> y 2.861 ha a cielo abierto (CFHB, 2005). Entre sus principales cultivos se destacan lechuga (*Lactuca sativa* L Asteraceae), tomate (*Solanum lycopersicum* L Solanaceae), apio (*Apium graveolens* L Apiaceae) y pimiento (*Capsicum annuum* L Solanaceae) (**Tabla 1.1**).

**Tabla 1.1** Cultivos hortícolas del Cinturón Hortícola Platense.

Especie	Superficie cultivada (has)		
	Invernáculo	Cielo abierto	Total
Acelga	45	356	401
Alcaucil		306	306
Apio	1175	70	1245
Berenjena	265	25	290
Brócoli		106	106
Calabaza		91	91
Cebolla de verdeo		65	65
Chaucha		40	40
Choclo		165	165
Coliflor		58	58
Escarola		21	21
Espinaca	318	130	448
Haba		12	12
Hinojo		32	32
Lechuga (mantecosa)	1466	900	2366
Pepino	86	10	96
Perejil	13	50	63
Pimiento	303	25	328
Puerro		37	37
Rabanito	5	45	50
Remolacha	5	45	50
Repollo de bruselas		13	13
Repollo blanco		102	102
Tomate cherry	32		32
Tomate perita	130	40	170
Tomate redondo	840	150	990
<b>Total</b>	<b>4677</b>	<b>2861</b>	<b>7538</b>

Fuente: CFHB, 2005; AER INTA Gran Buenos Aires (Strassera)

<sup>1</sup> Estructuras permanentes o desmantelables de cobertura plástica, dentro del cual se desarrolla todo el ciclo del cultivo (García, 2011).

## 1.2 Plagas agrícolas

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, según sus siglas en inglés) define a las plagas como: “Cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales” (FAO, 2001). Considerando a aquellos asociados a los agroecosistemas, se consideran organismos plaga aquellos que debido a su nivel poblacional generan un daño económico en los cultivos. Este término incluye a insectos, ácaros, enfermedades ocasionadas por hongos, bacterias y virus, nematodos, caracoles y babosas. También los roedores y los pájaros pueden ser considerados plaga cuando se alimentan sobre plantas jóvenes o sobre granos almacenados y producen un daño, que hace imprescindible la intervención del hombre. De igual manera se considera plaga a las malezas que compiten por los nutrientes con los cultivos (Ware, 1983).

Las poblaciones de estos organismos se encuentran en densidades inocuas por acción de factores dependientes de la densidad, pero en determinadas ocasiones pueden crecer y superar los niveles de daño económico<sup>2</sup> y, consecuentemente, convertirse en una plaga (Mathews, 1984).

Existen dos principales hipótesis ecológicas por las que se puede explicar cómo cambios en la distribución y el tamaño poblacional de los insectos herbívoros, pueden conducir al surgimiento de una plaga; la hipótesis de la “concentración del recurso” y la hipótesis del “enemigo natural” (Root, 1973). Ambas consideran a la simplificación de los sistemas agrícolas, fundamentalmente los monocultivos, como la causa principal de la aparición de plagas desde el punto de vista ecológico (Altieri y Nicholls, 2009). Los monocultivos ofrecen a los fitófagos un recurso abundante y altamente concentrado por lo tanto los herbívoros encuentran una elevada cantidad de recurso alimenticio y una alta proporción de plantas disponibles en el estado fenológico adecuado. Además algunas prácticas como el uso de fertilizantes, plaguicidas, irrigación y el uso de variedades genéticamente homogéneas favorecen su desarrollo. En relación con la segunda hipótesis, la simplificación del hábitat lleva a una menor riqueza de especies y abundancia de enemigos naturales. Muchos de ellos son polívoros, tienen requerimientos más amplios de hábitat y los monocultivos pueden no proveerlos de fuentes alternativas de alimentación adecuada, refugio y sitios de oviposición (Greco *et al.*, 2000)

<sup>2</sup> Nivel de daño económico (NDE): Nivel poblacional del organismo en consideración a partir del cual los daños ocasionados en la producción (cultivo o almacenamiento) producen un perjuicio económico (Horn, 1988).

Las plagas agrícolas se alimentan de los cultivos y por lo tanto producen severos daños a los mismos; esto trae como consecuencia una reducción en la producción, es decir en la cosecha, como en la calidad del producto (deterioro en el aspecto) y conlleva a un incremento de costos de producción. En particular para la horticultura, existen a nivel mundial una gran variedad de artrópodos plaga que causan perjuicios (van Lenteren y Woetts, 1988).

### 1.2.1 Plagas asociadas a los Cultivos Hortícolas

Entre los artrópodos plaga relevantes en los cultivos hortícolas, principalmente los de lechuga, tomate y pimiento, sobresalen las moscas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae), los pulgones (Hemiptera: Aphididae) y los lepidópteros minadores como *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae), los cuales son considerados plagas de importancia económica a nivel mundial por los daños directos e indirectos que ocasionan comprometiendo la productividad de los cultivos (Cáceres, 2004; Polack, 2008; Desneux *et al.*, 2010).

Entre las moscas blancas, las más importantes son la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* Westwood y la mosca blanca del tabaco *Bemisia tabaci* Gennadius (Viscarret, 2000a). A partir de la década del 90', con el auge de los cultivos protegidos, las moscas blancas se transformaron en las plagas principales en estos cultivos, siendo necesario su control (Cáceres, 2004, 2005).

Si bien *T. vaporariorum* ha sido considerada la especie más frecuente en cultivos hortícolas bajo cubierta, hoy en día el panorama es distinto desde la aparición de *B. tabaci* en el año 2001 en el Nordeste Argentino (NEA) y en el 2004 en el CHP (Cáceres, 2004; Polack, 2005, 2008). Esta especie ha adquirido mayor relevancia por los daños directos que ocasiona y por ser difícil su control (Strassera, 2006), pero fundamentalmente por ser vector de virus de mayor importancia económica (Begomovirus: Geminiviridae) que los que transmite *T. vaporariorum*.

Con respecto a los pulgones (Hemiptera: Aphididae), existen más de 4.000 especies en el mundo, 173 de las cuales fueron descritas en Argentina (Delfino, 1994; Nieto-Nafría *et al.*, 1994), algunas de ellas asociadas a cultivos hortícolas.

Existen especies polífagas (*Myzus persicae* Sulzer) y otras más especialistas (*Brevicoryne brassicae* L). Los daños directos que producen son: clorosis, marchitamiento, senescencia precoz, deformaciones, agallas y disminución del crecimiento de las plantas (Delfino *et al.*, 2007). En cuanto a los daños indirectos, son

vectores importantes de virus fitopatógenos, entre ellos los de la familia Potviridae, que provocan una reducción en los rendimientos y contribuyen al desarrollo de fumagina que se desarrolla sobre sus excreciones azucaradas que resta capacidad fotosintética a la planta y valor comercial a los frutos.

Entre los artrópodos claves del cultivo de tomate sobresale la polilla del tomate, *T. absoluta* (Cáceres *et al.*, 1984, 1995), originaria de Perú y de distribución Neotropical, la cual ha tomado mayor relevancia como plaga cuarentenaria<sup>3</sup> desde su detección en Europa en el año 2006, causando graves daños en los cultivos de tomate y en otras hortalizas (Desneux *et al.*, 2010). Esta especie es un minador, cuya larva una vez dentro del tejido de hojas (mesófilo), tallos y frutos, se alimenta haciendo galerías y minas irregulares, las cuales posteriormente se necrosan. Esto provoca daños importantes por la pérdida de capacidad fotosintética de la planta, y en ataques severos pueden comprometer a los frutos, disminuyendo el rendimiento del cultivo (Estay, 2000; Luna *et al.*, 2012).

### 1.3 Control de plagas

Desde que el hombre se convirtió en agricultor se vio en la necesidad de combatir las plagas que atacan a sus cultivos, cuyos daños se ven reflejados en la merma en sus cosechas. Debido a esto, las plagas figuran entre uno de los factores limitantes para la agricultura, su desarrollo masivo en pocas horas puede destruir cultivos o cosechas completas. Según estimaciones de la FAO, las pérdidas económicas en los cultivos, ocasionadas por plagas, fluctúan entre un 20 y 40 %, variando en magnitud de acuerdo a la región, año, tipo de cultivo y plaga considerada ([www.fao.org](http://www.fao.org)).

Para combatir las plagas, se utilizan diferentes estrategias de control que se tratan de compatibilizar o usar en conjunto para maximizar su eficiencia.

Entre las estrategias se puede citar el control cultural (cultivos trampa, rotación de cultivos, cultivos intercalados, borduras de vegetación espontánea, entre otras), control filogenético (variedades resistentes y cultivos genéticamente modificados), control químico (uso de plaguicidas selectivos), control biológico (a través de empleo de enemigos naturales), control autocida (técnica del macho estéril) y control etológico (uso de semioquímicos, feromonas y aleloquímicos). Todos afectan el comportamiento de la plaga, modificando su desempeño (Sarandón, 2002; van Driesche *et al.*, 2007).

<sup>3</sup> Plaga de importancia económica potencial para el área en peligro aun cuando la plaga no existe o, si existe, no está extendida y se encuentra bajo control oficial (SENASA, 1997).

### 1.3.1 Control Químico

La industria de los plaguicidas<sup>4</sup> comienza a partir de la Segunda Guerra Mundial (1940). En los comienzos de la misma, los plaguicidas se limitaban a varios arsenicales, aceites de petróleo, nicotina, piretro, rotenona, azufre, gas de cianuro de hidrógeno, y criolita entre otros. Durante el final de la guerra y en los comienzos de la post-guerra, se inicia la *Era de la Química Moderna* con la introducción de los insecticidas orgánicos sintéticos (Krämer y Schirmer, 2007). El primer producto sintetizado fue el DDT (para-diclorodifeniltricloroetano) perteneciente al grupo de insecticidas organoclorados, cuyo uso permitió inicialmente combatir los insectos vectores de enfermedades que afectaban a las tropas, pero rápidamente (después de la guerra) se extendió para el control de plagas agrícolas y del ganado. El DDT revolucionó la agricultura, proporcionando a los agricultores herramientas altamente efectivas para proteger a sus cultivos.

Sin embargo, no tuvo que pasar mucho tiempo para que los insectos comenzaran a hacerse resistentes y su empleo comenzó a decaer hacia el año 1960; una década más tarde su uso fue prohibido en Estados Unidos y otros países industrializados por su elevada toxicidad en organismos no blanco como aves (Spiro y Stigliani, 2004).

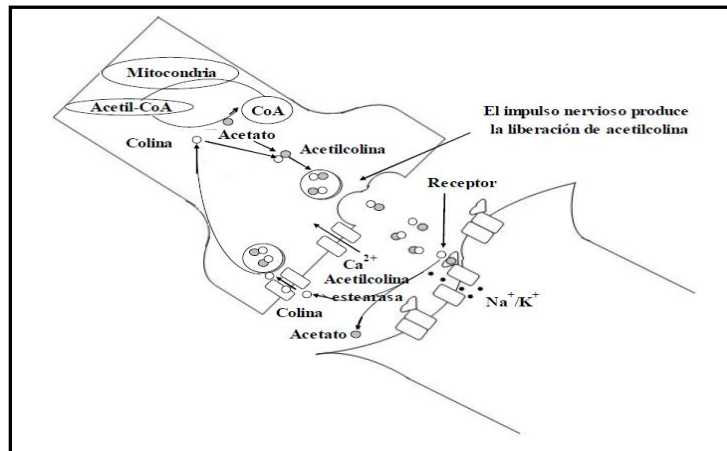
Hacia el año 1947 se incorporaron al mercado nuevos grupos de plaguicidas como los organofosforados (OPs), seguidos por los carbamatos (1957), y los piretroides (1965). Estos plaguicidas forman parte del grupo de los hoy llamados “plaguicidas convencionales”<sup>5</sup>.

*Insecticidas Organofosforados (OPs)*: Incluye todos los plaguicidas que contienen fósforo. Todos los organofosforados son ésteres del ácido fosfórico y tienen diferentes combinaciones de oxígeno, carbono, azufre y nitrógeno ligados, generalmente son los más tóxicos de todos los plaguicidas para los vertebrados. Estos compuestos son químicamente inestables, por lo que son menos persistentes en los sistemas y, debido a esta característica, se los utilizó en reemplazo de los organoclorados. Actúan inhibiendo ciertas enzimas importantes del sistema nervioso, particularmente la acetilcolinesterasa (AChE), impidiendo la separación de la acetilcolina en colina y acetato. Esta inhibición resulta en la acumulación de acetilcolina (ACh) en las uniones o sinapsis neurona/neurona y neurona/músculo (neuromuscular), causando contracciones rápidas de los músculos voluntarios y finalmente parálisis, llevando a la muerte (**Figura 1.1**).

<sup>4</sup> Sustancias químicas que han sido diseñadas para controlar las plagas y pueden ser de origen sintético o natural (Ware, 2004).

<sup>5</sup> Plaguicidas sintéticos, de amplio espectro, actúan principalmente sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) de los insectos (Ware, 2004).

De este grupo sobresalen el **paratión** y el **malatión** (hoy aún en uso en cebos para el control de la Mosca del Mediterráneo), entre otros (Ware, 2004).



**Figura 1.1:** Esquema de la síntesis, acción y degradación de la acetilcolina (tomado y adaptado de Chapman, 1998).

*Insecticidas Carbamatos:* Los carbamatos son derivados del ácido carbámico y de igual manera que los OPs, su modo de acción es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Hay dos cualidades particulares que han hecho que los carbamatos sean tan utilizados: su baja toxicidad oral y dermal para mamíferos y su espectro de acción excepcionalmente amplio para control de insectos. Los carbamatos que han entrado más recientemente al mercado incluyen **pirimicarb**, **indoxacarb** (registrado en el 2000), **alanicarb** y **furatiocarb** (Ware, 2004).

*Insecticidas Piretroides:* Los piretroides son un grupo de plaguicidas sintéticos desarrollados para controlar las poblaciones de insectos plaga. Este grupo surgió como un intento por parte del hombre de simular los efectos insecticidas de las piretrinas naturales obtenidas de las flores del crisantemo, que se venían usando desde 1850. La obtención de piretrinas sintéticas se produce en 1949 con la fabricación de la aletrina, considerado piretroide de primera generación. A lo largo de los años la síntesis de los piretroides ha tenido una evolución interesante pasando por cuatro generaciones distintas. La cuarta y actual generación de piretroides sintéticos se caracteriza por ser fotoestables, es decir, que en presencia de luz solar no sufren fotólisis. Como tienen baja volatilidad ofrecen una efectividad residual extendida. A esta última generación pertenecen las materias activas **cipermetrina**, **deltametrina**, **esfenvalerato**, **zeta-cipermetrina** entre otras (Stenersen, 2004). Los piretroides afectan tanto el sistema nervioso central como el periférico del insecto, actúan a nivel de los canales axónicos de sodio ( $\text{Na}^+$ ) permitiendo la entrada excesiva del ión, provocando la excitación continua

de la membrana del axón, descargas repetitivas y eventualmente parálisis. Existen dos tipos de piretroides: Tipo I (carentes de grupo alfa ciano en su molécula) y II (poseen el grupo alfa ciano en su molécula). Los compuestos de tipo I inducen picos múltiples de descargas en los nervios sensoriales y en los nervios motores y en las interneuronas dentro del sistema nervioso central. Los compuestos de tipo II despolarizan el potencial de las membranas de los axones, esto reduce la amplitud del potencial de acción y lleva a la pérdida de excitabilidad eléctrica; son más estables y más tóxicos que los tipo I (Ware, 2004).

### 1.3.1.1 *Insecticidas biorracionales*

El uso indiscriminado de plaguicidas de amplio espectro ha traído aparejado graves problemas de contaminación del suelo, agua y atmósfera. En lo que se refiere a los organismos de control natural de las plagas, los enemigos naturales, se ha producido una reducción de la biodiversidad de la fauna benéfica y por otro lado los riesgos de toxicidad hacia el agricultor y el consumidor son relevantes (EPA, 2011).

En los últimos 20 años se han incorporado nuevas materias activas, que se conocen bajo la denominación de “insecticidas de nueva generación”. Estas presentan varias ventajas en relación a los insecticidas convencionales, baja toxicidad para los mamíferos, actividad más específica hacia las plagas, mayor selectividad hacia los organismos benéficos, menor impacto sobre el ambiente. Estas características los hacen más compatibles con los enemigos naturales, permitiendo que sean utilizados en los programas de Manejo Integrado de Plagas (**MIP**) (Devine y Furlong, 2007).

Dentro de los insecticidas biorracionales se encuentran los insecticidas reguladores del crecimiento de los insectos, los inhibidores de la síntesis de lípidos, los moduladores de la rianodina (neurotransmisor) y los bioplaguicidas (de origen natural y botánicos). Los neonicotinoides que aparecen en el mercado en la década del 90' fueron considerados por la EPA (USEPA, Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica-[www.epa.org](http://www.epa.org)) como biorracionales, sin embargo hoy en día es discutida su selectividad debido a la alta toxicidad de estas materias activas sobre polinizadores (Armengaud *et al.*, 2002; Thompson, 2003; Decourtye *et al.*, 2004, 2005).

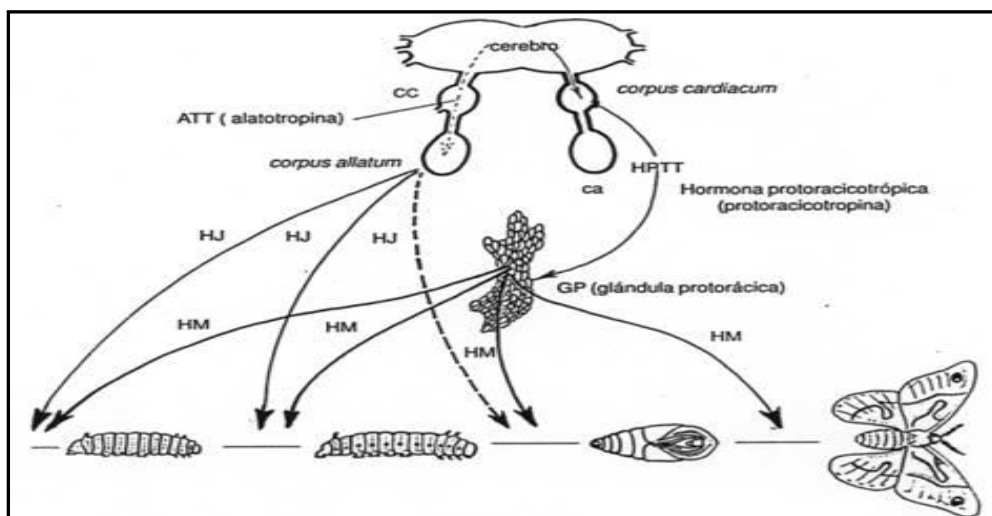
Más recientemente se están desarrollando compuestos (Cuarta Generación de Plaguicidas) a partir de técnicas de química verde (usando catalizadores eco-amigables), que podrían ser también una alternativa novedosa a los convencionales para el control

de artrópodos plaga (Romanelli *et al.*, 2010), algunos de los cuales han mostrado actividad insecticida y antialimentaria (Pérez *et al.*, 2013).

La USEPA diferencia un insecticida biorracional de uno convencional de amplio espectro por tener un modo de acción diferente, una mayor selectividad, actividad residual relativamente breve y una baja toxicidad sobre organismos no blanco y sobre el ambiente (Sullivan y Goh, 2008). Por estas características, son considerados para su uso adecuado como estrategias en los programas de MIP (Ishaaya *et al.*, 2007).

**1.3.1.1 a *Neonicotinoides*:** son un grupo de plaguicidas sintetizados a partir de la nicotina natural. Actúan sobre el sistema nervioso central de los insectos, causando un bloqueo irreversible de los receptores postsinápticos nicotérgicos de la ACh. Los neonicotinoides son considerados una de las herramientas principales para el control de plagas succionadoras como moscas blancas y pulgones (Elbert *et al.*, 1998). A este grupo pertenecen las siguientes materias activas: **imidacloprid, acetamiprid, tiametoxan y tiacloprid**. Sin embargo la inclusión de estos compuestos en programas de MIP, es muy discutida hoy en día. En el caso del imidacloprid su uso fue restringido y en algunos casos prohibido en muchos cultivos, debido a su alta toxicidad para abejas y otros polinizadores (Mommaerts *et al.*, 2010).

**1.3.1.1 b *Insecticidas reguladores del crecimiento de los insectos (IGRs)*:** son compuestos químicos de origen sintético que actúan alterando el crecimiento y desarrollo de los insectos de dos maneras: a) inhibiendo la formación de quitina; b) imitando la hormona juvenil (**HJ**) y la hormona de la muda (**HM**) (**Figura 1.2**).



**Figura 1.2:** Control endocrino de la metamorfosis en un insecto (tomado y adaptado de Chapman, 1998).  
ATT: alatotropina, HPTT: hormona protoracicotrópica, cc: cuerpos cardíacos, ca: cuerpos alados, HJ: hormona juvenil, HM: hormona de la muda, GP: glándula protorácica.



a) *Inhibidores de la síntesis de la quitina*<sup>6</sup>: A ésta clase de insecticidas pertenecen las benzoilureas, que actúan sobre los estados larvales de la mayoría de los insectos inhibiendo o bloqueando la síntesis de quitina, una parte vital del exoesqueleto de los insectos, ocasionando ruptura de la cutícula malformada y/o la deshidratación, provocando así muerte de los organismos. A este grupo pertenecen las materias activas **teflubenzurón, hexaflumurón, novalurón**, entre otros.

b) *Miméticos de la hormona juvenil y la hormona de la muda*<sup>7</sup>: Estos compuestos son análogos de la HJ y de la HM (ecdisona) respectivamente. Los miméticos de la HJ o juvenoides actúan imitando la hormona, produciendo en estadios inmaduros, estadios superlarvarios e impidiendo que el insecto llegue al estado adulto. También pueden interferir en el normal desarrollo reproductivo. Por otro lado, los miméticos de la HM actúan imitando a la hormona ecdisona, produciendo alteraciones que interfieren en el normal desarrollo del proceso de la muda del insecto. Inducen la muda anticipada y letal.

Varios IGRs han sido registrados entre los que se encuentran **metopreno, hidropreno, kinopreno, fenoxicarb, buprofezín y piriproxifén**. Este último es un juvenoide efectivo para una amplia variedad de insectos, pero particularmente es útil para los complejos de mosca blanca y en el medio acuático para control de mosquitos.

**1.3.1.1 c Inhibidores de la síntesis de lípidos:** son compuestos químicos derivados del ácido tetrónico que actúan alterando la biosíntesis de lípidos, inhibiendo la enzima acetil-CoA carboxilasa que cataliza la formación de malonil-CoA, paso fundamental en la síntesis de ácidos grasos. A este grupo pertenecen las siguientes materias activas: **spirodiclofem, spiromesifem y spirotetramat**.

**1.3.1.1 d Botánicos:** son insecticidas naturales, productos tóxicos derivados de extractos botánicos y aceites esenciales de plantas con diferentes modos de acción. Dentro de estos se destacan el piretro, la rotenona, la nicotina, la rianodina, y la **azadiractina** entre otros. Este último insecticida se obtiene de las semillas del árbol de neem, es un nortriterpenoide que pertenece a los limonoides, actúa como un regulador

<sup>6</sup> La quitina es uno de los componentes principales del exoesqueleto de los artrópodos (arácnidos, crustáceos, insectos), es un polisacárido compuesto de unidades de N-acetilglucosamina (exactamente, Nacetil - D - glucos - 2 -amina) (Chapman, 1998).

<sup>7</sup> El crecimiento de los insectos comprende distintas etapas, las cuales están gobernadas por sustancias hormonales. La HM presenta una estructura esteroideal y es secretadas por las glándulas protorácicas. La función de esta hormona es desencadenar los procesos de la muda, inducidos por una alta concentración de ecdisona en la hemolinfa que provoca la renovación total del exoesqueleto. La HJ se produce en unas pequeñas glándulas denominadas corpora allata. Durante el período larvario, la HJ es la encargada de retener las características inmaduras (juveniles) de la larva. La concertación de la HJ en la hemolinfa es mayor en los estadios tempranos de la larva y disminuye al final a un nivel mínimo al final del periodo de pupa. Una vez que la HJ desaparece de la circulación se produce la muda imaginal y se desarrolla el adulto. La concentración de esta hormona vuelve a aumentar en el estado adulto reproductivamente activo (Chapman, 1998).

del crecimiento interfiriendo en el sistema hormonal del insecto y tiene un amplio espectro de actividad (antialimentario, repelente, fungicida).

### 1.3.1.2 Control de plagas en el Cinturón Hortícola Platense

El control de plagas en la Argentina y específicamente en los cultivos hortícolas, se realiza casi exclusivamente a través del Control Químico, mediante el empleo de plaguicidas (insecticidas, fungicidas y herbicidas), prevaleciendo el uso de los plaguicidas convencionales de amplio espectro (organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides) (CASAFE, 2013), con alrededor de 30 aplicaciones durante el ciclo del cultivo en tomate (*S. lycopersicum*) y en forma semanal en pimiento (*C. annuum*).

La frecuencia de los tratamientos depende del tipo de cultivo y del sistema de cultivo (bajo cubierta o a cielo abierto), pero en general no se realizan rotaciones entre grupos de plaguicidas (**Tabla 1.2**). Debido a esto, dentro de los ambientes agrícolas, los sistemas hortícolas, principalmente los “bajo cubierta” o “protegidos” son sin duda los que muestran un alto disturbio ecológico (Botto *et al.*, 1998; Strassera, 2007).

**Tabla 1.2.** Plaguicidas asociados a la producción hortícola del CHP, NE prov. Bs As, Argentina.

Nivel de uso de plaguicidas	Insecticidas	Fungicidas	Herbicidas
Sistémico (uso generalizado más de una vez por ciclo de siembra en presencia de adversidad o no adversidad)	Deltametrina Endosulfan	Macozeb Productos cúpricos Zineb	
Muy frecuente (en presencia de adversidad, más de una vez por ciclo)	Clorfenapir Imidacloprid Metamidofós	Azoxistrobina Captan Carbendazim	Trfluralin
Frecuente (se aplican al menos una vez por ciclo de siembra si es que aparece la adversidad)	Abamectina Aldicarb Carbofuran Cipermetrina Clorpirifos Dimetoato Lambdacialotrina Spinosad	Propamocarb Tebuconazole Triadimefon	Glifosato Metolacoloro Metribuzin Paraquat
Eventual (de acuerdo a preferencias del productor)	Acetamiprid Buprofesim Metomil Cartap	Azufre Clorotalonil Folpet Fosetil aluminio Kasugamicina	
Puntual (esporádicamente)	Bifentrin Carbaril	Flutriafol Epoconazole Hexaconazole	Pcb

Fuente: Cappello y Fortunato, 2008.

### 1.3.2 Control Biológico

La definición de control biológico (CB) está relacionada con el término “población”<sup>8</sup>. Todo control biológico involucra el uso, de alguna manera, de poblaciones de enemigos naturales para reducir poblaciones de plagas a densidades menores, ya sea temporal o en forma permanente. En algunos casos, las poblaciones de enemigos naturales son manipuladas para provocar un cambio permanente en las redes alimenticias relacionadas al organismo plaga. Algunos enfoques del control biológico son diseñados para reforzar las densidades de enemigos naturales al mejorar sus condiciones de vida (van Driesche *et al.*, 2007).

**Control biológico clásico:** Se basa en la regulación de la población de una plaga mediante enemigos naturales exóticos importados específicamente para tal fin. Debido a que habitualmente la plaga que se desea controlar es una especie exótica que ha logrado elevar su densidad poblacional a raíz de la elevada disponibilidad de recursos, se busca introducir un enemigo natural específico, auto-reproductivo y denso-dependiente, con buena capacidad de búsqueda a fin de lograr un control permanente (van Driesche *et al.*, 2007). Dado que por definición en este tipo de control los enemigos naturales son exóticos, la evaluación de la potencialidad de un enemigo natural específico requiere de estudios de exploración del sitio de origen, un período de cuarentena luego de la introducción y previo a su liberación; y una evaluación de costos económicos y beneficios sociales luego del establecimiento. La evaluación *a priori* de este tipo de control resulta preponderante para evitar la introducción de un enemigo natural que compita con la entomofauna benéfica local.

**Control biológico de nueva asociación o neoclásico:** Este término aplica si la plaga objetivo es una especie nativa o una especie establecida de origen desconocido. En ambos casos, los enemigos naturales constituyen diferentes especies relacionadas taxonómica o ecológicamente con la plaga. Si bien en muchos casos este tipo de control es exitoso y ha producido reducciones considerables de especies plaga que poseían una comunidad de enemigos naturales poco eficientes, en otros casos se puede correr el riesgo, como en el CB clásico, de introducir un enemigo natural que compita por el nicho ecológico con otras especies. Un ejemplo relativamente reciente ha sido la introducción del depredador *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae)

<sup>8</sup> El CB contempla además otros niveles suprapoblacionales como el de metapoblaciones, comunidades y ecosistemas cuyo estudio brinda valiosa información ya sea para la implementación de liberaciones aumentativas como para la conservación de enemigos naturales (van Driesche *et al.*, 2007).

desde Asia para el control del pulgón verde del duraznero, *M. persicae*, en Argentina en el año 1986. El impacto de este depredador a nivel mundial sobre otros enemigos naturales ha sido ampliamente estudiado en Europa y Estados Unidos (van Lenteren, 2008). En Argentina, recientemente, se ha corroborado el impacto de esta especie sobre coccinélidos nativos como *Eriopis connexa* Germar (Coleoptera: Coccinellidae) (Mirande *et al.*, 2015).

**Control biológico por conservación.** Esta estrategia involucra el manejo del ambiente de forma tal de favorecer la conservación y propagación de los complejos de enemigos naturales presentes en el agroecosistema. Las técnicas de manejo deben tender a lograr una mayor disponibilidad de alimento, refugio y otros recursos dentro y fuera del cultivo (Landis *et al.*, 2000).

### 1.3.2.1 Enemigos Naturales

Los enemigos naturales son el componente básico del control biológico. Los agentes de control provienen de muchos grupos y difieren ampliamente en su biología y ecología. Los enemigos naturales comprenden parasitoides, depredadores y entomopatógenos (incluyen hongos, virus, bacterias, nemátodos y protozoarios).

**a) Parasitoides:** son insectos cuyas larvas se alimentan exclusivamente del cuerpo de otro artrópodo (su huésped), al que inevitablemente matan (van Driesche *et al.*, 2007). Los estados inmaduros de los parasitoides son los que se alimentan y desarrollan dentro de su huésped siendo los adultos de vida libre. Todos los estados de los artrópodos pueden ser parasitados. Así dependiendo del estado de desarrollo del huésped que ataquen los parasitoides, estos se pueden clasificar en: parasitoides de huevos, de larvas, de pupa y de adultos. Los parasitoides cuyas larvas se desarrollan dentro del huésped se llaman endoparasitoides y los que se desarrollan externamente son ectoparasitoides. De acuerdo a la cantidad de larvas que se desarrollan a expensas de un único huésped están los parasitoides solitarios, donde una única larva se desarrolla en un único huésped hasta la madurez, y los parasitoides gregarios, donde varias larvas se desarrollan en un único huésped hasta la madurez. La mayoría de los parasitoides pertenecen a los órdenes Diptera o Hymenoptera, unos pocos son Coleoptera, Neuroptera o Lepidoptera. Entre los aspectos relevantes de la biología del parasitoides para el control biológico se incluyen: (1) encontrar al huésped, (2) reconocer y evaluar al huésped, (3) vencer las defensas inmunológicas del huésped, (4) regular la fisiología

del huésped y (5) el tiempo de búsqueda en áreas con huéspedes (van Driesche *et al.*, 2007).

**b) Depredadores:** Los depredadores, en sentido amplio, son organismos que para su sustento, desarrollo y reproducción deben cazar y consumir a otros animales. A diferencia de los parasitoides, los artrópodos depredadores son más grandes que sus presas y requieren más de una presa individual para completar su desarrollo. Dentro del reino animal existe una gran variedad de grupos de depredadores, entre los invertebrados encontramos los insectos, arañas, ácaros, caracoles, y dentro de los vertebrados todos los grupos (peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos) incluyen especies depredadoras. Las especies más comunes de insectos depredadores de uso potencial en control biológico pertenecen a los órdenes Dermoptera, Mantodea, Hemiptera, Thysanoptera, Coleoptera, Neuroptera, Hymenoptera y Diptera (Triplehorn y Johnson, 2005), siendo Hemiptera, Coleoptera, Hymenoptera y Diptera los más importantes.

**c) Entomopatógenos:** Los patógenos de artrópodos incluyen bacterias, virus, hongos, nemátodos y protozoarios. Para comprender el valor de un patógeno dentro de un proyecto de control biológico, es necesario en primer lugar conocer la biología del patógeno. Para completar sus ciclos de vida exitosamente, la mayoría de los patógenos deben entrar en contacto con su huésped, poder entrar a su cuerpo, multiplicarse dentro de uno o más tejidos del huésped y emitir algún estado o forma que subsecuentemente contacte e infecte nuevos huéspedes. La forma en que un patógeno en particular cumple estos procesos, influenciará fuertemente los tipos de huésped que infecte y el impacto que tendrá en la densidad promedio del huésped (van Driesche *et al.*, 2007).

#### **1.4. Manejo Integrados de Plagas**

A partir de 1950, diez años después del advenimiento de la industria de los plaguicidas, se comienza a desarrollar el MIP, uno de los pilares de la protección vegetal moderna. Este surgió por una preocupación por parte de varios centros de investigación dedicados al estudio del Control Biológico, en California, como también por la preocupación de los trabajadores de los cultivos de algodón tanto en América del Norte y América del Sur, al igual que los productores frutícolas en Canadá, Estados Unidos y Europa, donde se alertó sobre los resultados catastróficos debido a la excesiva dependencia de los plaguicidas para el control de plagas (Kogan, 1998). A finales de la

década del 70', se comienza a definir el concepto del MIP, el cual se ha modificado durante varias décadas y ha habido distintas posturas sobre el mismo.

En este trabajo de tesis se considera la definición de MIP adoptada por un grupo de expertos de la FAO que consiste en: *“El Manejo o Control Integrado de Plagas utiliza distintas técnicas de control de manera compatible para lograr mantener la población de las plagas a niveles inferiores a los que causan perjuicio económico, teniendo en cuenta la dinámica poblacional de las plagas y el ambiente asociado a las mismas”* (FAO, 1975).

Kogan (1998), definió al MIP basándose en enunciados que abarcaron los últimos 35 años: *“MIP es un apoyo a las decisiones de un sistema de selección y de uso de tácticas de control de plagas, por separado o coordinados en una estrategia de gestión, basado en análisis de costo/beneficio que debe tener en cuenta los intereses de los productores y los impactos en la sociedad, y el ambiente”*.

Actualmente se hace hincapié en la necesidad que el MIP sea abordado en forma multidisciplinaria (entomólogos, fitopatólogos, edafólogos, botánicos, etc), ya que es común que el concepto se use en forma parcial. En cuanto al Control de Plagas, resulta importante conocer la biología de la plaga, como fluctúan sus poblaciones y la tecnología disponible para prevenir niveles inaceptables de la plaga que puedan producirle un daño al hombre, ya sea en la salud, propiedad, recursos y ambiente (Kogan y Jepson, 2007).

### **1.5 Plagas sucsopíadoras**

Son especies que generalmente atacan todas las partes de las plantas, hojas, tallos, raíces, flores, frutos y semillas. Se caracterizan por tener un aparato bucal sucsopíador que les permite alimentarse directamente de los fluidos de las plantas (a través del floema), provocando amarillamiento y deformaciones en el tejido vegetal así como también marchitamiento y debilidad. Las principales plagas sucsopíadoras pertenecen al Orden Hemiptera (chinchas, pulgones, cochinillas, moscas blancas).

### 1.5.1 *Bemisia tabaci* (mosca blanca)

#### 1.5.1.1 Sistemática y descripción morfológica

*Bemisia tabaci* (**Figura 1.3**) fue originalmente descrita en 1889 en Grecia donde se la halló sobre tabaco (*Nicotiana tabacum* L., Solanaceae) y fue denominada *Aleyrodes tabaco* (Gennadius, 1889) (Oliveira *et al.*, 2001).

El primer espécimen registrado en el nuevo mundo fue encontrado en Estados Unidos sobre *Ipomoea batatas* (L) (Convolvulaceae) y descrito por Quaintance (1900) como *Aleyrodes inconspicua*. En el año 1957 esta especie y otras 18 más fueron incluidas en un sólo taxón: *B. tabaci* (Russell, 1957). Es por esto que *B. tabaci* presenta varios nombres comunes tales como mosca blanca del tabaco, de la batata o del algodón.

En la actualidad *B. tabaci* es considerada como un complejo de biotipos en pleno cambio evolutivo (De Barro *et al.*, 2011).

Taxonómicamente se la ubica de la siguiente manera:

PHYLUM: Arthropoda

SUBPHYLUM: Hexapoda

CLASE: Insecta

SUBCLASE: Pterygota

ORDEN: Hemiptera

SUBORDEN: Sternorrhyncha

SUPERFAMILIA: Aleyrodoidea

FAMILIA: Aleyrodidae

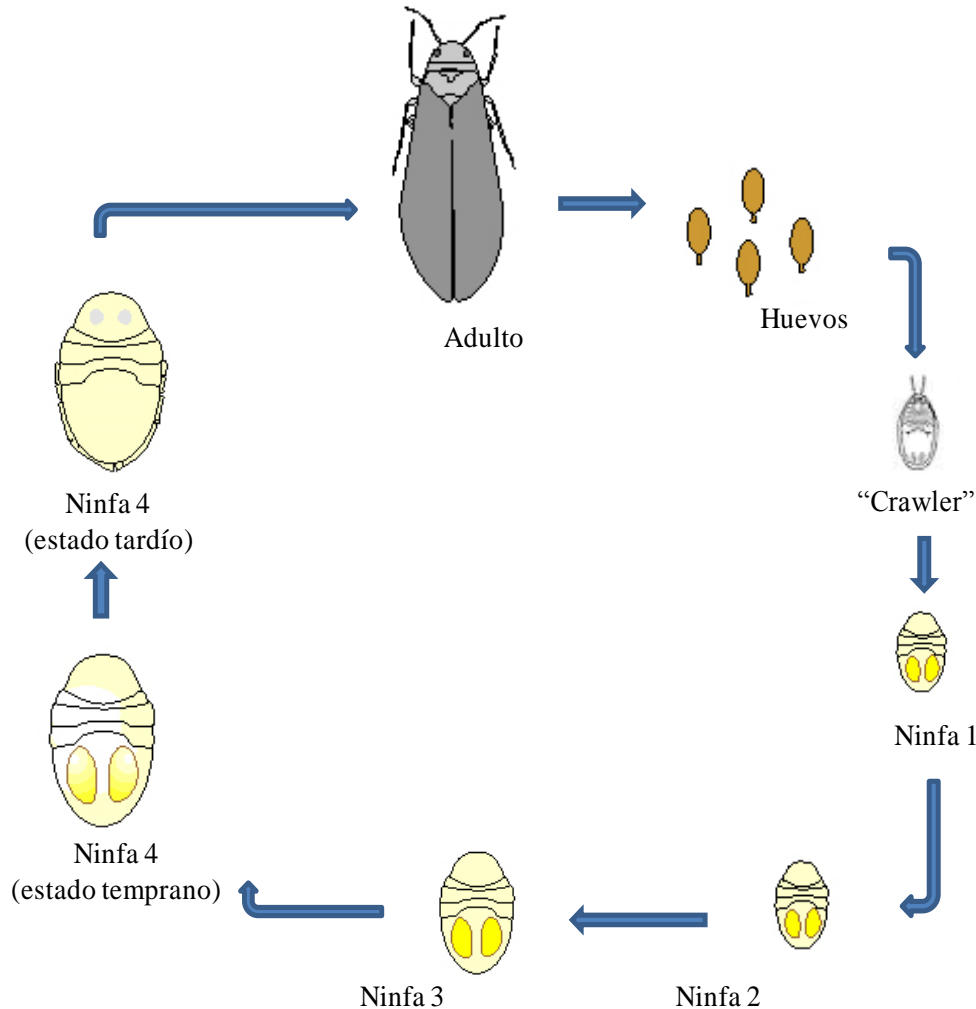
GENERO: *Bemisia*

ESPECIE: *Bemisia tabaci*



**Figura 1.3:** Fotografía de A) adultos, B) diferentes estadios ninfales de *Bemisia tabaci*.

El ciclo de vida se esquematiza en la **Figura 1.4** y las características de cada estadio se resumen a continuación (Nechols y Tauber, 1977; Gill, 1990; Byrne y Bellows, 1991; Viscarret y Botto, 1996; Viscarret *et al.*, 2001).



**Figura 1.4:** Ciclo de vida de *Bemisia tabaci* (tomado y adaptado de Hoddle, 2003)

**Huevos:** Los huevos son depositados sin ningún orden en la cara abaxial de las hojas por medio de un pedicelo, son elípticos, asimétricos, de color amarillo que vira a anaranjado cuando madura, miden 0,158 mm de longitud máxima por 0,072 mm de anchura máxima y generalmente se hallan recubiertos parcialmente por una secreción pulverulenta blanquecina que desprende la hembra en el momento de la puesta.

**Ninfas:** Tienen una forma oval aplastada y son de color amarillento y traslúcidas. Existen cuatro estadios ninfales. El primero de ellos (*crawler*) tiene antenas y tres pares de patas normalmente desarrolladas y funcionales que les permiten desplazarse cortas distancias. Antes de pasar al segundo estadio ninfal, el *crawler* se



fija, pierde las patas y comienza a alimentarse. Las ninfas del segundo y tercer estadio son inmóviles y gradualmente se vuelven más gruesas y más opacas. El cuarto estadio ninfal suele subdividirse en temprano, medio y tardío. Los cambios que se observan entre una y otra subdivisión del cuarto estadio ninfal están vinculados con la presencia o ausencia de alimentación y a cambios morfológicos, principalmente notorios en el cuarto estadio ninfal tardío, en el cual se observan los ojos rojos (ocelos) y los pigmentos amarillentos del adulto farado.

**Adulto:** Mide poco más de 1mm de largo, si bien el tamaño medio del macho es algo menor que el de la hembra. Tienen dos pares de alas anchas, redondeadas y de nerviación reducida. Tanto el cuerpo como las alas están recubiertos de una serosidad blanquecina que procede de las glándulas abdominales. La cabeza tiene dos ojos compuestos voluminosos y finas antenas.

#### 1.5.1.2 Distribución geográfica

*B. tabaci* se distribuye en un amplio rango de sistemas agrícolas, desde subtropicales hasta tropicales, pero también ocurre en áreas de climas templados. Es una especie distribuida globalmente y se encuentra en todos los continentes con excepción de la Antártida (Martin *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2001).

#### 1.5.1.3 Daños e importancia económica

Tanto las ninfas como los adultos son succionadores de savia. Causan diferentes tipos de daño: a) directo: vinculado a la succión de savia que habitualmente puede producir clorosis, dehiscencia temprana de las hojas en la planta hospedera; y b) indirecto: todos los estadios larvales eliminan sustancias ricas en hidratos de carbono sobre las cuales se desarrolla un complejo de hongos patógenos (entre ellos *Capnodium* sp.) y que en su conjunto son llamados "fumaginas" que producen una disminución de la superficie fotosintética. Estos dificultan la evapotranspiración y pueden manchar fibras, hojas y frutos, disminuyendo su calidad y aumentando costos desde el punto de vista comercial (Byrne y Bellows, 1991).

También considerado como daño indirecto, y quizás el más grave que pueden producir, es la transmisión de virosis y bacteriosis a las plantas en las que se hospedan. De estas enfermedades que transmiten, las virosis son las más importantes debido al fuerte impacto en los cultivos, y dentro de las virosis, si bien las moscas blancas

transmiten virus de seis o siete clases morfológicas, las más relevantes pertenecen a la familia Geminiviridae (Cohen, 1990).

Otro daño indirecto que se le atribuye a este fitófago y que cabe mencionar es la madurez irregular en el tomate (TIR) también conocida como arco iris, caracterizada por la formación de una mancha en forma de estrella dorada en la parte inferior del fruto, acompañada además de manchas irregulares o bandas, producto de la saliva fitotóxica que le inyecta el insecto al alimentarse de los diferentes órganos de la planta. Estos síntomas originan una pérdida de hasta 75 % del valor comercial del tomate (Schuster *et al.*, 1990; Morales *et al.*, 2003; Polack *et al.*, 2011)

#### 1.5.1.4 Control

Los métodos de control de uso más generalizado contra moscas blancas se basan en el empleo de plaguicidas. Sin embargo, se ha llegado a la conclusión de que este tipo de método necesita una cuidadosa evaluación para minimizar sus efectos negativos sobre los enemigos naturales de la plaga, el riesgo de contaminación y la cantidad de aplicaciones con el fin de reducir la selección de poblaciones de moscas blancas resistentes a plaguicidas (Ortega Arenas *et al.*, 1998; Polack *et al.*, 2002). En este marco se ha comenzado a trabajar, a nivel mundial, con métodos alternativos de control más sustentables como el control biológico. La comunidad de enemigos naturales asociados al complejo *B. tabaci* es amplia y variada. Dentro de ella encontramos endoparasitoides del género *Encarsia* y *Eretmocerus* (Aphelinidae), depredadores de las Familias Chrysopidae (Neuroptera), Coccinellidae (Coleoptera), Tomisidae, Argiopidae, Araneidae (Araneae), Phytoseiidae (Acari), Miridae, Anthocoridae (Heteroptera) y hongos entomopatógenos (Gerling, 1990; Viscarret, 2000b; López y Evans, 2008a) la mayoría de los cuales han sido citados y están presentes en Argentina.

### 1.6 Los himenópteros parasitoides y el control de plagas

Los himenópteros son el grupo dominante dentro de los insectos entomófagos parasitoides, tanto desde el punto de vista numérico, como por el éxito alcanzado en su uso como agentes de control de plagas. Este orden abarca cerca de 200.000 especies, pertenecientes a 36 familias (Nieves Alredy et y Fontal Cazalla, 1999), sin considerar aquellas que aún permanecen sin determinar.

Dentro del orden Hymenoptera, los parasitoides de mayor importancia para el control biológico, pertenecen a las superfamilias Chalcidoidea e Ichneumonoidea. La

superfamilia Chalcidoidea incluye 16 familias con parasitoides, de las cuales Encyrtidae y Aphelinidae han sido usadas más frecuentemente en control biológico (van Driesche *et al.*, 2007). Dentro de los Aphelinidae los miembros de esta familia son importantes parasitoides de Aleyrodoidea (moscas blancas), Aphidoidea (pulgones), Coccoidea (cochinillas, escamas) (Nieves Alredy et y Fontal Cazalla, 1999) y de huevos de diferentes especies de insectos. Los géneros de mayor importancia incluyen a *Aphelinus*, *Aphytis*, *Encarsia* y *Eretmocerus* (Rosen y De Bach, 1979).

### 1.6.1 *Eretmocerus mundus* Mercet

#### 1.6.1.1 Sistemática y descripción morfológica

*Eretmocerus mundus* (Figura 1.5) fue determinado por primera vez por Mercet en el año 1931. Es un microhimenóptero ecto-endoparásitoide de la mosca blanca *B. tabaci*. El adulto es una pequeña avispa de 1mm de longitud. Su cabeza, tórax y abdomen son de color amarillo o amarillo-naranja (siendo los machos más oscuros que las hembras). Posee tres típicos puntos rojos en forma triangular sobre la cabeza, y los ojos son de color verde oscuro, antenas en forma de mazo, formadas por 5 segmentos en las hembras y 3 en los machos, y largas y delgadas patas de color más claro que el resto del cuerpo, con tarsos de 4 segmentos.

Su ubicación taxonómica es la siguiente:

PHYLUM: Arthropoda

SUBPHYLUM: Hexapoda

CLASE: Insecta

SUBCLASE: Pterygota

ORDEN: Hymenoptera

SUBORDEN: Apocrita

SUPERFAMILIA: Chalcidoidea

FAMILIA: Aphelinidae

SUBFAMILIA: Eretmocerinae

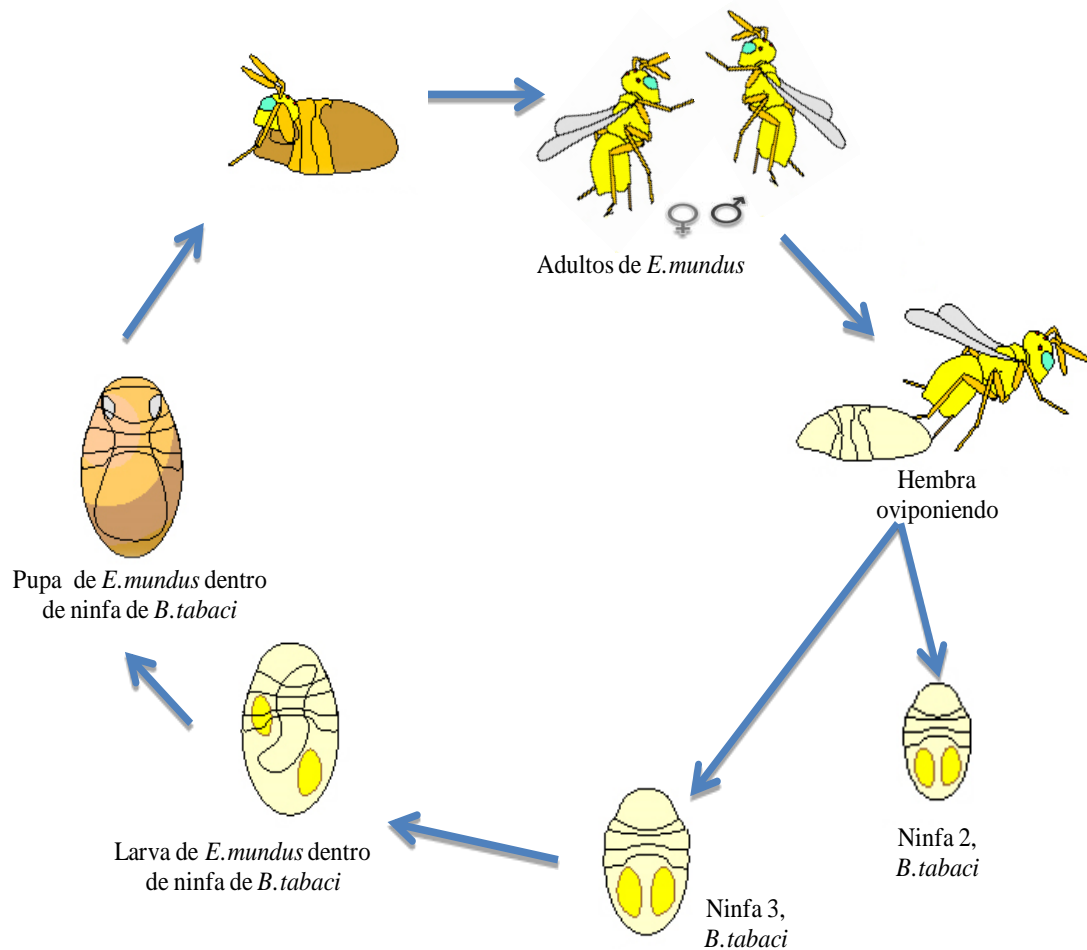
GENERO: *Eretmocerus*

ESPECIE: *Eretmocerus mundus*



**Figura 1.5:** Fotografía de una hembra adulta de *Eretmocerus mundus* (Téllez *et al.*, 2003).

El ciclo biológico está dividido en estado de huevo, tres estadios larvales (L1-L3), estado de pupa y el de adulto o imago (**Figura 1.6**) (Gerling *et al.*, 1991, 1998, 2000, 2013). Su reproducción, como la mayoría de los himenópteros, es por partenogénesis arrenotoca, cuyos huevos fecundados producen hembras mientras que huevos no fecundados producen machos (Rose *et al.*, 1996).



**Figura 1.6:** Ciclo de vida de *Eretmocerus mundus* (tomado y adaptado de Hoddle, 2003).

**Huevo:** es depositado debajo de las ninfas de segundo y tercer estadio (N2-N3) del huésped, típicamente entre los pares de patas y /o cerca de la piezas bucales y eclosiona ahí. La hembra del parasitoide se coloca de espalda a la ninfa de *B. tabaci* de modo que esta quede en contacto con el ovipositor y empleando sus patas traseras la levanta y realiza la puesta. El corion del huevo posee una o más espinas de 5-6  $\mu\text{m}$  de longitud, las cuales son utilizadas para aferrarse al huésped.

**Larva:** el primer estadio larval emerge del huevo tres días después de la oviposición, y con sus mandíbulas comienza a penetrar dentro de su huésped, este proceso estimula a las células epiteliales de la cutícula que se encuentran cercanas al orificio de entrada, las cuales comienzan rápidamente a proliferar y forman una cápsula alrededor de la larva del primer estadio. La función de esta cápsula aún se desconoce, pero se ha sugerido que sirve para evitar el contacto directo entre los elementos celulares de la hemolinfa del huésped y la larva, y de esta manera evitar una respuesta inmune por parte del huésped. El segundo y tercer estadio larval se desarrollan también dentro de esta cápsula, alimentándose de la hemolinfa del huésped por medio de un canal alimenticio.

**Pupa:** el proceso de pupación comienza tras un cambio en la posición de la larva de tercer estadio de manera que su cabeza y piezas bucales ocupen el lugar vacío de la cabeza y las piezas bucales del huésped enfrentadas a la superficie antero-dorsal del mismo. Este cambio en la posición va acompañado con la desintegración de la cápsula que típicamente rodeaba los estadios larvales. La alimentación cesa, comienza la organogénesis, y el cuerpo del parasitoide en desarrollo se va rodeando de células vacuoladas, las cuales actúan como centros metabólicos y de almacenamiento en este proceso.

**Adulto:** emerge a través de un opérculo de forma circular realizado en la parte anterior de la exuvia pupal del huésped y muestra la morfología descrita anteriormente en este apartado.

#### 1.6.1.2 Distribución geográfica

*E. mundus* es de origen Paleártica y se presenta extensamente como una especie autóctona en la cuenca Mediterránea, Uganda, Etiopía, Zimbabue y Tailandia. En Argentina se desconoce cómo fue introducida, pero desde el año 2002 se ha registrado su asociación con *B. tabaci* (Cáceres *et al.*, 2005; López y Adorno, 2008b) en diferentes regiones hortícolas del país.

#### 1.6.1.3 Importancia económica

A nivel mundial, *E. mundus* es considerado como un agente de control biológico efectivo contra *B. tabaci*. Es comercializado por Koppert® (Stanly *et al.*, 2005) y Biobest (Mundus-System®) (Urbaneja *et al.*, 2003). Además de la mortalidad causada por el parasitismo, el parasitoide puede causar también la muerte de sus huéspedes al

alimentarse de ellos por un mecanismo denominado “hostfeeding”. Este es un modo de alimentación muy extendido entre los himenópteros parasitoides mediante el cual las hembras adultas provocan heridas para alimentarse de la hemolinfa y tejidos del huésped (Gerling y Fried, 2000).

### **1.7 Importancia de los estudios ecotóxicológicos sobre los organismos benéficos**

Uno de los objetivos principales del MIP es compatibilizar distintas herramientas para el control de plagas de cultivos. Entre estas herramientas se destaca la búsqueda de compatibilidad entre el control biológico y el químico, con el uso de insecticidas selectivos que resulten compatibles con los enemigos naturales y polinizadores.

La Organización Internacional de Control Biológico (OICB) propone una metodología secuencial (laboratorio, semicampo y campo) que clasifica a los plaguicidas en cuatro categorías a partir de ensayos de toxicidad. Para la evaluación en laboratorio propone una escala de toxicidad, evaluando la reducción del parámetro biológico, generalmente la supervivencia y en otros casos la capacidad benéfica: 1= inocuo (<30 %); 2= levemente tóxico (30-79 %); 3= moderadamente tóxico (80-98 %); y 4= tóxico (<99 %) (Hassan *et al.*, 1994).

Actualmente este tipo de estudios están siendo muy discutidos a nivel mundial por la ecotoxicología moderna, ya que la evaluación que plantean es parcial y la clasificación de la toxicidad es arbitraria, y no siempre se contemplan los efectos subletales de los plaguicidas sobre los enemigos naturales, principalmente aquellos que están relacionados con la capacidad benéfica de los mismos. Stark *et al.*, (2007, 2010) han demostrado que la metodología de la OICB no refleja la acción tóxica de un plaguicida en su totalidad, ya que subestima a la misma, debido a que los parámetros evaluados no son siempre los más relacionados con el desempeño de los enemigos naturales. Por este motivo resulta necesario incorporar otros estudios a nivel ecológico (aspectos reproductivos, neurofisiológicos, comportamentales), para evaluar el potencial de los plaguicidas sobre la fauna benéfica, lo cual también ayudaría a desarrollar evaluaciones de riesgo de manera más completa (Desneux *et al.*, 2007).

## **CAPÍTULO 2: “Hipótesis y objetivos”**

## 2.1 Hipótesis General

Los insecticidas alteran el desempeño de *Eretmocerus mundus*, y si bien a bajas concentraciones pueden no influir en forma drástica sobre la supervivencia de éste, modifican sus parámetros biológicos, demográficos y comportamentales. Los insecticidas convencionales resultan más perjudiciales que los biorracionales.

## 2.2 Objetivo General

Evaluar los efectos ecotoxicológicos letales y subletales de insecticidas convencionales y biorracionales sobre *Bemisia tabaci* y su principal parasitoide *Eretmocerus mundus* a fin de establecer estrategias de control que minimicen el impacto de plaguicidas sobre organismos no blanco.

## 2.3 Objetivos específicos

- 1) Evaluar efectos letales de insecticidas convencionales y biorracionales sobre ninfas de segundo estadio de *Bemisia tabaci*, estadio preferido por las hembras del parasitoide *Eretmocerus mundus* para su parasitación.
- 2) Evaluar efectos letales y subletales de insecticidas convencionales y biorracionales sobre atributos biológicos y parámetros demográficos de *Eretmocerus mundus*.
- 3) Estudiar aspectos comportamentales de cópula, búsqueda y oviposición de *Eretmocerus mundus*, y su modificación frente a huéspedes contaminados o en individuos expuestos a residuos de insecticidas.



## **CAPÍTULO 3: “Materiales y Métodos Generales”**

## CAPÍTULO 3: Materiales y Métodos Generales

En el presente capítulo se desarrollan los materiales y métodos generales que se emplearon en el trabajo de tesis, incluidos la metodología para la cría y mantenimiento de los organismos (huésped y parasitoide) utilizados. La metodología específica usada en cada bioensayo se detalla en los capítulos respectivos.

### 3.1 Metodología de recolección de organismos a campo

La recolección de los organismos se realizó a lo largo de los años 2010/11/12/13/14, en cultivos de pimiento bajo invernáculo en diferentes sitios del CHP, provincia de Buenos Aires (**Figura 3.1**). En la **Tabla 3.1** se detallan los sitios de muestreo, cultivos dónde se recolectó el material biológico y la forma de manejo de cada uno.



**Figura 3.1:** Fotografía de cultivo de pimiento bajo invernáculo en el Cinturón Hortícola Platense (CHP).

**Tabla 3.1:** Establecimientos hortícolas del CHP (NE, prov. Bs. As, Argentina) donde se realizaron los muestreos para la obtención de organismos utilizados en la cría en laboratorio y posterior uso en ensayos de toxicidad.

<b>Sitio de muestreo Lugar /establecimiento</b>	<b>Especies cultivadas</b>	<b>Forma de manejo del cultivo</b>
Colonia Urquiza: “Maita”*	Pimiento ( <i>C. annuum</i> ), tomate ( <i>S. lycopersicum</i> ).	<b>Integrado:</b> se utiliza control químico pero de acuerdo a un plan de monitoreos.
El Peligro: “Simonetti” *	Pimiento ( <i>C. annuum</i> ), tomate ( <i>S. lycopersicum</i> ).	<b>Integrado, con un fuerte componente de control biológico:</b> se utiliza control químico pero de acuerdo a un plan de monitoreos. No se utilizan plaguicidas convencionales. Además incorpora invernáculos biológicos donde no se realiza ningún tipo de aplicación.
La Plata: “Colectivo Orgánico”*	Pimiento ( <i>C. annuum</i> ) y tomate ( <i>S. lycopersicum</i> ). son los principales cultivos pero también podemos encontrar una gran variedad de otras hortalizas como berenjena, lechuga, zapallo, etc.	<b>Orgánico:</b> no se utilizan plaguicidas sintéticos para controlar plagas.

\*Se consigna el nombre del establecimiento

### 3.1.1 Recolección de *Bemisia tabaci*

Los adultos de mosca blanca, presumiblemente *B. tabaci*, se recolectaron mediante un aspirador manual de la parte superior e intermedia de los cultivos, y se acondicionaron en plantas de pimiento (*C. annuum*), recubiertas con un capuchón de PVC ventilado en su parte superior con voile. También se recolectaron hojas de diferentes partes de las plantas a fin de obtener material con estadios ninfales, las que fueron puestas en bolsas de polietileno para su posterior acondicionamiento y observación en laboratorio. El material biológico recolectado fue llevado al laboratorio

y observado bajo lupa binocular 60 X. Se determinaron las especies de mosca blanca presentes. Las muestras en las que se registró la presencia de *B. tabaci*, fueron separadas y puestas en cuarentena hasta la emergencia de los adultos, los cuales una vez reconocidos taxonómicamente con la ayuda de la descripción realizada por Viscarret, 2000 (Tesis doctoral), fueron utilizados para iniciar las colonias en laboratorio.

### **3.1.2 Recolección de *Eretmocerus mundus***

Para la obtención del parasitoide se recolectó material del huésped parasitado (*B. tabaci*) con signos visibles de parasitismo por *Eretmocerus* (pupas anaranjadas sin excreciones, ya que la presencia de las mismas es una característica de las pupas de los parasitoides del género *Encarsia*), cortando hojas de la parte inferior y media de las plantas, las cuales fueron colocadas en bolsas de polietileno hasta su acondicionamiento y observación en el laboratorio. Las pupas del parasitoide fueron despegadas de las muestras foliares mediante un pincel fino de pelo de marta y puestas en tubos de ensayo de vidrio (Tubos Khan 1cm x 7 cm). Una vez emergidos los adultos se contrastaron con las claves taxonómicas desarrolladas por Rose and Zolnerowich (1997), a fin de corroborar que la especie fuera *E. mundus*. Aquellos organismos que no correspondieron a *E. mundus* fueron descartados. Una vez corroborada la especie de parasitoide, se comenzó con su cría y multiplicación en el laboratorio para el establecimiento de la colonia.

## **3.2 Cría y mantenimiento de organismos para los estudios de laboratorio**

La calidad de los organismos criados en laboratorio es de suma importancia, ya que incide directamente en la condición óptima con la que se realizan los bioensayos, sobresaliendo la variabilidad genética y la sanidad de las colonias. Por este motivo, la puesta a punto, mantenimiento, incorporación de material de campo a las colonias ya establecidas y la buena nutrición de los organismos, fue una tarea primordial dentro de las actividades experimentales desarrolladas en el presente estudio.

### **3.2.1 Cría y mantenimiento de *B. tabaci***

Para la cría de *B. tabaci* se utilizaron plantines comerciales de pimiento (*C. annuum*) libres de residuos de plaguicidas. Una vez en el laboratorio se trasplantaron a recipientes plásticos de 9cm de diámetro y 11cm de alto, utilizando tierra fértil mezclada con perlita a fin de obtener un sustrato suelto (50:50). También se utilizaron plantas de algodón (*Gossypium hirsutum* L Malvaceae) para la cría, las cuales se

cultivaron en laboratorio a partir de semillas suministradas por el INTA EEA Sáenz Peña (Ing. Agr. Mauricio Tcach). Todas las plantas obtenidas fueron acondicionadas dentro de jaulas de cría diseñadas y construidas para tal fin (26cm x 40cm x 50cm) (**Figura 3.2**), donde se liberaron los adultos de mosca blanca recolectados en el campo para oviposición y multiplicación de la población. Se utilizó un protocolo de riego, fertilización y renovación de plantas a lo largo de cada ciclo de desarrollo de *B. tabaci*, el cual consistió en riego dos veces por semana, fertilización una vez por semana con un fertilizante triple NPK y hormona de crecimiento (Fertifox Potenciado<sup>®</sup>), en concentración de: nitrógeno N (14,2 %), fósforo P (3,1 %), potasio K (4,3 %) y ácido naftalen acético (42 mg) para asegurar un buen estado nutricional. La renovación de las plantas se realizó una vez por semana.



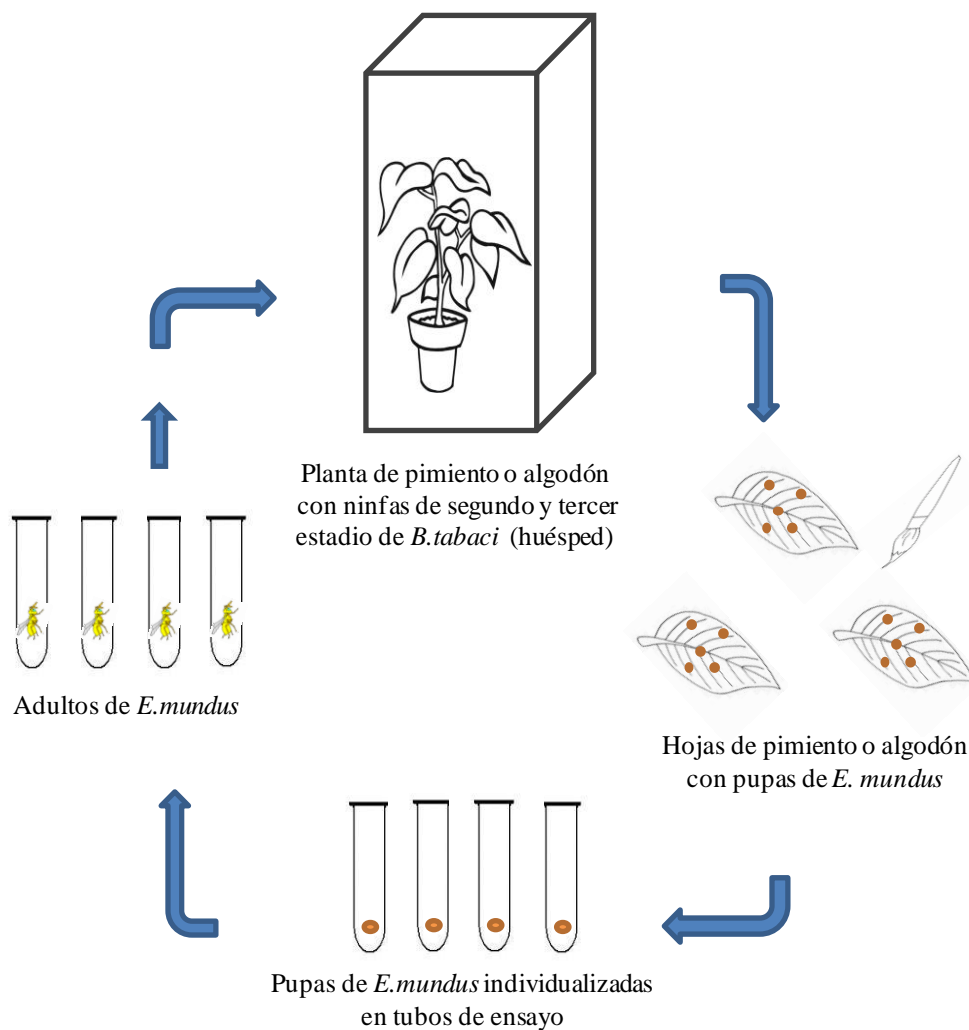
**Figura 3.2:** Fotografías de las jaulas utilizadas para la cría de *Bemisia tabaci*.  
A vista frontal, B vista lateral.

### 3.2.2 Cría y mantenimiento de *E. mundus*

Para la cría de *E. mundus* se procedió de manera similar que con la cría de su huésped, solo que las plantas que se ponían dentro de las jaulas contenían los estadios del huésped (ninfas de segundo y tercer estadio de *B. tabaci*), sobre los cuales las hembras del parasitoide son capaces de ovipositar (Urbaneja *et al.*, 2007). Además dentro de las mismas se colocaron floreros que contenían flores de *Brassica rapa* L Brassicaceae, polen de abejas orgánico y trazas de miel con la finalidad de potenciar la capacidad reproductiva de la hembra adulta del parasitoide.

Las jaulas fueron revisadas semanalmente, a fin de detectar signos de parasitismo (pupas anaranjadas) en las ninfas de *B. tabaci*. Las plantas en donde se observó parasitismo fueron retiradas (siempre cuidando de dejar algunas para la continuidad de la cría de *E. mundus*) y reemplazadas por nuevas plantas con huéspedes.

Las hojas que contenían las pupas de *E. mundus* fueron cortadas de las plantas de pimiento. Para facilitar la individualización de las pupas, estas fueron despegadas mediante un pincel fino y colocadas en tubos de ensayo de vidrio (Tubos Khan 1cm x 7cm) con una traza de miel pura de abejas, donde se dejaron hasta la emergencia de los adultos (**Figura 3.3**). Estos adultos fueron utilizados en parte (el resto se conservó para la cría) para la realización de los bioensayos de toxicidad. En el caso que los ensayos requirieran otro estado de desarrollo (por ejemplo pupas), estos eran también despegados de las hojas, acondicionados según la metodología requerida por el ensayo y utilizados en los mismos.



**Figura 3.3:** Esquematización de la metodología de cría de *Eretmocerus mundus*.

### 3.3 Condiciones generales de cría de insectos y de ensayos de toxicidad

Tanto para el mantenimiento y cría de los organismos, como también para el desarrollo de los bioensayos toxicológicos, se utilizó un bioterio y una cámara de cría, ambos acondicionados a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  HR y un fotoperiodo de 16:8 (L:O) (Figura 3.4).



**Figura 3.4:** Cámara de Cría (A) y Bioterio (B) donde se llevaron a cabo los bioensayos toxicológicos y la cría de organismos.

### 3.4 Metodología general de preparación y aplicación de los insecticidas objeto de estudio

#### 3.4.1 Preparación de soluciones de insecticidas

Las soluciones de insecticidas utilizadas en los bioensayos ecotoxicológicos fueron preparadas al inicio de cada experimento. Se prepararon soluciones madres y a partir de estas se realizaron las diluciones correspondientes a las concentraciones de exposición seleccionadas para los diferentes ensayos. Los disolventes utilizados fueron agua destilada y acetona grado analítico, dependiendo del tipo de ensayo y método de exposición al insecticida seleccionado.

Para la evaluación de toxicidad se partió de las Máximas Concentraciones Recomendadas para Campo (MCRC) para cada insecticida y se incorporaron luego a la

evaluación concentraciones menores, por lo que se realizaron diluciones a partir de la MCRC para cada insecticida a evaluar (Darvas y Polgar, 1998).

En la **Tabla 3.2** se detallan las formulaciones comerciales de los insecticidas utilizados en los bioensayos de toxicidad por: nombre comercial, pureza, empresa fabricante en Argentina y sus concentraciones expresadas en mg/L de ingrediente activo (I.A) de cada producto.

**Tabla 3.2** Insecticidas utilizados en los ensayos de toxicidad con *Bemisia tabaci* y *Eretmocerus mundus*.

Ingrediente activo	Nombre comercial	Pureza	MCRC (mg i.a./L)	Empresa fabricante
Acetamiprid (Br-Neo)	Mospilan <sup>®</sup>	20 % p/v	200 mg i.a./L	Summit-Agro S.A
Azadiractina (B-IGRs)	Neem-Azal <sup>®</sup>	1,2 % p/v	40 mg i.a./L	Argistar
Cipermetrina (C-P)	Glextrin 25 <sup>®</sup>	25 % p/v	25 mg i.a./L	Gleba S.A.
Piriproxifén (Br-IGRs)	Epingle <sup>®</sup>	10 % p/v	75 mg i.a./L	Summit-Agro S.A
Spirotetramat (Br-Lip)	Movento <sup>®</sup>	10 % p/v	20 mg i.a./L	Basf S.A

MCRC: Máxima Concentración Recomendada para Campo, p/v: porcentaje peso- volumen. Los productos ensayados fueron provistos por los fabricantes indicados en la tabla. Br-Neo: Insecticida Biorracional-Neonicotinoide con acción neurotóxica, B-IGRs: Insecticida Botánico con acción IGRs, C-P: Insecticida Convencional-Piretroide con acción neurotóxica, Br-IGRs: Insecticida Biorracional con acción IGRs, Br-Lip: Insecticida Biorracional con acción sobre la síntesis de lípidos.

### 3.4.2 Metodología general de exposición a insecticidas

**Exposición por Inmersión:** consiste en sumergir a los organismos/folículos o discos de hojas durante corto tiempo (5-20 s) en una solución de un insecticida dado, utilizando como disolvente agua destilada. A la solución, si es necesario, se le agrega un tensoactivo (Tween80<sup>®</sup> al 0,01%) para una mejor adhesión de los insecticidas a la superficie tratada (**Figura 3.5**).



**Figura 3.5:** Exposición por inmersión.



**Exposición Residual por medio de superficie tratada:** Se trata de exponer a los organismos por medio de superficies tratadas (tubos de ensayo, hojas) a diferentes insecticidas durante un cierto tiempo que dependerá del tipo de bioensayo en cuestión. El tratamiento de las superficies se realizó de dos maneras:

- a) *Superficies de vidrio (tubos de ensayo):* la superficie interior de los tubos (Tubos Khan, longitud: 7cm; diámetro: 1cm; superficie interna: 43,96cm<sup>2</sup>) fue tratada con 0,7 µL de las diferentes soluciones de insecticidas. Para obtener una capa homogénea del insecticida los tubos fueron rotados manualmente hasta el secado total de la gota (Desneux *et al.*, 2004) (**Figura 3.6**).

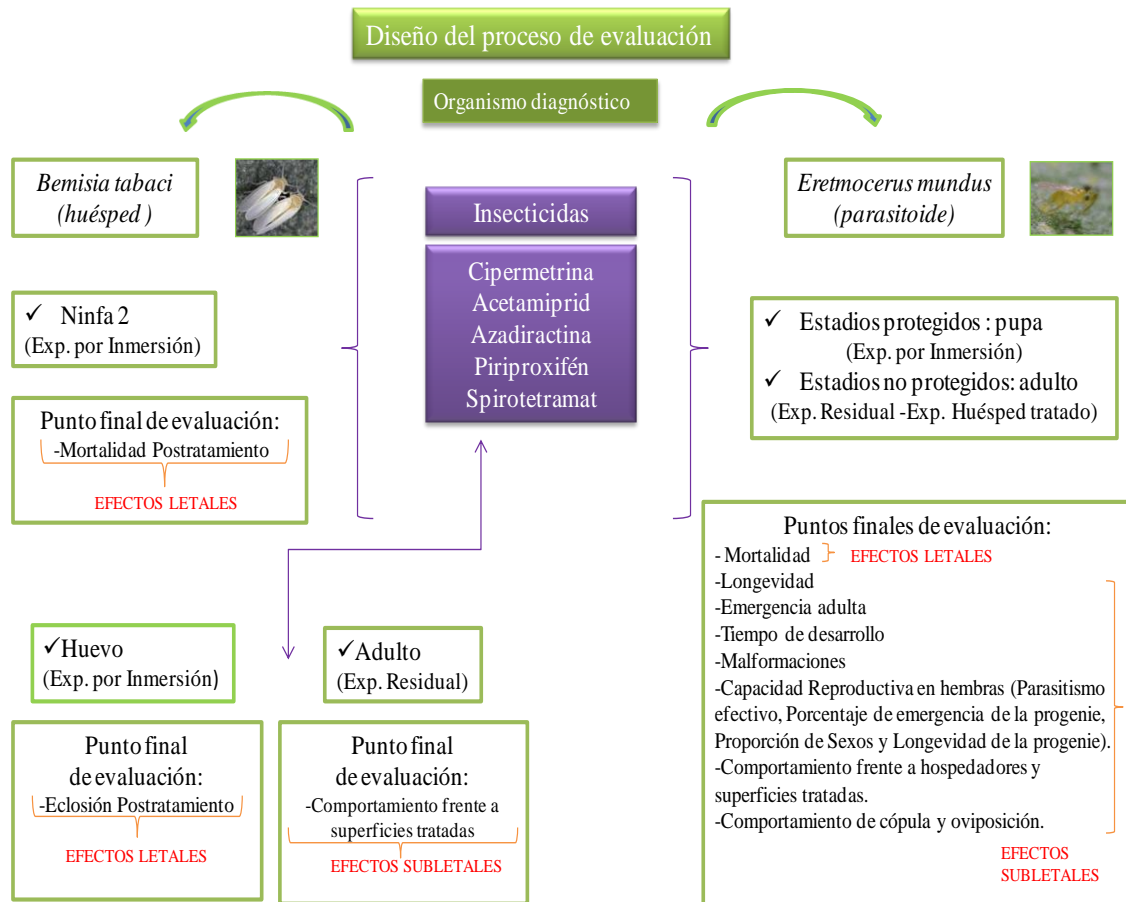


**Figura 3.6:** Tratamiento de las superficies internas de los tubos de ensayo.

- b) *Superficie de hojas:* estas fueron tratadas sumergiéndolas durante un cierto tiempo en una solución de insecticida dada, utilizando como disolvente agua destilada y, se dejaron secar bajo campana hasta evaporación completa del disolvente.

**Exposición a través de huésped tratado:** Se trata de exponer a los organismos a huéspedes tratados (por inmersión) con insecticidas. Para estos casos los organismos pueden ser expuestos durante un determinado período, o bien pueden estar expuestos continuamente durante todo el ensayo.

### 3.5 Esquema de la metodología utilizada para la evaluación de la toxicidad de insecticidas sobre el parasitoide *E. mundus* y su huésped *B. tabaci* en condiciones de laboratorio



### 3.6 Análisis estadístico

En cada capítulo en particular se detallarán los análisis estadísticos realizados de acuerdo a cada bioensayo.

## CAPÍTULO 4

“Evaluación de la toxicidad de acetamiprid,  
azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y  
spirotetramat sobre ninfas de segundo estadio de  
*Bemisia tabaci*”

## 4.1 Introducción

Las moscas blancas son en la actualidad las plagas principales de la mayor parte de los cultivos hortícolas bajo invernadero. Como se mencionó anteriormente en el capítulo introductorio de la presente tesis, las dos especies que pueden afectar a estos cultivos son *T. vaporariorum* y *B. tabaci*, a esta última, se la considera como un complejo de biotipos en plena evolución, de difícil control y que se ha vuelto más importante que *T. vaporariorum* en cultivos hortícolas, más aun bajo cubierta (Gabarra, 2002; Cáceres, 2004; Strassera, 2007, 2009; Gonsebatt *et al.*, 2012). En la actualidad en el CHP, se realizan alrededor de 30 aplicaciones durante el ciclo del cultivo del tomate (*S. lycopersicum*) y en forma semanal en los cultivos de pimiento (*C. annuum*), principalmente para el control de *B. tabaci*, y generalmente mediante el empleo de insecticidas de amplio espectro (organoclorados, organofosforados, piretroides y neonicotinoides) (Strassera, com. pers).

En este capítulo se describen los estudios de toxicidad de acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat sobre ninfas del segundo estadio de *B. tabaci*. Para el insecticida spirotetramat se amplió la evaluación de sus efectos más allá del estado ninfal incorporando la toxicidad sobre huevos y adultos, por tratarse de un insecticida con modo de acción novedoso (inhibe la síntesis de lípidos, actúa sobre la coenzima A), más selectivo y de reciente registro en Argentina para el control de plagas succionadoras.

La elección del segundo estadio ninfal de *B. tabaci* estuvo relacionada al hecho de ser éste el estadio de desarrollo preferido por la hembra del parasitoide para oviponer. Por un lado se pretendió conocer la susceptibilidad del huésped frente a los diferentes insecticidas utilizados para su control y por otro, el posible efecto sobre los enemigos naturales asociados a él, en este caso en particular los posibles efectos sobre *E. mundus*.

## 4.2 Materiales y Métodos

### 4.2.1 Obtención del material para los bioensayos de toxicidad

Para la realización de los bioensayos, plantas de pimiento/algodón fueron expuestas a adultos de *B. tabaci*. Para esto las mismas fueron introducidas dentro de las jaulas de cría del fitófago durante 24 h. Posteriormente las plantas fueron retiradas y puestas en una cámara de cría. Tras la emergencia del primer estadio ninfal, se esperó

hasta que llegaran al estadio requerido para los bioensayos (aproximadamente 10 días posteriores a la emergencia) momento en el cual se procedió al cortado de las hojas, y después de corroborar la presencia de las ninfas bajo lupa binocular, estas fueron utilizadas en los bioensayos. En los ensayos con el insecticida spirotetramat se utilizaron además huevos y adultos, los cuales fueron obtenidos siguiendo el mismo procedimiento que para la obtención de las ninfas, con la excepción que en el caso de los huevos, las hojas eran utilizadas uno o dos días después de retirar las plantas de las jaulas, y en el caso de los adultos se esperaba hasta la emergencia de los mismos.

#### 4.2.2 Bioensayos

Los experimentos fueron diseñados para evaluar el efecto de los insecticidas acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat sobre ninfas de segundo estadio de *B. tabaci*. Para la realización de los mismos, hojas de pimiento/algodón con ninfas de segundo estadio fueron expuestas a las diferentes soluciones de insecticidas, empleando el método de inmersión descrito en el capítulo 3, sección 3.4.2. Las soluciones de los insecticidas se prepararon con agua destilada como disolvente, para el control se utilizó solo agua destilada. El tiempo de inmersión fue 20 s por hoja. Las hojas tratadas que contenían las ninfas se dejaron secar bajo campana de gases durante 45 min. Posteriormente, fueron acondicionadas individualmente en viales de plástico (6,5cm x 8,5cm) cubiertos en su parte superior con un voile a fin de facilitar la ventilación de los mismos. Los viales se mantuvieron en cámara de cría ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 16:8 L:O,  $75 \pm 5\%$  HR). La metodología de ensayo se esquematiza en la **Figura 4.1**.



**Figura 4.1:** Esquema de la metodología de exposición de ninfas de *Bemisia tabaci* a insecticidas.

Se utilizaron 10 ninfas por hoja y se realizaron 3 réplicas por concentración y por insecticida (**Tabla 4.1**). El mismo número de réplicas y de individuos por réplica fue utilizado para el tratamiento control. Los puntos finales analizados en este ensayo fueron: supervivencia acumulada de ninfas a las 24, 48, 72 y 96 h postratamiento y  $CL_{50}$  para la mortalidad acumulada a las 72 h postratamiento.

**Tabla 4.1:** Concentraciones utilizadas en los bioensayos.

Acetamiprid	Azadiractina	Cipermetrina	Piriproxifén	Spirotetramat
(mg i.a /L)	(mg i.a /L)	(mg i.a /L)	(mg i.a /L)	(mg i.a /L)
400	40*	37,5	150	20*
300	30	25*	100	15
200*	20	12,5	75*	10
100	10	6,25	37,5	5
	5	3,12		2,5

\*Máxima Concentración Recomendada para Campo (MCRC) para cada uno de los insecticidas evaluados.

Con respecto al insecticida spirotetramat se evaluó también el efecto de la MCRC en huevos y adultos de *B. tabaci*. La metodología utilizada en el bioensayo realizado con los huevos fue similar a la utilizada con las ninfas. Huevos de 24 o 48 h de edad fueron sumergidos durante 20 s en la solución evaluada del insecticida. Esta fue preparada utilizando la formulación comercial del mismo (capítulo 3, tabla 3.2) y agua destilada con el agregado de un tensoactivo (Tween80<sup>®</sup>) al 0,01 % para facilitar la adhesión del insecticida al corion del huevo. Para el control se utilizó solo agua destilada con el tensoactivo. Una vez tratadas las hojas con los huevos, se dejaron secar bajo campana de gases durante 45 min. Posteriormente, fueron acondicionadas individualmente en viales de plástico (6,5cm x 8,5cm) cubiertos en su parte superior con un voile a fin de facilitar la ventilación. Los viales se mantuvieron en cámara de cría (25°C ± 1°C, 16:8 L: O, 75 ± 5 % HR) (**Figura 4.2**).



**Figura 4.2:** Esquema de la metodología de exposición de huevos y adultos de *Bemisia tabaci* a spirotetramat.

Se utilizaron 10-20 huevos por hoja y tres repeticiones. El mismo número de réplicas y de huevos por réplica fue utilizado para el tratamiento control. A las 24 h postratamiento y durante tres días consecutivos estos fueron observados bajo lupa binocular para registrar el número de huevos eclosionados. Aquellos que no eclosionaron durante ese período se consideraron muertos. Se calculó el porcentaje de eclosión como:  $\frac{N_{tn}}{N_{th}} \times 100$ , donde  $N_{tn}$  es el número de ninfas del primer estadio fijas y  $N_{th}$  es el número total de huevos puestos.

Para la evaluación de los efectos de la exposición de los adultos a los residuos del insecticida spirotetramat se utilizaron hojas de pimiento/algodón las cuales fueron tratadas por inmersión (20 s/hoja) en la solución del insecticida (spirotetramat 20 mg i.a/L). Esta se preparó con agua destilada como disolvente mientras que para el control se utilizó solo agua destilada. Una vez inmersas las hojas, se dejaron secar bajo campana durante 45 min. y posteriormente fueron colocadas en viales de plástico (6,5cm x 8,5cm) cubiertos en su parte superior con un voile. A cada vial que contenía una hoja tratada se agregaron 20 individuos (1-2 días de edad) colectados al azar de las plantas destinadas para estos bioensayos, utilizando un aspirador manual. Los viales se mantuvieron en cámara de cría ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 16:8 L:O,  $75 \pm 5\%$  HR) (**Figura 4.2**). Se realizaron 10 réplicas por tratamiento. El mismo número de réplicas y de individuos por réplica fue utilizado para el tratamiento control. Se evaluó el comportamiento de oviposición sobre superficies tratadas (hoja) con residuos del insecticida de 24, 48, 72 y 96 h y se calculó el efecto disuasorio de la oviposición (**DO**) como:  $\frac{N_c - N_t}{N_c} \times 100$

donde  $N_c$  es el número de huevos en el tratamiento control y  $N_t$  es el número de huevos en el tratamiento con spirotetramat (Alzogaray *et al.*, 2000).

### 4.2.3 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos en el bioensayo realizado sobre las ninfas de segundo estadio de *B. tabaci*, se utilizó el método no paramétrico Kaplan-Meier. Las curvas de supervivencia se obtuvieron con la ayuda del programa XL Stat (Addinsoft xlstat para Excel, Paris, Francia, 2009). La comparación entre dos curvas se realizó mediante la prueba de logaritmo del rango ("Long Rank"). Por otra parte la estimación de la concentración letal 50 (concentración que mata al 50 % de los individuos expuestos a un determinado tóxico, en este caso insecticida) se realizó mediante el análisis de regresión PROBIT - Ecological software (Chi, 1997). Finalmente para analizar los resultados de la evaluación de toxicidad de spirotetramat en huevos y adultos de *B. tabaci* se utilizó el método paramétrico de Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor (Tratamiento) (STSC, 1987). Para corroborar las premisas del ANOVA se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y mediante la prueba de homocedasticidad de las varianzas de Barlett. Si alguna de las premisas no se cumplía se realizó la transformación logarítmica ( $y = \log(x+1)$ ). Para los datos expresados en porcentajes o proporciones se utilizó la transformación angular ( $y = \arcsen \sqrt{x}$ ). El análisis *a posteriori* de los datos sometidos a ANOVA, se llevó a cabo mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En aquellos datos donde no se cumplieron los supuestos de ANOVA, se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

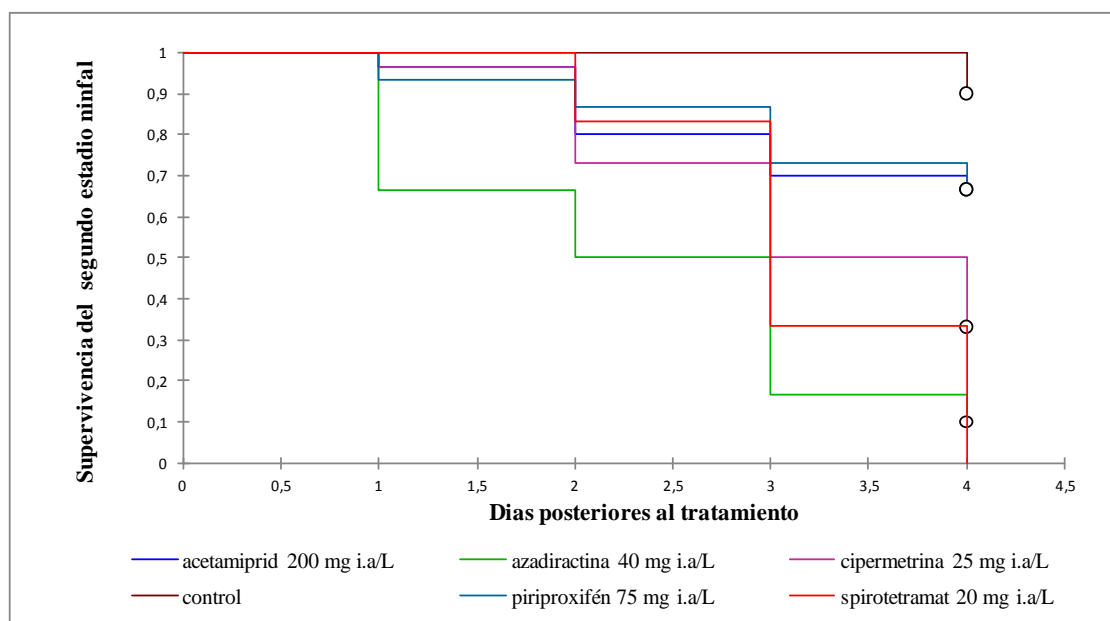
## 4.3 Resultados

### *Evaluación de la toxicidad de acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat en ninfas del segundo estadio (Análisis de supervivencia)*

Las curvas de supervivencia de ninfas de segundo estadio de *B. tabaci* muestran que todos los insecticidas evaluados a la MCRC se diferencian significativamente del control provocando un aumento en la mortalidad de las mismas a lo largo de los cuatro días evaluados (**Figura 4.3**). Los insecticidas acetamiprid y piriproxifen provocaron una mortalidad semejante y mayor a la del control pero menor a la del resto de los insecticidas. Azadiractina y spirotetramat son los insecticidas que provocaron la mayor



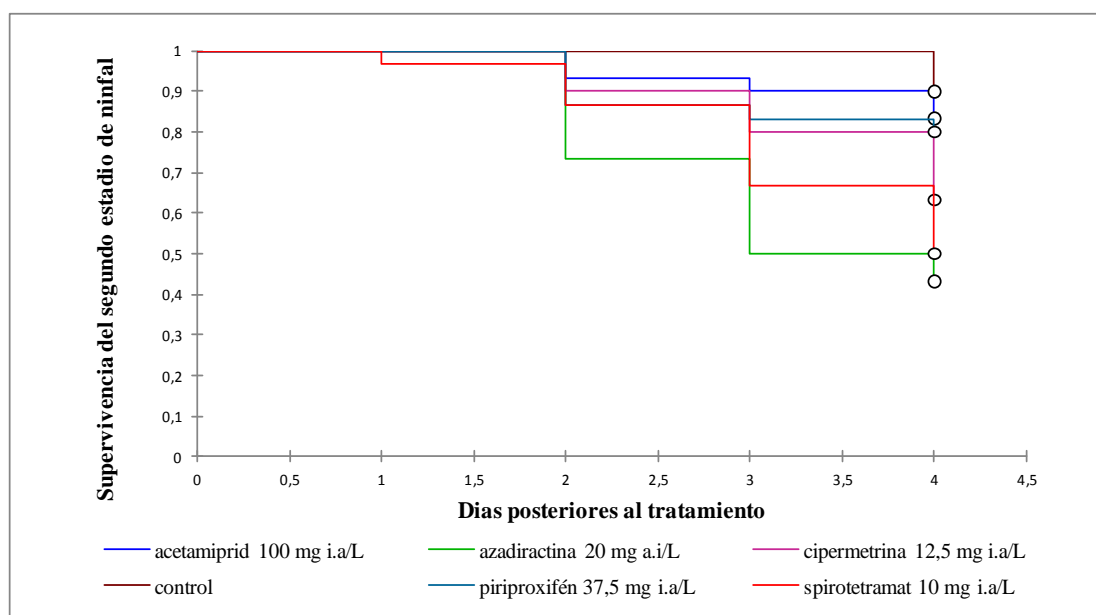
mortalidad siendo similar para ambos productos. Cipermetrina mostró un efecto intermedio en la mortalidad.



Long Rank	p (valor)	Long Rank	p (valor)	Long Rank	p (valor)
Control - Ac 200	<0,0001*	Aza 40 - Ac 200	<0,0001*	Ac 200 - Piri 75	0,95
Control - Aza 40	<0,0001*	Aza 40 - Cp 25	0,004*	Ac 200 - Sp 20	<0,0001*
Control - Cp 25	<0,0001*	Aza 40 - Piri 75	<0,0001*	Cp 25 - Piri 75	0,015*
Control - Piri 75	0,020*	Aza 40 - Sp 20	0,078	Cp25 - Sp 20	0,033*
Control - Sp 20	<0,0001*	Ac 200 - Cp 25	0,021*	Piri 75 - Sp 20	<0,0001*

**Figura 4.3:** Proporción de supervivencia en ninfas de segundo estadio de *Bemisia tabaci* expuestas a la MCRC de acetamiprid (Ac 200), azadiractina (Aza 40), cipermetrina (Cp 25), piriproxifén (Piri 75) y spirotetramat (Sp 20) (parte superior de la figura). Resultados de la comparación entre tratamientos por medio de la prueba de logaritmo de rango (parte inferior de la figura), el asterisco denota diferencias significativas entre tratamientos.

Para los tratamientos con la mitad de la MCRC, solo azadiractina y cipermetrina se diferencian significativamente del control provocando un aumento en la mortalidad de las ninfas a lo largo de los cuatro días evaluados (**Figura 4.4**). Azadiractina produjo una mortalidad semejante a la observada para los insecticidas acetamiprid, cipermetrina y spirotetramat pero diferente y mayor a la de piriproxifén. Acetamiprid provocó una mortalidad solo diferente y menor a la de spirotetramat. Spirotetramat causó además una mortalidad diferente y mayor a la de piriproxifén.



Long Rank	p (valor)	Long Rank	p (valor)	Long Rank	p (valor)
Control - Ac 100	0,404	Aza 20 - Ac 100	<0,0001*	Ac 100 - Piri 37,5	0,95
Control - Aza 20	<0,0001*	Aza 20 - Cp 12,5	0,004*	Ac 100 - Sp 10	<0,0001*
Control - Cp 12,5	0,011*	Aza 20 - Piri 37,5	<0,0001*	Cp 12,5 - Piri 37,5	0,015*
Control - Piri 37,5	0,204	Aza 20 - Sp 10	0,078	Cp 12,5 - Sp 10	0,033*
Control - Sp 10	0,000	Ac 100 - Cp 12,5	0,021*	Piri 37,5 - Sp 10	<0,0001*

**Figura 4.4:** Proporción de supervivencia en ninfas de segundo estadio de *Bemisia tabaci* expuestas a la mitad de la MCRC de acetamiprid (Ac 200), azadiractina (Aza 40), cipermetrina (Cp 25), piriproxifén (Piri 75) y spirotetramat (Sp 20) (parte superior de la figura). Resultados de la comparación entre tratamientos por medio de la prueba de logaritmo de rango (parte inferior de la figura), el asterisco denota diferencias significativas entre

Para todos los insecticidas se calculó la  $CL_{50}$  teniendo en cuenta la mortalidad acumulada a las 72 h postratamiento y cuyos resultados se detallan en la **Tabla 4.2**. Los valores de la  $CL_{50}$  para los insecticidas neurotóxicos evaluados (acetamiprid y cipermetrina) y para el mimético de la hormona juvenil piriproxifén superan los respectivos valores de las MCRC (315,33 mg i.a/L; 30 mg i.a/L; 106 mg i.a /L respectivamente). Estos resultados ponen de manifiesto la baja eficacia de los mismos para el control del segundo estadio ninfal del fitófago *B. tabaci*. Los insecticidas azadiractina y spirotetramat mostraron una mayor eficacia sus valores de  $CL_{50}$  se encuentran por debajo de las MCRC. La susceptibilidad de las ninfas hacia los dos insecticidas fue mayor para azadiractina que para spirotetramat, ya que la  $CL_{50}$  para

azadiractina fue de 18,97 mg i.a/L ( $\approx 50\%$  de la MCRC) mientras que para spirotetramat fue de 17,28 mg i.a/L ( $\approx 100\%$  de la MCRC).

**Tabla 4.2:** Estimación de la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) para ninfas de segundo estadio de *Bemisia tabaci* expuestas a insecticidas utilizados en el CHP para el control de plagas.

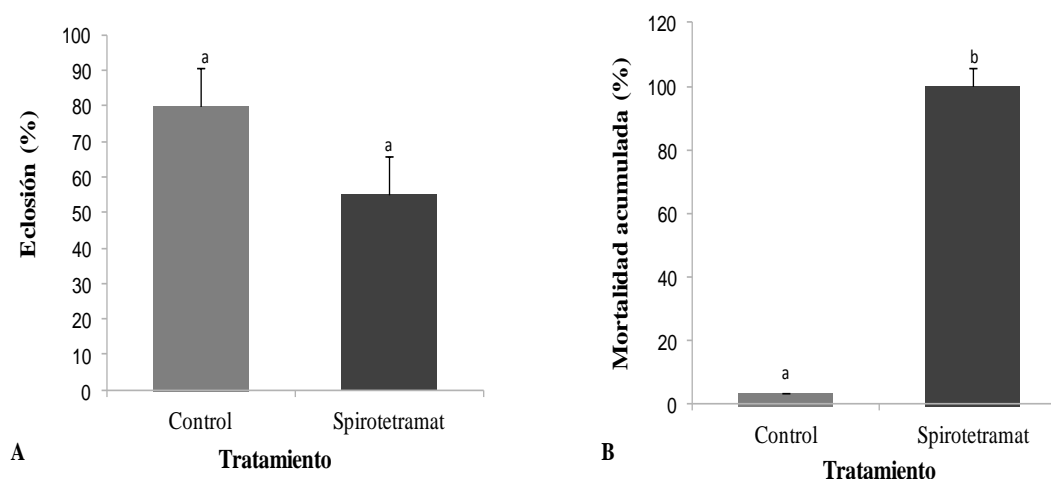
Tratamiento	n <sup>(1)</sup>	b $\pm$ ES <sup>(2)</sup>	CL <sub>50</sub> mg i.a/L (72 h) (95% CL) <sup>(3)</sup>	X <sup>2</sup> (gl) <sup>(4)</sup>	G (0,95) <sup>(5)</sup>
Acetamiprid	120	3,52 ( $\pm 0,96$ )	315,33 (304,87-326,77)	1,31 (2)	9,03
Cipermetrina	150	1,97 ( $\pm 0,37$ )	30,05 (22,93-45,30)	0,91 (3)	0,26
Azadiractina	150	2,26 ( $\pm 0,44$ )	18,97 (14,77 -24,04)	0,97 (3)	0,12
Piriproxifén	120	3,40 ( $\pm 0,86$ )	106 (47,35-41.901,2)	1,64 (2)	0,96
Spirotetramat	150	3,52 ( $\pm 0,96$ )	17,28 (10,05-242,53)	2,46 (3)	0,68

<sup>(1)</sup> Número total de individuos tratados <sup>(2)</sup> b: valor de la pendiente <sup>(3)</sup> ES error estándar Límites de confianza al 95%

<sup>(4)</sup> X<sup>2</sup>: valores prueba de ajuste Chi- Cuadrado <sup>(5)</sup> G: valores prueba G de bondad de ajuste.

### Evaluación de la toxicidad de spirotetramat en huevos y adultos de *B. tabaci*

**Efecto ovicida:** el tratamiento con spirotetramat a la MCRC (20 mg i.a/L) no mostró efecto ovicida en huevos de *B. tabaci* (**Figura 4.5a**). Tampoco se observaron efectos letales ni en la fase móvil ni en la fase sésil del primer estadio ninfal 24 h después de la fijación, mientras que a las 96 h postratamiento se observó una mortalidad del 100 % en este estadio (**Fig. 4.5b**).



**Figura 4.5:** Toxicidad de spirotetramat sobre huevos (eclosión) y ninfas de primer estadio (mortalidad a las 96 h postratamiento) de *Bemisia tabaci*. Los datos corresponden a valores medios  $\pm$  ES a) Número de ninfas del primer estadio fijas tras la eclosión. ANOVA F= 5,17; gl= 1,4; p= 0,08 b) Mortalidad acumulada en ninfas del primer estadio (fase fija) ANOVA F= 8,41, gl= 1,4; p= 0,00.

**Efecto sobre el comportamiento de oviposición:** La **Tabla 4.3** muestra la cantidad de huevos puestos por día sobre hojas de pimiento/algodón tratadas con spirotetramat. Este insecticida inhibió la oviposición de las hembras (oviposición casi nula) en todas las franjas horarias observadas. El efecto disuasorio de la oviposición fue >90 % en todos los casos.

**Tabla 4.3:** Comportamiento de oviposición de hembras adultas de *Bemisia tabaci* sobre superficie tratada (hoja) con un residuo de insecticida de 24, 48,72 y 96 h postratamiento. Los datos corresponden a valores medios  $\pm$  ES

Tratamiento/ Concentración	Cantidad de huevos observados			
	24 h <sup>(1)</sup>	48 h <sup>(1)</sup>	72 h <sup>(1)</sup>	96 h <sup>(2)</sup>
Control (0 mg i.a/L)	1,23 ( $\pm$ 0,038) <b>a</b>	1,36 ( $\pm$ 0,04) <b>a</b>	1,41 ( $\pm$ 0,04) <b>a</b>	26,5 (4,11) <b>a</b>
Spirotetramat (20 mg i.a/L)	0,030 ( $\pm$ 0,038) <b>b</b>	0,07 ( $\pm$ 0,04) <b>b</b>	0,10 ( $\pm$ 0,04) <b>b</b>	0,60 (1,07) <b>b</b>
<i>Análisis Estadístico</i>	F= 487,86 gl= 1,18 p<0,0001	F= 417,93 gl= 1,18 p<0,0001	F= 408,94 gl= 1,18 p<0,0001	K= 15,21 p<0,0001
<i>Efecto Disuasorio de la oviposición (%)</i>	97,56	94,85	92,90	97,73

<sup>(1)</sup> Prueba de ANOVA <sup>(2)</sup> Prueba de Kruskal Wallis, letras diferentes dentro de cada columna denotan diferencias significativas entre tratamientos.

#### 4.4 Discusión

En Argentina, el control químico, a través de la utilización excesiva de insecticidas de amplio espectro, ha prevalecido como único método de control para el “complejo *B. tabaci*”, hecho que provocó la aparición del fenómeno de resistencia por parte de la plaga y la supresión de sus principales enemigos naturales (Cáceres, 2005). Las nuevas tendencias en el control de plagas a nivel mundial abogan por el uso conjunto de insecticidas selectivos y enemigos naturales en el marco del MIP (Kogan y Jepson, 2007). La selección de materias activas selectivas y de menor impacto sobre el ecosistema resulta imprescindible para una agricultura sustentable. Es así que desde la década de los 90' surge una nueva era de plaguicidas con nuevos “modos de acción” denominados “biorracionales”. Todos los insecticidas evaluados en el presente capítulo, con excepción de cipermetrina (insecticida convencional), pertenecen a este nuevo grupo de insecticidas. De acuerdo a las clasificaciones *a priori* de las empresas fabricantes así como las de la Agencia de Estudios Medioambientales de Estados Unidos (USEPA, [www.epa.gov](http://www.epa.gov)), los insecticidas biorracionales poseen una mayor

especificidad que los insecticidas convencionales, son poco persistentes en el ambiente, pueden ser de origen natural o sintético y poseen diferentes modos de acción (neurotóxicos, reguladores del crecimiento, antialimentarios, o mixto).

Comprender el efecto que los mismos tienen sobre el huésped en un sistema huésped - parasitoide como lo son *B. tabaci* - *E. mundus* es de suma importancia, en función de compatibilizar el control químico con organismos benéficos antes de diseñar un programa de MIP para un determinado cultivo y para una región específica.

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado los resultados del bioensayo de toxicidad por inmersión sobre el segundo estadio ninfal de *B. tabaci* aportan evidencia acerca de la susceptibilidad de las mismas frente a los diferentes grupos de insecticidas evaluados en esta tesis. El insecticida azadiractina mostró una elevada toxicidad sobre las ninfas, provocando una disminución en la supervivencia acompañada de una alta mortalidad acumulada, tanto a la MCRC como en el rango de concentraciones testeadas por debajo de ella. Resultados similares han sido reportados por Coudriet *et al.*, (1985) quienes observaron un alto porcentaje de mortalidad en ninfas de *B. tabaci* tratadas con productos a base del aceite obtenido a partir de semillas del árbol de Neem. Molina *et al.*, (1997) observaron también que el extracto acuoso y el aceite de Neem causaron la mayor mortalidad en las diferentes fases de desarrollo de *B. tabaci* en cultivos experimentales de melón, siendo el aceite más efectivo que el extracto acuoso. Otros autores también han documentado el alto poder insecticida de este producto sobre los diferentes estados del ciclo de vida de *B. tabaci* (huevos, ninfas, pupas y adultos) como por ejemplo Price y Schuster, (1991); Liu y Stansly, (1995); Kumar *et al.*, (2005); Cruz Estrada *et al.*, (2013) como así también en otros insectos fitófagos como *Liriomyza huidobrensis* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) (Iannacone y Reyes, 2001); *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) (Salas y Mendoza, 2001); *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae) y *Macrostelus quadripunctulatus* Kirschbaum (Hemiptera: Cicadellidae) (Boursier *et al.*, 2011). La reducción en la supervivencia puede ser atribuida a los efectos antialimentarios y reguladores del crecimiento /desarrollo y concuerda con lo que ha sido reportado por otros investigadores para diferentes grupos de insectos como Himenópteros, Coleópteros, Lepidópteros, Hemípteros (Pradhan y Jotwani, 1971; Meisner *et al.*, 1976; Ladd *et al.*, 1978; Warthen, 1979; Schmutterer y Rembold, 1980; Mordue y Blackwell, 1993; Simmonds y Blaney, 1996; Saxena *et al.*, 1998; Veitch *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009).

De los resultados de los ensayos con spirotetramat se desprende que este producto es tóxico para las ninfas de segundo estadio, reduciendo su supervivencia, aunque este efecto tiende a ser menos pronunciado que el de la azadiractina. Esto se puede corroborar a través del análisis de la mortalidad (probit), en donde el valor de  $CL_{50}$  para este insecticida fue muy cercano a la MCRC. Los resultados obtenidos en la presente tesis concuerdan con lo reportado por Nauen *et al.*, (2008) y Brück *et al.*, (2009) quienes encontraron una alta efectividad de spirotetramat para el control de estadios juveniles de moscas blancas. Efectos similares fueron observados para ninfas del segundo estadio de *B. tabaci* (Liu, 2004; Nauen y Konaz, 2005) y *T. vaporariorum* (Prabhaker *et al.*, 2008) tratadas con el insecticida spiromesifen (derivado del ácido tetrónico con similar modo de acción que spirotetramat). También existen reportes acerca de la eficacia de ambos insecticidas para estados preimaginales de plagas succionadoras incluyendo áfidos (*Aphis sp.*, *Myzus sp.*, *Dysaphis sp.*), psílidos (*Psylla sp.*, *Paratrioza cockerelli* Sulc), cochinillas (*Ceroplastes sp.*, *Pulvinaria sp.*, *Aonidiella sp.*, *Pseudococcus sp.*, *Planococcus sp.*) (Nauen *et al.*, 2008; Brück *et al.*, 2009) y ácaros como *Tetranychus urticae* Koch (Prostigmata: Tetranychidae) (Nauen y Konaz, 2005; Marcic *et al.*, 2011).

Cipermetrina fue menos efectiva ya que dejó una mayor proporción de ninfas supervivientes que los insecticidas anteriormente mencionados. El valor de la  $CL_{50}$  para la cipermetrina fue superior a la MCRC. La baja eficacia de los piretroides, como cipermetrina para el control de *B. tabaci* ha sido bien documentada desde hace ya varios años y los resultados encontrados en este trabajo concuerdan con estas observaciones. Cabe señalar que ésta se encuentra asociada a casos de resistencia (Prabhaker *et al.*, 1985; Palumbo *et al.*, 2001; Mushtaq *et al.*, 2001; Roditakis *et al.*, 2005; Castle *et al.*, 2010) habiéndose estudiado y descrito los mecanismos de detoxificación para este grupo de insecticidas en *B. tabaci* (Shchukin y Wool, 1994; Byrne *et al.*, 2000, Roditakis *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos para piriproxifén (insecticida mimético de la hormona juvenil) y acetamiprid (insecticida neonicotinoide) fueron muy similares a los obtenidos para cipermetrina, en estos se ve una disminución en la susceptibilidad de las ninfas, un aumento en la supervivencia y valores de  $CL_{50}$  superiores a las MCRC para ambos insecticidas. Estos resultados coinciden con los reportados por varios investigadores para diferentes insecticidas pertenecientes tanto al grupo de los reguladores del crecimiento como para el grupo de los neonicotinoides, que además están asociados a fenómenos de resistencia (Otoïdobia *et al.*, 2003; Strassera *et al.*,

2007b; Schuster *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2013; Basit *et al.*, 2013). Si bien la mayoría de los reportes asocian la disminución de la eficacia y el consecuente incremento en la concentración de insecticida utilizada a fenómenos de resistencia en *B. tabaci*, los resultados de los ensayos realizados en el marco de la presente tesis no permiten arribar a la misma conclusión ya que serían necesarios, estudios complementarios. En las presentes evaluaciones se pudo observar cierta tolerancia de las ninfas de segundo estadio de *B. tabaci* hacia los insecticidas cipermetrina, acetamiprid y piriproxifén.

Spirotetramat no causó efecto ovicida en el tratamiento de huevos de *B. tabaci*. Sin embargo los primeros estadios ninfales que emergieron de los huevos tratados murieron poco después de su fijación en la hoja. Esto podría explicarse por la acción sistémica o por los residuos del insecticida. Este resultado coincide con lo reportado por Marcic *et al.*, (2011) quienes encontraron efectos similares en huevos de *T. urticae*, tratados con este insecticida. Liu, (2004) también observó el mismo efecto en huevos de *B. tabaci* tratados con spiromesifen.

En el ensayo realizado con adultos de *B. tabaci*, spirotetramat tuvo un efecto muy marcado sobre el comportamiento de oviposición, observándose un efecto disuasorio superior al 90 %, en todas las franjas horarias observadas. Varios autores hacen referencia a la reducción en la fertilidad y en la fecundidad que provoca este insecticida en adultos de ácaros, áfidos y otros géneros de moscas blancas (Nauen *et al.*, 2008; Brück *et al.*, 2009; Marcic *et al.*, 2012) pero es escasa la literatura referida a los efectos de este insecticida sobre el comportamiento de oviposición. Este resultado coincide con lo reportado por Tucuch Haas *et al.*, (2010) quienes observaron una preferencia para ovipositar en plantas de *C. annuum* no tratadas con spiromesifen en *Bactericera cockerelli* Sulc (Hemiptera: Psyllidae) tras la realización de un ensayo de elección de oviposición en plantas tratadas y no tratadas con este insecticida.

Como conclusión de este capítulo se puede establecer un orden en la susceptibilidad de las ninfas de segundo estadio de *B. tabaci* hacia los diferentes productos evaluados: azadiractina  $\geq$  spirotetramat  $\gg$  cipermetrina  $>$  acetamiprid  $>$  piriproxifén.

Asimismo los resultados obtenidos demuestran que los insecticidas azadiractina y spirotetramat, fueron altamente eficientes en el control de las ninfas de segundo estadio de *B. tabaci* en condiciones de laboratorio con respecto al resto de los insecticidas evaluados (acetamiprid, cipermetrina y piriproxifén) en este capítulo. La

elevada efectividad de estos principios activos radica en que empleando una dosis más baja de la recomendada a campo, se obtiene un alto porcentaje de mortalidad en las ninfas y que al ser insecticidas de nueva formulación, no existen aún posibilidades de resistencia del fitófago frente a estos. Teniendo en cuenta lo antes dicho y por ser estos productos de menor toxicidad que los utilizados actualmente para el control de moscas blancas dentro del CHP, resultan una alternativa muy ventajosa para el manejo de esta plaga dentro del cultivo de pimiento. Sin embargo estos resultados deberán ser tomados como preliminares, siendo necesario comprobar el efecto de los mismos en las aplicaciones a campo como así también la selectividad de estos insecticidas sobre los enemigos naturales (abordado en los capítulos 5 y 6 de la presente tesis para el parasitoide *E. mundus*) asociados al complejo *B. tabaci*.



## CAPÍTULO 5

“Estudios ecotoxicológicos de los efectos secundarios de acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat sobre pupas de *Eretmocerus mundus*”

## 5.1 Introducción

El estudio de los efectos de los plaguicidas sobre organismos no blanco y benéficos ha sido abordado a nivel internacional desde la década de los 80' (Hassan *et al.*, 1985) y actualmente se ha intensificado su relevancia desde un punto de vista más ecológico (Stark *et al.*, 2007). En Argentina, sin embargo, estos estudios aún son incipientes, si bien desde el año 2005 se vienen realizando estudios sobre el efecto adverso de los plaguicidas en artrópodos benéficos (Schneider *et al.*, 2004, 2008, 2009; Rimoldi *et al.*, 2008, 2012 a, b; Francesena *et al.*, 2008, 2012, 2013; Fogel *et al.*, 2009, 2013; Benamú *et al.*, 2010, 2013; Haramboure *et al.*, 2010, 2013; Mirande *et al.*, 2010). La evaluación de la selectividad de los insecticidas y sus efectos sobre los enemigos naturales depende de varios factores como el tipo de sustancia química utilizada, la concentración de la misma, la vía de exposición y el estado de desarrollo de los organismos estudiados.

Los estados protegidos de los insectos (ej. huevo, pupa) poseen en general una barrera que dificulta o impide la llegada del insecticida hasta el sitio específico de acción. Por ejemplo la pupa representa uno de los estados protegidos en los insectos holometábolos endopterigotas; durante este estado, el insecto en formación no se alimenta, en la mayor parte de los casos es inmóvil y generalmente se encierra en una cubierta protectora sufriendo dentro de ella una reorganización morfológica y fisiológica que culmina con la formación del insecto adulto o imago (Chapman, 1998).

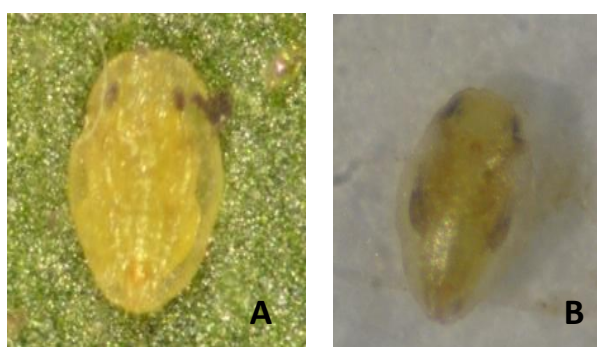
En *E. mundus*, el desarrollo pupal ocurre en el interior de la ninfa de *B. tabaci*, este proceso dura aproximadamente cinco días a 25°C (Urbaneja *et al.*, 2007; Zandi Sohani *et al.*, 2009; Chacon Castro *et al.*, 2010). Los cambios morfológicos que ocurren dentro de este estado pueden observarse con cierta facilidad bajo lupa binocular (Liu y Stansly, 1996).

El objetivo del presente capítulo fue evaluar los efectos secundarios (letales y subletales) de los insecticidas acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén, spirotetramat, utilizados para el control de plagas succionadoras en cultivos hortícolas, sobre pupas de *E. mundus*.

## 5.2 Materiales y Métodos

### 5.2.1 Bioensayos

Para los ensayos se utilizaron ninfas de cuarto estadio parasitadas de *B. tabaci* (*E. mundus* al estado de pupa), en dos estadios morfológicos bien diferenciados dentro del desarrollo pupal de *E. mundus*. Uno de ellos puede visualizarse trascurridas 48 h desde el inicio de la pupación (aproximadamente 12 días tras la oviposición) y el otro cercano a la emergencia del imago, donde se observa el adulto farado (aproximadamente 5 días de iniciado el proceso de pupación Urbaneja *et al.*, 2007) (**Figura 5.1**).



**Figura 5.1:** Estados morfológicos de la pupa de *Eretmocerus mundus* utilizados en los ensayos de inmersión **A**) pupa 48 h de edad **B**) pupa donde se puede observar el adulto farado (5 días de edad).

Las pupas se obtuvieron de la cría masiva de laboratorio y fueron criadas separadamente a partir de cohortes de ninfas de *B. tabaci* expuestas al parasitoide por espacio de 24 h.

Previo al inicio del ensayo de toxicidad las pupas fueron pegadas en cuadrados de cinta adhesiva doble faz (1cm x 1cm), posteriormente fueron sumergidas (empleando el método de inmersión descrito en el capítulo 3 sección 3.4.2) durante 10 s, en las diferentes soluciones de insecticidas y se dejaron secar bajo campana durante 30 min. Una vez seco el residuo, se acondicionaron en cápsulas de Petri (6cm x 1cm) y fueron llevadas a cámara de cría ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; 16:8 L: O;  $75 \pm 5$  % HR) donde se controlaron periódicamente hasta la emergencia del adulto (**Figura 5.2**).



**Figura 5.2:** Esquema de la metodología utilizada en los bioensayos de inmersión de pupas de *Eretmocerus mundus*.

Para todos los insecticidas se eligieron dos concentraciones (MCRC y la mitad de la misma) como se detalla en la **Tabla 5.1**. Las soluciones fueron preparadas utilizando agua destilada como disolvente, mientras que para el control se utilizó solo agua destilada. Se realizaron 5 réplicas de seis individuos por concentración, estado morfológico e insecticida utilizado. Como puntos finales se evaluaron: a) el porcentaje de emergencia y b) la longevidad de los adultos. Las pupas de las cuales no emergieron adultos se disecaron bajo lupa binocular para evaluar c) malformaciones y anomalías teratológicas como así también para registrar d) el estado en el cual se interrumpió el desarrollo.

**Tabla 5.1:** Insecticidas y concentraciones utilizados en los ensayos con pupas de *Eretmocerus mundus*.

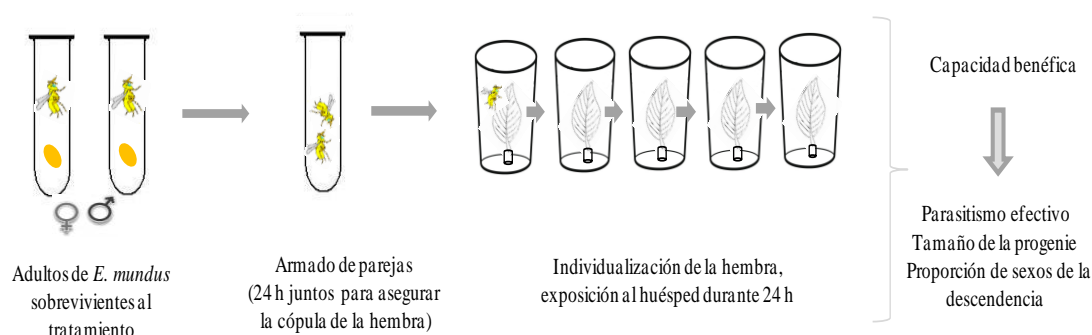
<i>Ingrediente Activo</i>	<i>Nombre comercial</i>	<i>Concentración (mg i.a/L)</i>
<b>Acetamiprid</b>	Mospilan®	200
		100
<b>Azadiractina</b>	Neem-Azal®	40
		20
<b>Cipermetrina</b>	Glextrin25®	25
		12,5
<b>Piriproxifén</b>	Epingle®	75
		37,5
<b>Spirotetramat</b>	Movento®	20
		10

### *Evaluación de la capacidad reproductiva de las hembras del parasitoide sobrevivientes a la exposición a los insecticidas*

Para aquellas concentraciones de insecticida (azadiractina 20 mg i.a/L, cipermetrina 12,5 mg i.a/L, spirotetramat 10 mg i.a/L) en donde se obtuvo un porcentaje de emergencia  $\geq$  al 20 % y una longevidad  $\geq$  a 5 días, sólo en el tratamiento que se realizó en las pupas de 48 h, se evaluaron los efectos sobre la capacidad reproductiva de las hembras sobrevivientes.

Para la medición de la capacidad reproductiva se utilizaron 5 hembras por cada tratamiento y 5 hembras para el control, siendo cada hembra una repetición. Las hembras, expuestas a cópula por 24 h, se colocaron individualmente en un vial de plástico (6,5cm x 8,5cm), tapado en su parte superior con un voile, con una hoja de pimiento (*C. annuum*) que contenía 20-30 ninfas de segundo estadio de *B. tabaci* acondicionada en un vial de plástico con 5ml de agua. Se expusieron las hembras al huésped por 24 h, luego de las cuales fueron retiradas y puestas en otro vial que contenía otra hoja con las mismas características que la primera, repitiendo esta operación durante 5 días consecutivos (**Figura 5.3**).

Los puntos finales evaluados fueron: parasitismo efectivo (número de ninfas que mostraron signos de parasitismo), porcentaje de emergencia de la progenie (porcentaje de adultos emergidos de las ninfas que fueron parasitadas), proporción de sexos (número de hembras / (número de machos + número de hembras)) y longevidad de la progenie.



**Figura 5.3:** Esquema de la metodología utilizada en los bioensayos de evaluación de la capacidad reproductiva de las hembras del parasitoide sobrevivientes.

### 5.2.2 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos en el ensayo de toxicidad llevado a cabo sobre pupas del parasitoide (porcentaje de emergencia y longevidad de adultos) fue realizado por medio de un ANOVA de dos factores para comprobar si existió algún efecto de los dos factores evaluados, a saber: 1- Tratamiento (acetamiprid 200 y 100 mg i.a/L; azadiractina 40 y 20 mg i.a/L; cipermetrina 25 y 12,5 mg i.a/L, piriproxifen 75 y 37,5 mg i.a/L; spirotetramat 20 y 10 mg i.a/L) y 2- Estado morfológico (pupas 48 h de edad / pupas donde se observa el adulto farado) sobre el porcentaje de emergencia y la longevidad de los adultos, y la posible interacción entre estos dos factores. En caso de observar significancia para alguno de los factores se realizó un ANOVA de una vía para analizar el factor por separado. Previamente a ejecutar el ANOVA, se verificó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y mediante la prueba de homocedasticidad de las varianzas de Barlett. Las medias fueron separadas a través de la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Los datos obtenidos en la observación de la interrupción del desarrollo de las pupas de *E.mundus* (cantidad de individuos que interrumpieron su desarrollo en estado de pupa versus cantidad de individuos que interrumpieron su desarrollo en el estado adulto farado) no pudieron ser evaluados estadísticamente (se realizó una descripción de los mismos) debido a que más del 20% de las frecuencias observadas para cada uno de los tratamiento tuvieron un valor de cero.

Para el análisis de los datos del ensayo de capacidad reproductiva en hembras (parasitismo efectivo, porcentaje de emergencia de la progenie, proporción de sexos (primer día de exposición al huésped)) se utilizó un ANOVA de un factor (Tratamiento). Previamente a ejecutar el ANOVA, se verificó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y mediante la prueba de homocedasticidad de las varianzas de Barlett. El análisis *a posteriori* de los datos sometidos a ANOVA, se llevo a cabo mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. La proporción de sexos (acumulada durante cinco días consecutivos) y la longevidad de la progenie fueron analizadas por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis por no cumplirse los supuestos del ANOVA.

Para todos los análisis estadísticos se utilizó un nivel de significancia de  $p \leq 0,05$ . Se utilizó el programa STATGRAPHICS, versión v 4.0 y el programa XL Stat (Addinsoft xlstat para Excel, Paris, Francia, 2009).

### 5.3 Resultados

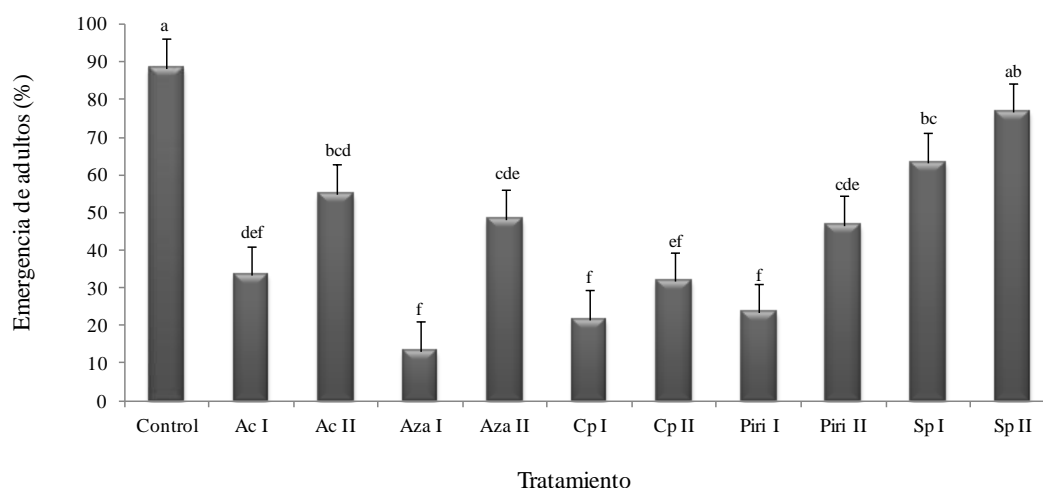
#### Toxicidad de los insecticidas acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat sobre pupas de *E. mundus*

a) Emergencia: El ANOVA de dos factores reveló que tanto los tratamientos como el estado morfológico de las pupas produjeron un efecto significativo sobre la emergencia; además, se detectó una interacción significativa entre ambos factores (Tabla 5.2).

**Tabla 5.2:** Resultados de la prueba de ANOVA de dos factores para evaluar conjuntamente el tratamiento y el estado morfológico sobre el porcentaje de emergencia de adultos de *Eretmocerus mundus*.

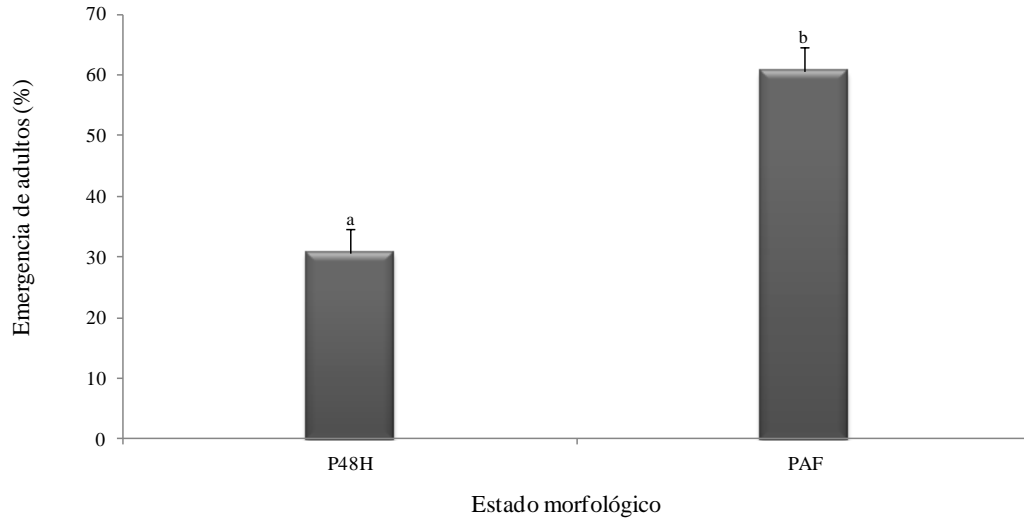
Efecto	SS	g.l	MS	F	p
Tratamiento	56578	10	5657,8	21,47	< 0,0001
Estado morfológico	24752,7	1	24752,7	92,47	< 0,0001
Tratamiento * Estado morfológico	1216,61	10	1216,61	4,55	< 0,0001

Cuando se evaluó estadísticamente el porcentaje de emergencia del adulto en función del tratamiento se observaron diferencias significativas con respecto al control en todos los tratamientos con excepción de spirotetramat 10 mg i.a/L (ANOVA de un factor;  $F= 9,26$ ;  $g.l= 10,99$ ;  $p < 0,0001$ ). Azadiractina 40 mg i.a/L fue el insecticida más tóxico (las pupas se tornaban oscuras y se deshidrataban dentro de las 72 h postratamiento) mientras que spirotetramat mostro la menor toxicidad a la mitad de la MCRC (Figura 5.4)



**Figura 5.4:** Emergencia de adultos de *Eretmocerus mundus* expuestos a insecticidas durante su etapa de pupa dentro de su huésped *Bemisia tabaci*. Los datos corresponden a valores medios  $\pm$  ES. Prueba de ANOVA de un factor ( $F= 9,26$ ;  $g.l= 10,99$ ;  $p < 0,0001$ ), letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas. AcI: acetamiprid 200 mg i.a/L, AcII: acetamiprid 100 mg i.a/L, AzaI: azadiractina 40 mg i.a/L, AzaII: azadiractina 20 mg i.a/L, CpI: cipermetrina 25 mg i.a/L, CpII: cipermetrina 12, 5 mg i.a/L, PiriI: piriproxifén 75 mg i.a/L, PiriII: piriproxifén 37, 5 mg i.a/L, SpI: spirotetramat 20 mg i.a/L, SpII: spirotetramat 10 mg i.a/L.

También se encontraron diferencias significativas cuando se evaluó el porcentaje de emergencia del adulto en función del estado morfológico expuesto, observándose un mayor porcentaje de emergencia para el estado donde se observa el adulto farado (ANOVA de un factor,  $F= 28,96$ ;  $g.l= 10,99$ ;  $p < 0,0001$ ) (**Figura 5.5**)



**Figura 5.5:** Emergencia de adultos de *Eretmocerus mundus* expuestos a insecticidas en dos estados morfológicos (pupa 48 h de edad: P48H y pupa donde se observa el adulto farado: PAF) durante su etapa de pupa dentro de su huésped *Bemisia tabaci*. Los datos corresponden a valores medios  $\pm$  ES. Prueba de ANOVA de un factor ( $F= 28,96$ ;  $g.l= 10,99$ ;  $p < 0,0001$ ), letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

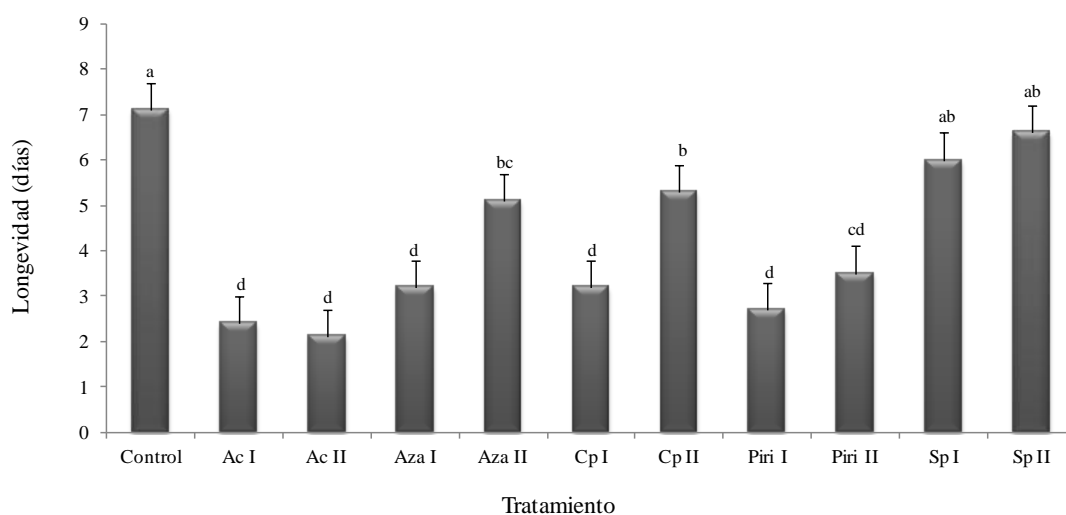


b) Longevidad: Aquí también el análisis de ANOVA de dos factores reveló que tanto los tratamientos como el estado morfológico de las pupas produjeron un efecto significativo sobre la longevidad de los adultos que lograron emerger; además, se detectó una interacción significativa entre ambos factores (**Tabla 5.3**)

**Tabla 5.3:** Resultados de la prueba de ANOVA de dos factores para evaluar conjuntamente el tratamiento y el estado morfológico sobre la longevidad de los adultos que lograron emerger de las pupas de *Eretmocerus mundus* tratadas con diferentes insecticidas.

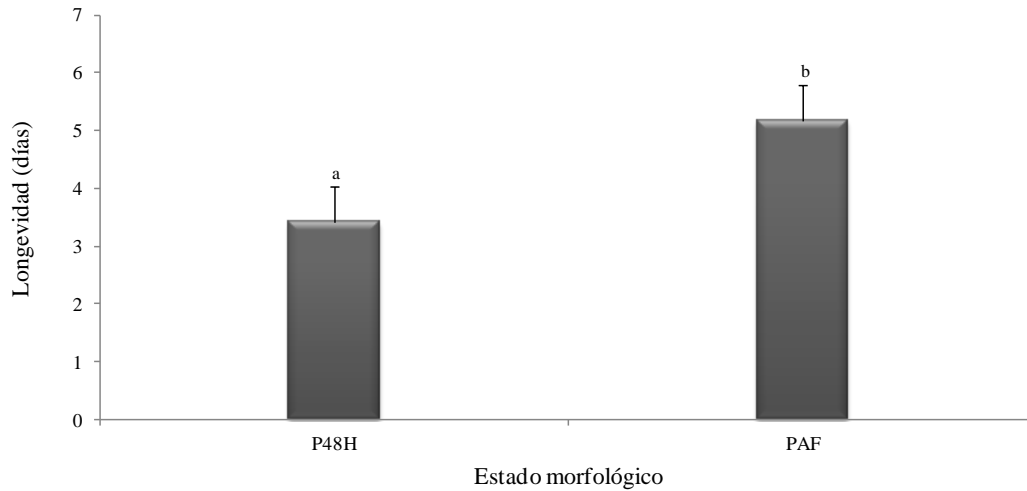
<i>Efecto</i>	<b>SS</b>	<b>g.l</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<i>Tratamiento</i>	233,05	10	23,30	10,86	< 0,0001
<i>Estado morfológico</i>	61,12	1	61,12	28,49	< 0,0001
<i>Tratamiento * Estado morfológico</i>	112,87	10	11,28	5,26	< 0,0001

Al evaluar estadísticamente la longevidad de los adultos que lograron emerger de las pupas de *E. mundus* tratadas con los diferentes insecticidas se observaron diferencias significativas con respecto al control en todos los tratamientos con excepción de spirotetramat (20 mg i.a/L y 10 mg i.a/L) (ANOVA de un factor  $F= 8,96$ ;  $g.l= 10,99$ ;  $p < 0,0001$ ). Acetamiprid (200 mg i.a/L y 100 mg i.a/L) fue el insecticida más tóxico, los individuos que emergieron de las pupas tratadas con este insecticida solo lograron vivir dos días aproximadamente mientras que ambas concentraciones evaluadas de spirotetramat mostraron la menor toxicidad y permitieron una longevidad de entre cinco y seis días aproximadamente (**Figura 5.6**).



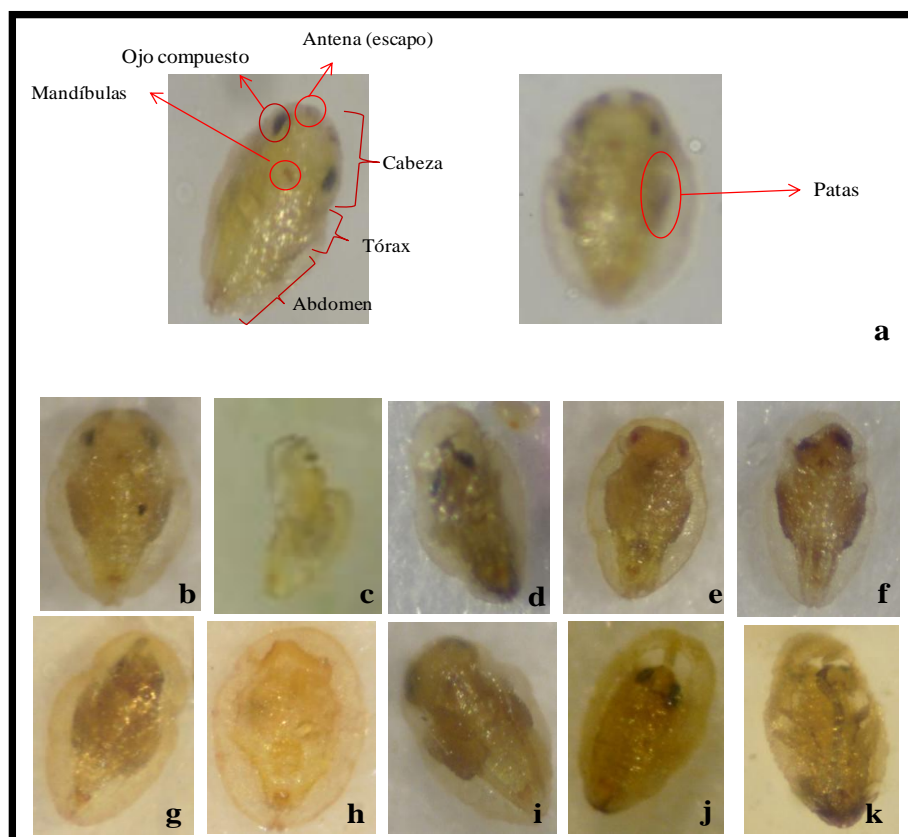
**Figura 5.6:** Longevidad de los adultos que lograron emerger de las pupas de *Eretmocerus mundus* tratadas con diferentes insecticidas. Los datos corresponden a valores medios  $\pm$  ES. Prueba de ANOVA de un factor ( $F= 8,96$ ;  $g.l= 10,99$ ;  $p < 0,0001$ ), letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas. AcI: acetamiprid 200 mg i.a/L, AcII: acetamiprid 100 mg i.a/L, AzaI: azadiractina 40 mg i.a/L, AzaII: azadiractina 20 mg i.a/L, CipI: cipermetrina 25 mg i.a/L, CipII: cipermetrina 12, 5 mg i.a/L, PiriI: piriproxifén 75 mg i.a/L, PiriII: piriproxifén 37, 5 mg i.a/L, SpI: spirotetramat 20 mg i.a/L, SpII: spirotetramat 10 mg i.a/L.

Además se encontraron diferencias significativas cuando se evaluó la longevidad en función del estado morfológico expuesto, observándose una mayor longevidad en los adultos que emergieron de las pupas que fueron tratadas en el estado donde se observa el adulto farado (ANOVA de un factor,  $F= 15,72$ ;  $g.l=1,108$ ;  $p < 0,0001$ ) (**Figura 5.7**).



**Figura 5.7:** Longevidad de los adultos emergentes de *Eretmocerus mundus* expuestos a insecticidas en dos estados morfológicos (pupa 48 h de edad: P48H y pupa donde se observa el adulto farado: PAF) durante su etapa de pupa dentro de su huésped *Bemisia tabaci*. Los datos corresponden a valores medios  $\pm$  ES. Prueba de ANOVA de un factor ( $F= 15,72$ ;  $g.l=1,108$ ;  $p < 0,0001$ ), letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

c) Malformaciones y anomalías: solo se observaron efectos subletales teratológicos en las pupas de 48 h de edad tratadas con cuatro (acetamiprid, azadiractina, cipermetrina y piriproxifén) de los cinco insecticidas evaluados (**Figura 5.8 d-k**). Piriproxifén produjo interrupción en el desarrollo de antenas (**Figura 5.8 j**) y alas (**Figura 5.8 k y Figura 5.9**). Los individuos en formación dentro de las pupas de *E.mundus* tratadas con los insecticidas neurotóxicos acetamiprid y cipermetrina mostraron ojos compuestos de mayor tamaño y más oscuros (**Figuras 5.8 d, i**). Además en los tratados con cipermetrina, se observaron individuos muertos al emerger (cabeza asomando del orificio de salida), lo que indicaría que murieron posteriormente al perforar el tegumento del huésped con sus mandíbulas al iniciar la emergencia (**Figura 5.10**). La mayoría de las pupas tratadas con azadiractina se tornaron oscuras y se deshidrataron 72 h postratamiento, como se mencionó anteriormente, por lo que se dificultó su disección. Sin embargo en las pupas donde el oscurecimiento no fue tan marcado se observó un adelgazamiento en la región del abdomen de los individuos en formación (**Figura 5.8 f, g**). Spirotetramat no causó efectos teratológicos en las pupas expuestas (**Figura 5.8 b, c**).



**Figura 5.8:** Efectos teratológicos de insecticidas de amplio uso en el CHP sobre pupas (48 h de edad) de *Eretmocerus mundus* **a)** control, **b)** spirotetramat 20 mg i.a/L, **c)** spirotetramat 10 mg i.a/L, **d)** acetamiprid 200 mg i.a/L, **e)** acetamiprid 100 mg i.a/L, **f)** azadiractina 40 mg i.a/L, **g)** azadiractina 20 mg i.a/L, **h)** cipermetrina 25 mg i.a/L, **i)** cipermetrina 12,5 mg i.a/L, **j)** piriproxifén 75 mg i.a/L, **k)** piriproxifén 37,5 mg i.a/L.



**Figura 5.9:** Individuo de *E.mundus* expuesto al insecticida piriproxifén (37,5 mg i.a/L) en el estado de pupa. El círculo rojo denota la malformación en el par de alas anteriores.

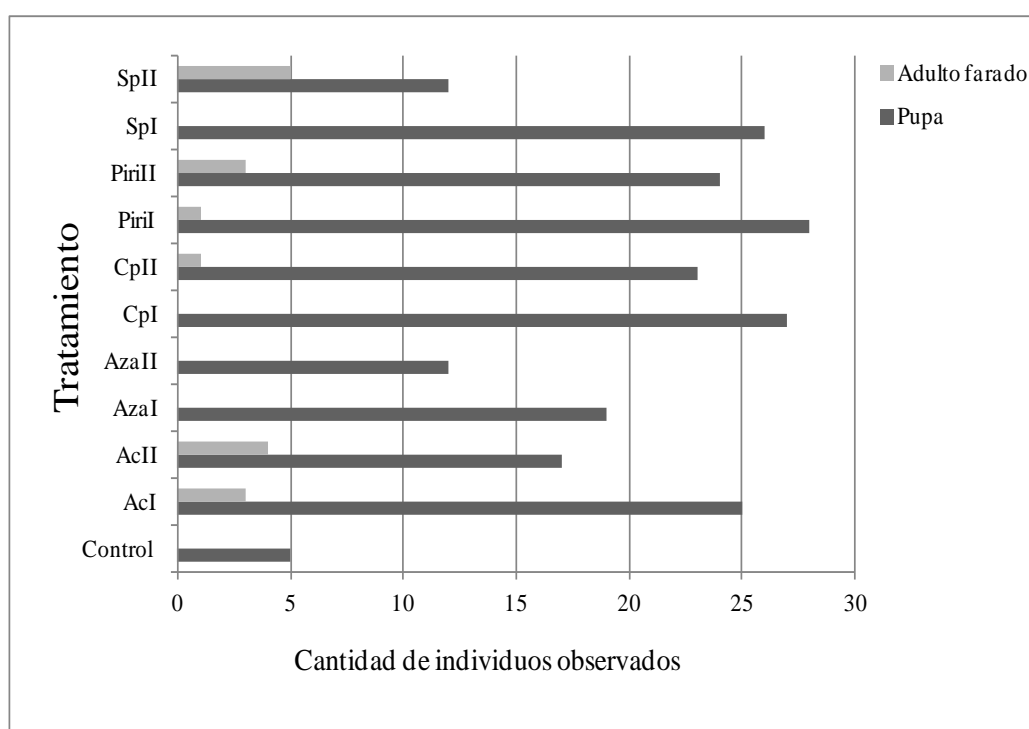


**Figura 5.10:** Pupas de *E.mundus* tratadas con cipermetrime donde se encontraron individuos muertos asomando la cabeza por el orificio de salida de la exuvia.



d) Interrupción en el desarrollo: Los resultados de la disección de pupas de 48 h de edad para evaluar en qué momento se interrumpió el desarrollo del parasitoide *E.mundus* muestran que todos los insecticidas utilizados interrumpieron el desarrollo normal durante el periodo de intermuda pupa-adulto independientemente de la concentración utilizada.

En los tratamientos realizados con acetamiprid (200 mg i.a/L y 100 mg i.a/L), cipermetrina (12,5 mg i.a/L), piriproxifén (75 mg i.a/L y 37,5 mg i.a/L) y spirotetramat (10 mg i.a/L) se observó tanto la presencia de individuos que interrumpieron su desarrollo en el estado de pupa como de individuos que interrumpieron su desarrollo al llegar al estado de adulto farado. En estos tratamientos se vio además, más cantidad de individuos en el estado de pupa que en el estado adulto farado. Para los insecticidas azadiractina (40 mg i.a/L y 20 mg i.a/L), cipermetrina (25 mg i.a/L) y spirotetramat (20 mg i.a/L) solo se encontraron individuos que interrumpieron su desarrollo en el estado de pupa (**Figura 5.11**).



**Figura 5.11:** Cantidad de individuos encontrados por estado y por tratamiento tras la disección de las pupas de *Eretmocerus mundus*. AcI: acetamiprid 200 mg i.a/L, AcII: acetamiprid 100 mg i.a/L, AzaI: azadiractina 40 mg i.a/L, AzaII: azadiractina 20 mg i.a/L, CipI: cipermetrina 25 mg i.a/L, CipII: cipermetrina 12, 5 mg i.a/L, PiriI: piriproxifén 75 mg i.a/L, PiriII: piriproxifén 37, 5 mg i.a/L, SpI: spirotetramat 20 mg i.a/L, SpII: spirotetramat 10 mg i.a/L.

### **Efectos subletales sobre la capacidad reproductiva de las hembras del parasitoide sobrevivientes a la exposición a los insecticidas**

La capacidad reproductiva en las hembras del parasitoide sobrevivientes al tratamiento de inmersión sólo pudo ser evaluada para los insecticidas azadiractina (20 mg i.a/L), cipermetrina (12,5 mg i.a/L) y spirotetramat (10 mg i.a/L), ya que estos insecticidas dejaron  $\geq 20$  % de organismos sobrevivientes los cuales además mostraron una longevidad  $\geq 5$  días.

Los efectos de los insecticidas evaluados sobre los puntos finales de este ensayo fueron los siguientes: sobre el parasitismo efectivo (número de ninfas que muestran signos de parasitismo) solo azadiractina y cipermetrina mostraron una disminución del 47,67 % y 53,15 % respectivamente con respecto al control, a los cinco días de exposición al huésped (**Tabla 5.4**). En cuanto al porcentaje de emergencia de la progenie (porcentaje de adultos emergidos de las ninfas que fueron parasitadas) solo azadiractina fue significativamente diferente del control al primer día de exposición al huésped ( $F= 2,58$ ;  $g.l= 3,16$ ;  $p= 0,01$ ). Al finalizar los cinco días de exposición, ninguno de los insecticidas evaluados fue significativamente diferente del control ( $F= 0,74$ ;  $g.l= 3,16$ ;  $p= 0,54$ ).

La proporción de sexos (número de hembras / (número de machos + número de hembras)) de la progenie no fue significativamente diferente del control tanto para el primer ( $F=0,30$ ;  $g.l=3,13$ ;  $p= 0,82$ ) como para el quinto día ( $K= 0,03$ ;  $p=8,70$ ) de exposición al huésped, en ninguno de los tres insecticidas. Finalmente se observó una disminución significativa de la longevidad de la progenie en los tres insecticidas con respecto al control (**Tabla 5.4**).

**Tabla 5.4:** Efectos subletales de azadiractina, cipermetrina y spirotetramat sobre la capacidad reproductiva de las hembras del parasitoide sobrevivientes al tratamiento de inmersión en pupas. Los datos corresponden a valores medios  $\pm$  ES.

Tratamiento/ Concentración	Parasitismo efectivo <sup>(1)</sup> (1 <sup>er</sup> día de exposición al huésped %)	Parasitismo efectivo <sup>(1)</sup> (acumulado durante 5 días consecutivos %)	Porcentaje de emergencia de la progenie <sup>(2)</sup> (1 <sup>er</sup> día de exposición al huésped )	Porcentaje de emergencia de la progenie <sup>(1)</sup> (acumulado durante 5 días consecutivos)	Proporción de sexos de la progenie <sup>(1)</sup> (1 <sup>er</sup> día de exposición al huésped %)	Proporción de sexos de la progenie <sup>(2)</sup> (acumulado durante 5 días consecutivos %)	Longevidad de la Progenie <sup>(2)</sup>
Control (0 mg i.a/L)	23,32 ( $\pm$ 11,71) <b>a</b>	38,85 ( $\pm$ 4) <b>a</b>	92 ( $\pm$ 14,12) <b>ab</b>	87,26 ( $\pm$ 3,62) <b>a</b>	0,32 ( $\pm$ 0,14 ) <b>a</b>	0,58 (0,035) <b>a</b>	6,98 (1,39) <b>a</b>
Spirotetramat (10 mg i.a/L)	35,06 ( $\pm$ 11,71) <b>a</b>	32,41 ( $\pm$ 4) <b>a</b>	97,14 ( $\pm$ 14,12) <b>a</b>	92,98 ( $\pm$ 3,62) <b>a</b>	0,32( $\pm$ 0,14 ) <b>a</b>	0,59 (0,031) <b>a</b>	5,26 (1,46) <b>b</b>
Cipermetrina (12,5 mg i.a/L)	31,99 ( $\pm$ 11,71) <b>a</b>	18,20 ( $\pm$ 4) <b>b</b>	69,66 ( $\pm$ 14,12) <b>ab</b>	90,84 ( $\pm$ 3,62) <b>a</b>	0,45 ( $\pm$ 0,15 ) <b>a</b>	0,60 (0,304) <b>a</b>	4,56 (0,69) <b>c</b>
Azadiractina (20 mg i.a /L)	20,66 ( $\pm$ 11,71) <b>a</b>	20,33 ( $\pm$ 4) <b>b</b>	49,28 ( $\pm$ 14,12) <b>b</b>	86,12 ( $\pm$ 3,62) <b>a</b>	0,24 ( $\pm$ 0,18 ) <b>a</b>	0,275 (0,207) <b>a</b>	4,84 (1,25 ) <b>c</b>
<i>Análisis Estadístico</i>	F= 0,34  g.l= 3,16  p= 0,79	F= 6,05  g.l= 3,16  p= 0,0059	F= 2,58  g.l= 3,16  p= 0,01	F= 0,74  g.l= 3,16  p= 0,54	F= 0,30  g.l= 3,13  p= 0,82	K= 0,03  p= 8,70	K= 275,08  p<0,0001

<sup>(1)</sup> Prueba de ANOVA; <sup>(2)</sup> Prueba de Kruskal Wallis; letras diferentes dentro de cada columna denotan diferencias significativas entre tratamientos.

## 5.4 Discusión

Los enemigos naturales (depredadores y parasitoides) por sí solos no siempre pueden mantener las poblaciones de plagas en cultivos por debajo del nivel de daño económico, por lo que es necesario utilizar estrategias de control biológico y muchas veces intervenir con plaguicidas, para obtener un control exitoso. Por regla general, los insecticidas se perciben como sustancias poco compatibles con programas de control biológico debido a su toxicidad hacia insectos benéficos (Blanco y Bernal, 2003), por lo que se requiere más información que permita vislumbrar claramente los alcances y limitaciones al implementar ambas técnicas dentro de un programa de MIP (Stark *et al.*, 2004).

Los insectos benéficos pueden ser afectados por la aplicación de insecticidas a través de diferentes vías, la más común es por contacto con los residuos de estos en las plantas (Croft, 1990). En este proceso las pupas pueden ser fácilmente contaminadas por contacto con gotas del insecticida durante la aplicación del mismo.

Los experimentos con pupas del parasitoide *E. mundus*, mostraron que los insecticidas evaluados afectaron de manera diferencial la emergencia, la longevidad y el desarrollo de los parasitoides adultos.

Así, el insecticida azadiractina fue el más tóxico para *E. mundus*. A la MCRC se observó que más del 85 % de las pupas tratadas murieron, se tornaron oscuras y se deshidrataron. Al mismo tiempo los adultos que lograron emerger no sobrevivieron más allá del segundo día post-emergencia. Si bien el modo de acción de este insecticida es complejo; IGR, antialimentario y repelente entre otros, los efectos observados aquí muestran que muy posiblemente la azadiractina está interfiriendo en el normal desarrollo del insecto, actuando como un antagonista de las HJ y HM (Schmutterer, 1990). Estas observaciones son consistentes con lo reportado por Zuazua *et al.*, (2003) quienes observaron que azadiractina mostró cierto grado de penetración y efecto en el parasitoide *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) en formación dentro de los áfidos momificados del fitófago *Acyrtosiphon pisum* Harris (Hemiptera: Aphididae). Del mismo modo, Saber *et al.*, (2004) encontraron un efecto adverso de este insecticida en la emergencia del parasitoide *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Por el contrario, Luna Cruz *et al.*, (2011) señalaron que azadiractina tuvo un efecto poco significativo sobre la emergencia de adultos del parasitoide *Tamarixia triozae* Burks (Hymenoptera: Eulophidae) y que



probablemente estos resultados se deban a que este producto actúe más como antialimentario o repelente.

Los efectos de la mitad de la MCRC para azadiractina fueron menos drásticos, se obtuvo un mayor porcentaje en la emergencia y una mayor longevidad en los individuos emergentes lo que permitió la evaluación de la capacidad reproductiva en las hembras del parasitoide. Se observó efecto de este insecticida sobre el parasitismo efectivo, el porcentaje de emergencia y la longevidad de la progenie. Efectos similares han sido reportados por Saber *et al.*, (2004) para el parasitoide *T. cacoeciae* donde este insecticida resultó ser ligeramente perjudicial sobre la capacidad reproductiva de las hembras. También existen reportes de otros efectos sobre la reproducción de insectos tratados con azadiractina como la disminución de la tasa de parasitismo en *Trichogramma sp.* (Raguraman y Singh, 1999) y reducciones en la fecundidad de las hembras fértiles y en la eclosión en el depredador *Podisus maculiventris* Say (Hemiptera: Pentatomidae) (Viñuela *et al.*, 1997, 2000).

El insecticida mimético de la hormona juvenil piriproxifén tuvo un efecto tóxico importante sobre las pupas de *E. mundus*. Se observó una reducción en la emergencia y la longevidad de los adultos (lo que no permitió la evaluación de la capacidad reproductiva en hembras) como así también una interrupción durante el normal desarrollo del parasitoide encontrándose adultos con malformaciones principalmente en las alas. Esto podría asociarse al modo de acción de piriproxifén ya que actúa mimetizando a la HJ, provocando disrupciones en la metamorfosis, supresión de la embriogénesis y en la formación de adultos (Ishaaya *et al.*, 2007). Resultados similares han sido reportados por otros investigadores para diferentes familias de parasitoides pertenecientes al orden Hymenoptera. Liu y Stansly, (1997) reportaron un efecto diferencial en el porcentaje de emergencia a partir de pupas tratadas con este insecticida en tres especies de parasitoides del género *Encarsia*: *E. pergandiella* Howard para el cual resultó inocuo, *E. transversa* Timberlake relativamente inocuo y para *E. formosa* Gahan tóxico, donde también se observaron efectos subletales teratológicos en los adultos manifestados en malformaciones en las alas. Schneider *et al.*, (2003) observaron que al tratar pupas del parasitoide *Hyposoter didymator* Thunberg (Hymenoptera: Ichneumonidae) con una concentración de piriproxifén más baja que la MCRC, disminuía la emergencia adulta significativamente y que los individuos que lograban emerger mostraban caracteres intermedios de pupa y adulto. Por último Sohrabi *et al.*, (2013) observaron también una reducción en el porcentaje de emergencia en pupas del

parasitoide *E. mundus* tratadas con buprofezin (inhibidor de la síntesis de quitina) otro insecticida también perteneciente al grupo de los IGRs. Contrariamente Hoddle *et al.*, (2001) y Andrade Carvalho *et al.*, (2010) no encontraron ningún efecto nocivo de piriproxifén sobre el porcentaje de emergencia en pupas de los parasitoides *Eretmocerus eremicus* Rose y Zolnerowich (Hymenoptera: Aphelinidae) y *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) respectivamente.

El piretroide cipermetrime (25 mg i.a/L) causó una significativa disminución en la emergencia y la longevidad de los adultos. El alto poder de persistencia de este insecticida convencional presentó aquí un rol importante en esta disminución ya que muy probablemente los adultos del parasitoide hayan entrado en contacto con los residuos del mismo al abrir con sus mandíbulas el orificio para emerger de la pupa. Estos resultados coinciden con los antecedentes bibliográficos sobre los efectos de distintos piretroides en parasitoides pertenecientes a las familias Aphidiidae, Aphelinidae y Scelionidae (Hsieh y Allen, 1986; Gonzales Zamora *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1998, Saber *et al.*, 2005; Sugiyama *et al.*, 2011). Para este insecticida además pudieron ser evaluados los efectos de la mitad de la MCRC sobre la capacidad reproductiva en hembras, observándose un leve efecto sobre el parasitismo efectivo y sobre la longevidad de la progenie. Resultados similares fueron obtenidos por Fernandez *et al.*, (2010) para hembras de *E. mundus* emergidas luego del tratamiento con otro piretroide deltametrina. Sin embargo Hsieh *et al.*, (1986) no observaron ningún efecto sobre la fertilidad de hembras del parasitoide *Diaeretiella rapae* M'Intosh (Hymenoptera: Ichneumonidae) emergidas de pupas tratadas con el insecticida permetrina.

La emergencia adulta en los tratamientos con acetamiprid (200 mg i.a/L y 100 mg i.a/L) fue mayor que la observada en los demás tratamientos antes mencionados. Sin embargo se observó una disminución muy marcada sobre la longevidad de los individuos emergentes. El promedio de vida fue de 24 h post-emergencia (debido a esto aquí tampoco se pudo evaluar la capacidad reproductiva en hembras). Esto podría estar directamente relacionado al hecho de que los insecticidas neurotóxicos, como acetamiprid, causan una persistente activación de los receptores nicotínicos que lleva a una continua sobrestimulación de la sinapsis que resulta en una hiperexcitación, convulsión, parálisis y muerte del insecto (Ishaaya *et al.*, 2007). Similares resultados han sido descritos por Sugiyama *et al.*, (2011) para distintas especies del género *Eretmocerus sp.* y para *E. formosa*. Sin embargo, este insecticida resultó inocuo en

pupas de *T. pretiosum* (Moura *et al.*, 2006). Asimismo han sido reportados efectos adversos de otro neonicotinoide, imidacloprid, sobre la emergencia adulta en *T.cacoeciae* y en pupas de los parasitoides *Encarsia inaron* Walker (Hymenoptera: Aphelinidae) y *E.mundus* (Saber, 2011; Sohradi *et al.*, 2012, 2013).

Spirotetramat fue el insecticida menos tóxico para las pupas de *E. mundus* en comparación con los demás insecticidas evaluados. No se observó un efecto sobre la longevidad de los individuos emergentes. Esto coincide con lo reportado por diferentes autores para pupas de los parasitoides *Anagyrus sp.near pseudococci* Girault (Hymenoptera: Encyrtidae) Mansour *et al.*, (2011); *Aphelinus certus* Yasnosh (Hymenoptera: Aphelinidae) Frewin *et al.*, (2012); *Microplitis mediator* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) Moens *et al.*, (2012); y *Aphytis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae) DeBach Garcerá *et al.*, (2013). Al mismo tiempo spirotetramat (10 mg i.a/L) no mostró ningún efecto perjudicial sobre la capacidad reproductiva de las hembras y sólo se observó una disminución de la longevidad de la progenie. Moens *et al.*, (2012) obtuvieron resultados similares a los anteriormente mencionados para hembras del parasitoide *M. mediator*.

De lo antedicho se desprende que el estado de pupa en *E. mundus* no representaría un estado de protección a xenobióticos, como los insecticidas, aun siendo un endoparasitoide. Por otro lado y de acuerdo con estos estudios, la selectividad de los insecticidas biorracionales en comparación con los convencionales es discutida, ya que se obtuvieron valores de toxicidad considerables hacia el parasitoide, reduciendo (a la concentración de campo de estos) la emergencia y la longevidad adulta de los mismos.

Como conclusión final, estos resultados sugieren que las pupas de *E. mundus* son altamente susceptibles a cuatro (acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifen) de los cinco insecticidas evaluados. La inocuidad del insecticida azadiractina, ampliamente utilizado en producción orgánica, es también discutida de acuerdo a estos estudios. Sin embargo debido a que estos ensayos fueron realizados en condiciones de laboratorio, donde la exposición es máxima y se reduce el efecto de factores abióticos, es necesario profundizar los estudios en campo para concluir sobre la compatibilidad de los mismos con el enemigo natural *E. mundus*.

Por último, cabe destacar que para el insecticida spirotetramat, no se observaron efectos nocivos (letales ni subletales) sobre el estado de pupa del parasitoide en condiciones de laboratorio. Si sumamos a esto el hecho de que se trata de un insecticida sistémico que puede ser incorporado en el cultivo (sobre todo por raíz) a través del

sistema de riego por goteo afectando sólo a sus plagas blanco, esto hace que pueda llegar a ser considerado para un uso conjunto a campo con el parasitoide *E. mundus*. Aunque para poder llegar a este tipo de conclusión es necesario completar el perfil toxicológico de este insecticida, evaluando su efecto sobre el estado adulto de *E. mundus*, tema que será abordado en el capítulo 6 de la presente tesis.

## CAPÍTULO 6

“Estudios ecotoxicológicos de los efectos secundarios de acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat sobre adultos de *Eretmocerus mundus*”

## 6.1 Introducción

Los adultos de *E. mundus*, como la mayoría de los parasitoides himenópteros, pueden ser afectados por los insecticidas, ya sea a través de su pulverización en los cultivos, por contacto con sus residuos o por el consumo de comida contaminada (agua, néctar, presa, etc). En una población de enemigos naturales donde los adultos ya están establecidos, son estos los que van a contribuir a la descendencia y al crecimiento de la misma como así también al control de las plagas (Stark *et al.*, 2004).

El impacto de los plaguicidas sobre organismos no blanco generalmente se ha estimado mediante la evaluación de la toxicidad a través del valor de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) o, como ya se mencionó en el capítulo introductorio de la presente tesis, por medio de la metodología propuesta por la OICB, donde la toxicidad de los plaguicidas hacia los enemigos naturales es determinada en forma secuencial mediante una serie de evaluaciones en tres niveles: laboratorio, semi-campo y campo (Hassan, 1994). Este tipo de estudios, si bien constituyeron un adelanto en la década del 90', en donde todos los plaguicidas registrados eran convencionales de amplio espectro, hoy en día son cuestionados ya que, principalmente la evaluación, se centra en la determinación de los efectos letales y no siempre se contemplan los efectos subletales que podría ocasionar la exposición de los insectos benéficos a los plaguicidas (Stark *et al.*, 2007; Forbes *et al.*, 2010).

Los efectos subletales se definen como aquellos efectos que se observan en los individuos sobrevivientes a la exposición al plaguicida, independientemente de la concentración a la que hayan sido expuestos y que afectan la fisiología, la bioquímica y el comportamiento de los individuos (Desneux *et al.*, 2007).

En este capítulo de tesis se evaluarán los efectos letales (supervivencia) y subletales (capacidad reproductiva en hembras y patrones de comportamiento) de los insecticidas acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat sobre adultos del parasitoide *E. mundus*. Se prestará especial atención a los efectos subletales que los insecticidas anteriormente mencionados tienen sobre el comportamiento del parasitoide evaluando potenciales impactos sobre los mecanismos de cópula, búsqueda del huésped, oviposición y parasitismo.

Por otro lado y considerando las premisas de la ecotoxicología moderna sintetizada en Forbes *et al.*, (2010), se estudiará el posible efecto del insecticida spirotetramat sobre los parámetros demográficos (tasa intrínseca de crecimiento poblacional  $r$ , tasa reproductiva neta  $R_0$  y tiempo generacional  $T$ ) de una población de

*E. mundus* expuesta a este insecticida en su etapa adulta, por tratarse como se comentó en el capítulo 4 de la presente tesis, de un insecticida con modo de acción novedoso (inhibe la síntesis de lípidos, actuando sobre la coenzima A), más selectivo y de reciente registro en Argentina para el control de plagas succionadoras.

## 6.2 Materiales y Métodos

### 6.2.1 Obtención de adultos para los bioensayos de ecotoxicidad

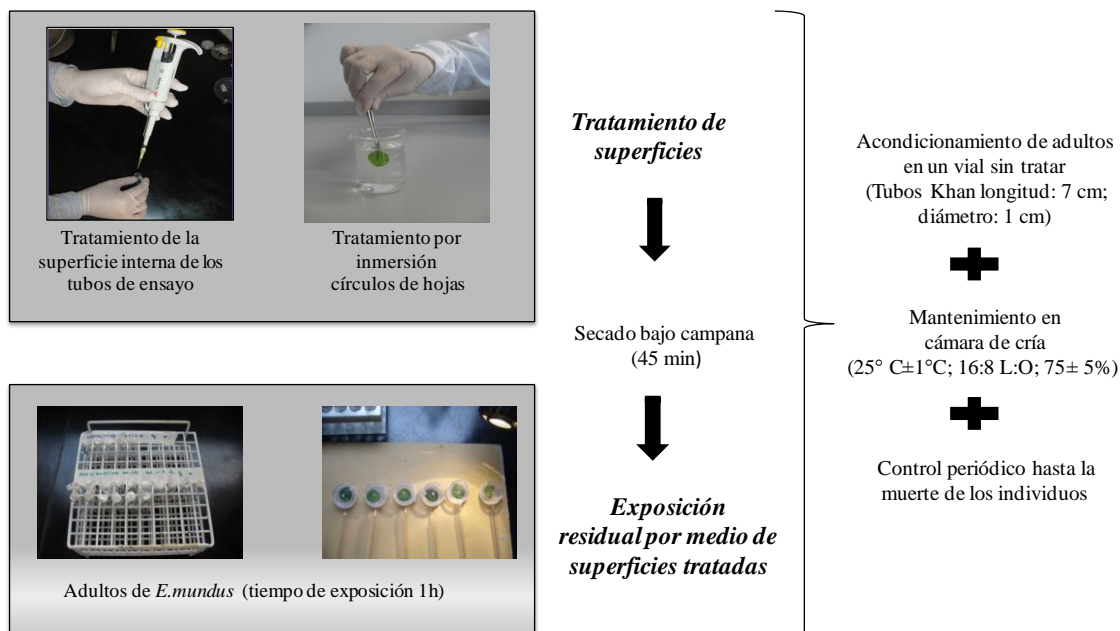
Los organismos utilizados en los diferentes bioensayos se obtuvieron de la cría masiva de laboratorio, realizada separadamente a partir de un conjunto de ninfas de *B. tabaci* presumiblemente parasitadas, siguiendo una metodología similar a la descrita en el capítulo 3 sección 3.2.2 de la presente tesis.

### 6.2.2 Bioensayos

#### 6.2.2.1 Bioensayo de toxicidad sobre adultos del parasitoide *E. mundus*

Para la realización del ensayo se utilizaron adultos (machos y hembras) del parasitoide de 1-3 días de edad. Los mismos fueron tratados por vía residual por medio de superficies tratadas, siguiendo la metodología descrita en el capítulo 3 sección 3.4.2 incisos a y b por espacio de 1 h. Una vez transcurrido el período de exposición, los adultos fueron trasladados a un vial sin tratar (Tubos Khan longitud: 7cm; diámetro: 1cm; superficie interna: 43,96cm<sup>2</sup>) con una traza de miel pura de abeja y llevados a cámara de cría (25°C ± 1°C; 16:8 L:O; 75 ± 5 % HR) y controlados periódicamente hasta la muerte de los individuos (**Figura 6.1**). En el marco de este ensayo se evaluaron las MCRC y diluciones al 50 % de las mismas de los siguientes productos comerciales: Epingle<sup>®</sup> (piriproxifén 10% i.a, Summit-Agro S.A, Buenos Aires, Argentina), Glextrin 25<sup>®</sup> (cipermetrina 25% i.a, Gleba S.A, Buenos Aires, Argentina), Neem-Azal<sup>®</sup> (1,2% i.a azadiractina Agristar, Buenos Aires, Argentina), Mospilan<sup>®</sup> (acetamiprid 70 % i.a WP, Summit-Agro S.A, Buenos Aires, Argentina), Movento<sup>®</sup> (spirotetramat, Bayer S.A., Alemania). Las soluciones fueron preparadas utilizando acetona (grado analítico) (vidrio) o agua destilada (hojas) como solvente. La solución de acetamiprid se preparó con una mezcla de 80 % (v/v) de acetona y 20 % (v/v) de agua destilada (Youn *et al.*, 2003) con la finalidad de mejorar su disolución y emulsión. Para el control se utilizó acetona o agua dependiendo de la superficie de exposición. Para cada insecticida evaluado, la unidad experimental fue de un individuo adulto y se realizaron 30 repeticiones (15 machos y 15 hembras), siempre acompañadas de un control con igual

número de réplicas. Los puntos finales analizados en este ensayo fueron: supervivencia de los adultos postratamiento (12 días) e influencia del tipo de superficie sobre la eficacia del producto (Desneux *et al.*, 2006).



**Figura 6.1:** Esquema de la metodología utilizada en el bioensayo de toxicidad de adultos de *Eretmocerus mundus*.

En los tratamientos sobre vidrio en donde la supervivencia de las hembras fue  $\geq 45\%$  y la longevidad cercana a los cinco días se evaluó la capacidad reproductiva en hembras (acetamiprid 100 mg i.a/L, azadiractina 20 mg i.a/L, cipermetrina 12,5 mg i.a/L, piriproxifén 37,5 mg i.a/L, spirotetramat 20 mg i.a/L). Para ello se utilizaron 5 hembras por cada tratamiento y 5 hembras para el control, siendo cada hembra una repetición. Las hembras, expuestas a cópula por 24 h, se colocaron individualmente en un vial de plástico (6,5cm x 8,5cm), tapado en su parte superior con un voile, con una hoja de pimiento (*C. annuum*) que contenía 20-30 ninfas de segundo estadio de *B. tabaci* acondicionada en un vial de plástico con 5ml de agua. Se expusieron las hembras al huésped por 24 h, luego de las cuales fueron retiradas y puestas en otro vial que contenía otra hoja con las mismas características que la primera, repitiendo esta operación durante 5 días consecutivos. Los puntos finales evaluados fueron: parasitismo efectivo (número de ninfas que mostraron signos de parasitismo), porcentaje de emergencia de la progenie (porcentaje de adultos emergidos de las ninfas que fueron parasitadas), proporción de sexos (número de hembras / (número de machos + número de hembras)) y longevidad de la progenie.

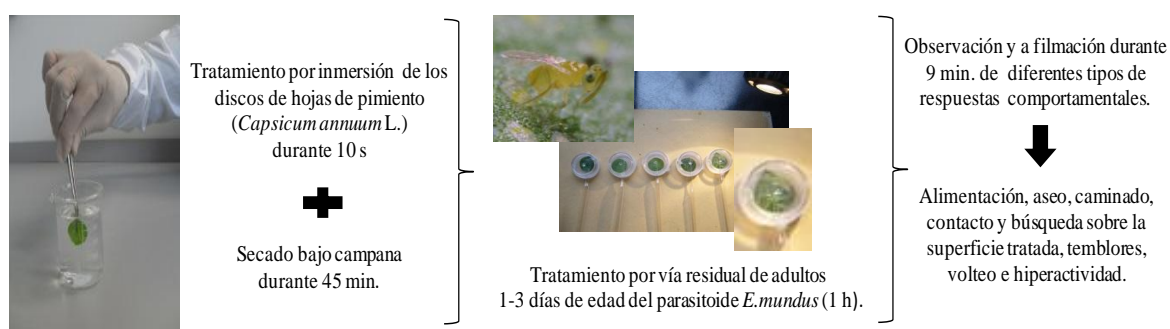


### 6.2.2.2 Bioensayos de efectos a largo plazo a nivel comportamental en adultos del parasitoide *E. mundus*

Con la finalidad de evaluar cómo se modifican algunos aspectos del comportamiento (búsqueda, cópula, oviposición, parasitismo) en adultos del parasitoide expuestos a insecticidas o a huéspedes tratados con insecticidas se diseñaron diferentes tipos de ensayos.

#### Respuestas comportamentales frente a residuos de insecticidas

Para evaluar los posibles tipos de comportamientos que podía manifestar el parasitoide frente a residuos de insecticidas se realizó un ensayo que consistió en exponer individualmente adultos (10 machos y 10 hembras) de 1-3 días de edad a residuos de insecticidas durante 1 h y posteriormente observar y filmar durante 9 min. (Longley y Jepson, 1996) los diferentes tipos de repuestas que manifestaban (**Figura 6.2**).



**Figura 6.2:** Esquema de la metodología utilizada en el bioensayo de respuesta comportamental de adultos de *Eretmocerus mundus* frente a residuos de diferentes insecticidas.

Previo al inicio del ensayo se cortaron discos (2cm de diámetro) de hojas de pimiento (*C. annuum*) y se sumergieron durante 10 s en las diferentes soluciones de insecticidas. Los discos tratados se dejaron secar bajo campana de gases durante 1h y posteriormente fueron acondicionados individualmente en un vial de acrílico (2,5cm x 1cm de tamaño con tres orificios, dos de ventilación y uno de entrada, y una conexión a un aspirador entomológico para la entrada de los individuos) con una traza de miel pura de abejas tapado en su parte superior con papel film a fin de evitar que los parasitoides escaparan y para facilitar la observación.

Se evaluaron las MCRC y diluciones al 50 % de los insecticidas acetamiprid (200 y 100 mg i.a /L), azadiractina (40 y 20 mg i.a/L), cipermetrina (25 y 12,5 mg i.a/L), piriproxifén (75 y 37,5 mg i.a/L) y spirotetramat (20 y 10 mg i.a/L). Las

soluciones fueron preparadas utilizando agua destilada como solvente. La unidad experimental de evaluación fue de un individuo adulto y se realizaron 20 repeticiones por insecticida, siempre acompañadas de un control con igual número de réplicas, en este caso expuestas solo al solvente.

Se registró, con la ayuda del programa **Etholog 2.2** (Ottoni, 2000), las frecuencias de los siguientes tipos de comportamientos (Longley y Jepson, 1996; Hoddle *et al.*, 2000; Tran *et al.*, 2004):

- ✓ **Alimentación:** disminución de la actividad locomotora e introducción de las mandíbulas en el alimento ofrecido (miel pura de abejas).
- ✓ **Aseo y Acicalamiento:** rozamiento de las antenas o las mandíbulas con el primer par de patas, del primer par de patas con el segundo, del segundo con el tercero, del extremo terminal del abdomen con el tercer par de patas, del primer o tercer par de patas entre sí.
- ✓ **Caminado:** actividad locomotora sin contacto de las antenas sobre la superficie, alas sobre el tórax en posición horizontal.

✓ **Comportamiento relacionado a la búsqueda del huésped:**

*Contacto y búsqueda sobre la superficie tratada:* actividad locomotora con contacto de las antenas sobre la superficie, alas sobre el tórax en posición horizontal.

- ✓ **Comportamientos asociados a intoxicación con insecticidas neurotóxicos, por efectos sobre el SNC** (Alzogaray, 1996):

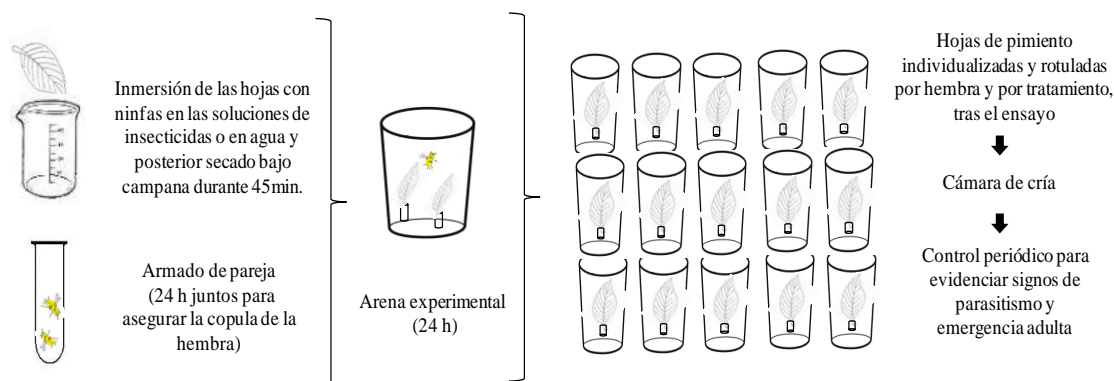
*Temblores:* agitación involuntaria de todo o alguna parte del cuerpo.

*Volteo:* ausencia de actividad locomotora, individuo postrado sobre uno de los laterales o sobre la parte dorsal del cuerpo.

*Hiperactividad:* aumento de la actividad locomotora con patrones erráticos.

**Respuestas frente a huéspedes tratados y no tratados (ensayos de elección)**

Para analizar si la hembra del parasitoide era capaz de diferenciar huéspedes tratados de no tratados al momento de búsqueda y parasitismo se realizó un ensayo de elección. Este consistió en colocar una hembra del parasitoide (de no más de tres días de edad y expuesta a cópula) en una arena experimental durante 24 h y luego retirarla. La arena (6,5cm x 8,5cm), tenía dos hojas de pimienta con 10 a 15 ninfas de segundo estadio de *B. tabaci* cada una, una tratada y la otra no, acondicionadas en viales de plástico de 5ml con agua, las cuales distaban 1cm entre sí para evitar el contacto (**Figura 6.3**).



**Figura 6.3:** Esquema de la metodología utilizada en el ensayo de elección realizado con hembras del parasitoide *Eretmocerus mundus*.

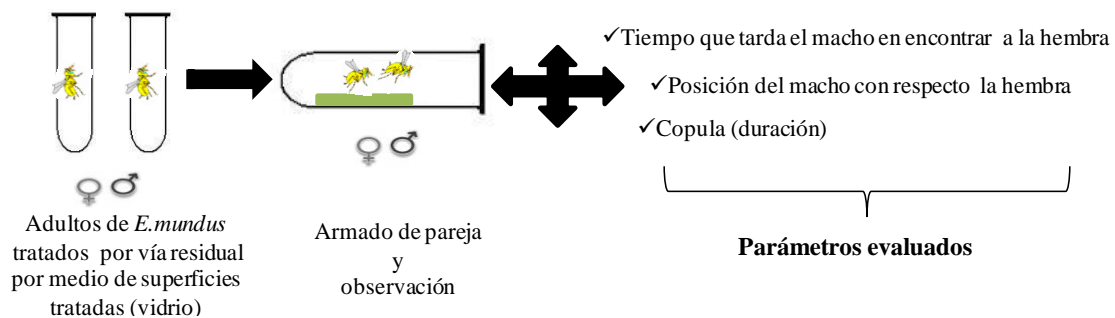
Previo a la realización del ensayo las hojas fueron tratadas, vía inmersión durante 10 s en las diferentes soluciones acuosas de los insecticidas evaluados (acetamiprid 200 mg i.a/L, azadiractina 40 mg i.a/L, cipermetrina 25 mg i.a/L, piriproxifén 75 mg i.a/L, spirotetramat 20 mg i.a/L). Una vez finalizado el mismo las hojas fueron individualizadas y rotuladas (número de hembra/tratamiento) y llevadas a cámara de cría. Para cada insecticida evaluado la unidad experimental fue una hembra y se realizaron 12 repeticiones. Se efectuó un control periódico a fin de evidenciar signos de parasitismo y emergencia de la progenie. Se evaluó la capacidad de elección de las hembras a través del parasitismo efectivo (número de ninfas que mostraron signos de parasitismo) en cada una de las opciones ofrecidas para cada uno de los tratamientos y se calculó el efecto disuasorio de la oviposición para cada uno de los insecticidas por medio del siguiente índice:  $\frac{N_c - N_t}{N_c} \times 100$ ; donde  $N_c$  es el número de ninfas parasitadas en la hoja tratada con agua y  $N_t$  es el número de ninfas parasitadas en la hoja tratada con el insecticida (Riba y Martí, 1996; Alzogaray *et al.*, 2000).

### **Respuestas comportamentales durante la cópula, la oviposición y el parasitismo**

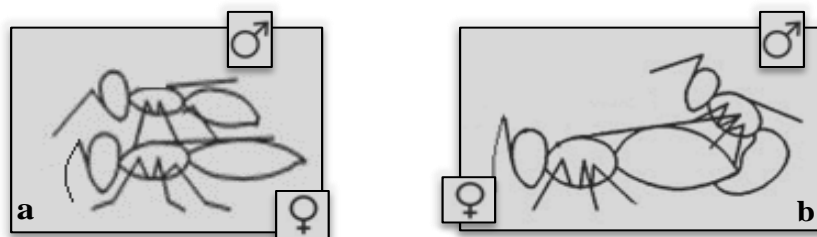
Para evidenciar el posible impacto que los diferentes insecticidas podrían tener sobre el comportamiento de cópula, oviposición y parasitismo se diseñaron dos tipos de ensayos y se evaluaron las MCRC para los insecticidas acetamiprid (200 mg i.a/L), azadiractina (40 mg i.a/L), cipermetrina (25 mg i.a/L), piriproxifén (75 mg i.a/L) y spirotetramat (20 mg i.a/L).

*-Ensayo de cópula:* se llevó a cabo con machos y hembras del parasitoide *E. mundus* (1-3 días de edad) que fueron expuestos individualmente a los diferentes insecticidas evaluados siguiendo la metodología descrita en el capítulo 3 sección 3.4.2 inciso a. Para la realización del mismo se introdujo con la ayuda de un aspirador

entomológico una pareja dentro de un vial (Tubos Khan longitud: 7cm; diámetro: 1cm; superficie interna: 43,96cm<sup>2</sup>) que tenía un trozo rectangular de hoja de pimienta (3cm x 1cm) con 5 a 6 ninfas del segundo estadio de *B. tabaci* a fin de que sirviera de estímulo para la cópula (**Figura 6.4**). A continuación se determinó y observó luego de un período de aclimatación de 10 min.: a) el tiempo (s) transcurrido hasta el encuentro entre macho y hembra, b) la posición (normal/anormal) del macho con respecto a la hembra en el momento de la cópula (**Figura 6.5**) y c) el tiempo (s) de duración de la cópula. Las soluciones de los insecticidas y del control fueron preparadas utilizando acetona grado analítico como disolvente. La unidad experimental fue de una pareja y se realizaron 15 repeticiones, siempre acompañadas de un control con igual número de réplicas expuesto solo al solvente.

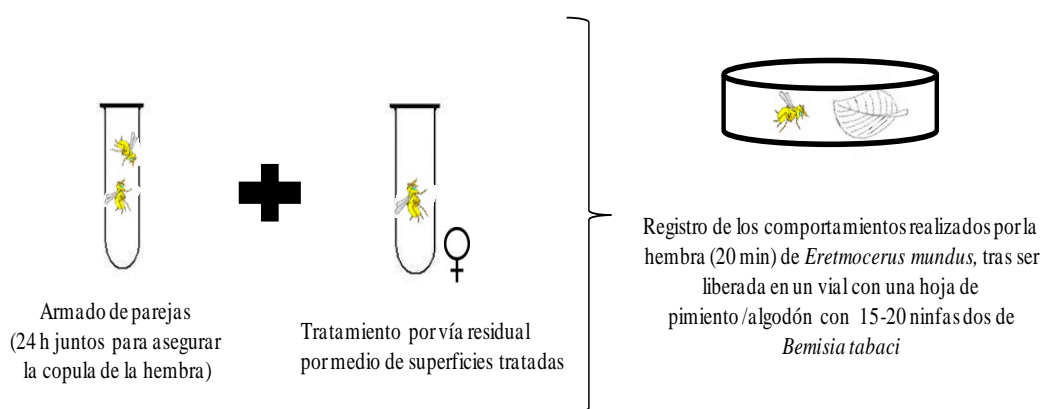


**Figura 6.4:** Esquema de la metodología utilizada en el ensayo comportamental de cópula.

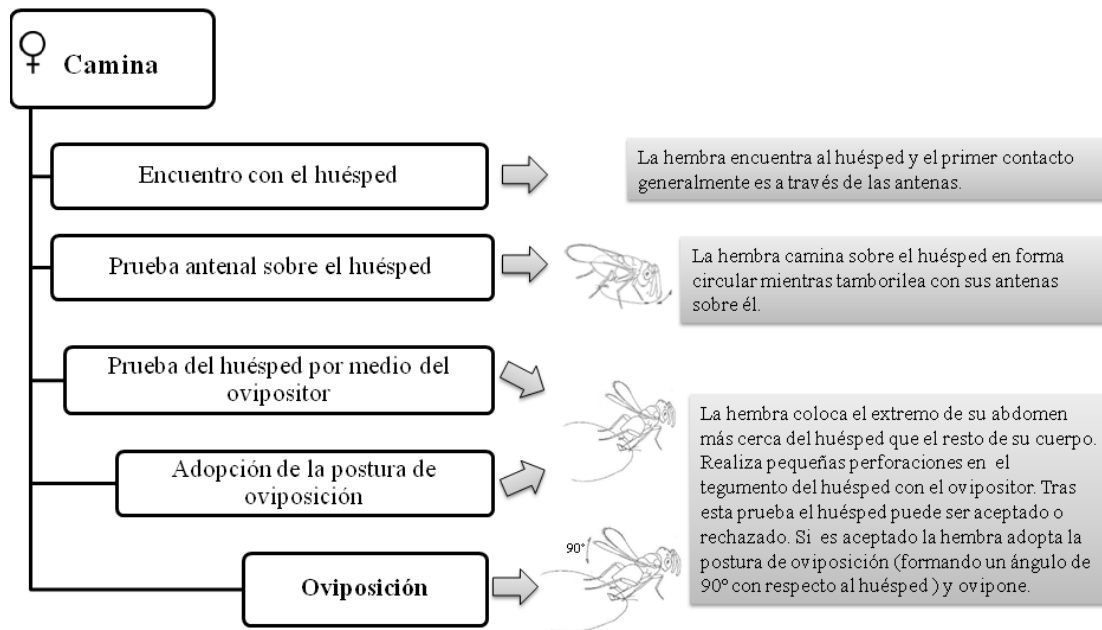


**Figura 6.5:** Posiciones adoptadas por el macho y la hembra de *Eretmocerus mundus* al momento de la cópula (adaptación de la descripción realizada por Ardeh, 2004). Para permitir la cópula la hembra del parasitoide toma una actitud pasiva (caracterizada por la ubicación de las antenas hacia abajo y el abdomen levemente dirigido hacia arriba) tras ser detectada por el macho. **(a)** A continuación el macho sube encima de ella generalmente desde uno de los laterales, se mueve hacia adelante y ubica el primer y el tercer par de patas sobre la cabeza (generalmente muy cerca de los ojos) y las alas de la hembra respectivamente. Con el segundo par de patas agarra a la hembra. **(b)** Tras la realización de un breve movimiento de sus antenas o anteneo el macho se inclina hacia atrás para aparearse cambiando la disposición de sus patas. Las patas delanteras y medias ahora son dispuestas sobre las alas de la hembra para inmovilizarla y las patas traseras se disponen rodeando el abdomen de la hembra.

-*Ensayo de oviposición y parasitismo*: se llevó a cabo con hembras del parasitoide (1-3 días de edad y copuladas) que fueron expuestas a los insecticidas evaluados siguiendo la metodología descrita en el capítulo 3 sección 3.4.2 inciso a. Para la realización del mismo se introdujo una hembra en un vial (cápsula de Petri de vidrio 10cm x 2cm) que contenía una hoja de pimiento (*C. annuum*) con aproximadamente 10 a 15 ninfas del segundo estadio de su huésped *B. tabaci* (**Figura 6.6**). Seguidamente se observó bajo lupa binocular por espacio de 20 min. (Ardeh *et al.*, 2005) el comportamiento de la hembra y se registraron con la ayuda del programa **Etholog 2.2** (Otoni, 2000) el tiempo (s) que transcurre desde que la hembra entra en el vial y hasta que toma contacto con el primer huésped y el porcentaje de hembras que fueron capaces de seguir cada uno de los comportamientos asociados a la oviposición descrito por de Headrick *et al.*, (1995) (**Figura 6.7**). Pasados los 20 min. de observación las hojas fueron acondicionadas en una cámara de cría a fin de evidenciar posteriores signos de parasitismo. Las soluciones fueron preparadas utilizando acetona grado analítico como disolvente. Para cada insecticida evaluado la unidad experimental fue de una hembra y se realizaron 15 repeticiones, siempre acompañadas de un control con igual número de réplicas en donde las hembras fueron expuestas solo al solvente.



**Figura 6.6:** Esquema de la metodología utilizada en el ensayo comportamental de oviposición y parasitismo realizado con hembras (1-3 días de edad) de *Eretmocerus mundus*.

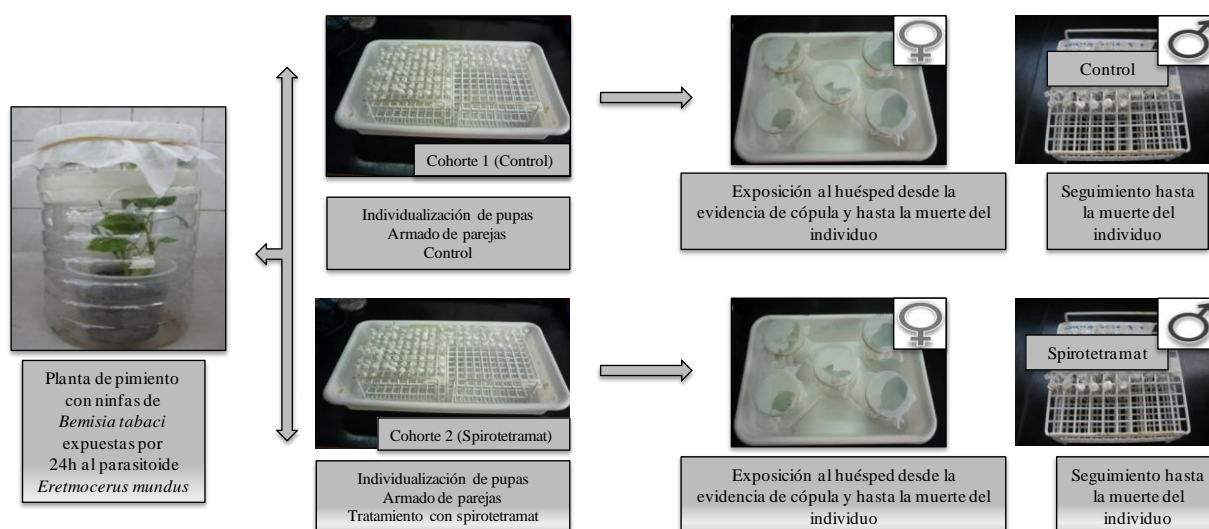


**Figura 6.7:** Patrones de comportamiento observados en las hembras de *Eretmocerus mundus* al momento de la oviposición (adaptado de Headrick *et al.*, 1995).

### 6.2.2.3 Bioensayo de efectos a largo plazo sobre la demografía del parasitoide *E. mundus*

Para la evaluación de los efectos secundarios de la MCRC del insecticida spirotetramat (20 mg i.a/L) sobre los parámetros demográficos de adultos del parasitoide *E. mundus*, se partió de dos cohortes de  $\approx 50$  ninfas de *B. tabaci* de segundo estadio (huésped) previamente expuestas al parasitoide por espacio de 24 h y con signos visibles de parasitismo (pérdida de simetría en los micetomas del huésped). Una vez que el parasitoide en desarrollo alcanzó el estado de pupa, estas fueron colocadas individualmente en tubos de ensayo de vidrio (Tubos Khan 1cm x 7cm) con una traza de miel pura de abejas, donde se dejaron hasta la emergencia de los adultos. A partir de la emergencia de los parasitoides de ambas cohortes, estos fueron sexados y los adultos de una sola de las dos cohortes fueron tratados por vía residual con el insecticida spirotetramat siguiendo la metodología descrita en el capítulo 3 sección 3.4.2 inciso a. Los individuos pertenecientes a la otra cohorte solo fueron expuestos al solvente (acetona grado analítico) y se dejaron como control. Con los adultos de ambas cohortes (control y spirotetramat) se formaron parejas (15 por cohorte), los cuales se dejaron juntos por espacio de 24 h para asegurar la cópula. Las hembras tratadas (n=15) y no tratadas (n=15) fueron expuestas al huésped (se les ofreció de 15 a 20 ninfas de segundo estadio de *B. tabaci* por día) desde la evidencia de cópula y hasta su muerte (**Figura**

6.8). Se registro en forma diaria el tiempo de desarrollo y la mortalidad preimaginal de los adultos del parasitoide. Además se evaluó para cada uno de los individuos (machos y hembras) pertenecientes a cada cohorte la longevidad postratamiento. Asimismo para las hembras, de ambas cohortes, se evaluó la fecundidad (a través del parasitismo efectivo (número de ninfas que mostraron signos de parasitismo)), la fertilidad (a través del porcentaje de emergencia de la progenie (porcentaje de adultos emergidos de las ninfas que fueron parasitadas)) y la proporción de sexos de la descendencia (número de hembras / (número de machos + número de hembras)). Con estos datos se confeccionaron tablas de vida (Chi ,1997) y se estimaron los parámetros demográficos tasa intrínseca de crecimiento poblacional  $r$ , tasa reproductiva neta  $R_0$ , y tiempo generacional  $T$ .



**Figura 6.8:** Esquema de la metodología utilizada en el estudio de efectos de spirotetramat sobre la demografía de *Eretmocerus mundus* (tratamiento en estado adulto).

### 6.2.3 Análisis estadístico

#### Bioensayo de toxicidad sobre adultos del parasitoide *E. mundus*

Para el análisis de los datos de la supervivencia postratamiento en adultos del parasitoide se utilizó el método no paramétrico Kaplan-Meier. La comparación entre dos curvas se realizó mediante la prueba de logaritmo del rango ("Long Rank"). Por otra parte el análisis de la influencia del tipo de superficie sobre la eficacia del producto fue realizado por medio de un ANOVA de dos factores para comprobar si existió algún efecto de: 1- El tipo de tratamiento (acetamiprid 200 y 100 mg i.a/L; azadiractina 40 y 20 mg i.a/L; cipermetrina 25 y 12,5 mg i.a/L, piriproxifen 75 y 37,5 mg i.a/L; spirotetramat 20 y 10 mg i.a/L) y 2- La superficie de exposición (vidrio/ hoja) sobre la

longevidad postratamiento de los adultos de *E. mundus* y la posible interacción entre estos dos factores. En caso de observar significancia para alguno de los factores se realizó un ANOVA de una vía para analizar el factor por separado. Previamente a ejecutar el ANOVA, se verificó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y mediante la prueba de homocedasticidad de las varianzas de Barlett. Las medias fueron separadas a través de la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Finalmente en el ensayo de capacidad reproductiva en hembras se utilizó el método paramétrico de Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor (Tratamiento) para el análisis del porcentaje de emergencia de la progenie y la proporción de sexos de la progenie (primer día de exposición al huésped). La normalidad de los datos fue verificada mediante la prueba de Shapiro-Wilk y mediante la prueba de homocedasticidad de las varianzas de Barlett. El análisis *a posteriori* se llevó a cabo mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. El parasitismo efectivo, la proporción de sexos (acumulada durante cinco días consecutivos) y la longevidad de la progenie fueron analizadas por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis por no cumplirse los supuestos del ANOVA.

#### **Bioensayos de efectos a largo plazo a nivel comportamental en adultos del parasitoide *E. mundus***

**Respuestas comportamentales frente a residuos de insecticidas:** las frecuencias de los comportamientos relacionados a la búsqueda del huésped y a la intoxicación con insecticidas neurotóxicos fueron analizadas por medio de un ANOVA de un factor (Tratamiento). Se verificó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y mediante la prueba de homocedasticidad de las varianzas de Barlett. El análisis *a posteriori* de los datos sometidos a ANOVA, se llevó a cabo mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Las frecuencias de los comportamientos alimentación, aseo/acicalamiento y caminado fueron analizadas por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis por no cumplirse los supuestos del ANOVA.

**Respuestas frente a huéspedes tratados y no tratados (ensayos de elección):** la capacidad de elección de las hembras del parasitoide en cada una de las opciones ofrecidas para cada uno de los tratamientos fue analizada por medio de la prueba de Wilcoxon por no cumplirse los supuestos de normalidad (Zar, 1996).

**Respuestas comportamentales durante la cópula, la oviposición y el parasitismo:** los datos de los puntos finales de evaluación, tiempo transcurrió hasta el



encuentro entre macho y hembra y duración de la cópula obtenidos en el bioensayo comportamental de *cópula* como así también los datos del tiempo transcurrido hasta el encuentro con el huésped obtenidos en el bioensayo de *oviposición* y *parasitismo* fueron analizados por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis por no cumplirse los supuestos del ANOVA.

Para todos los análisis estadísticos se utilizó un nivel de significancia de  $p \leq 0,05$ . Se utilizó el programa STATGRAPHICS, versión v 4.0 y el programa XL Stat (Addinsoft xostat para Excel, Paris, Francia, 2009).

### **Bioensayo de efectos a largo plazo sobre la demografía del parasitoide *E. mundus***

El análisis de los datos de los parámetros biológicos, longevidad postratamiento en machos, fecundidad (parasitismo efectivo) y fertilidad (porcentaje de emergencia de la progenie) se realizó a través de un ANOVA de un factor (Tratamiento). Se verificó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y mediante la prueba de homocedasticidad de las varianzas de Barlett. El análisis *a posteriori* de los datos sometidos a ANOVA, se llevó a cabo mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. La longevidad postratamiento en hembras y la proporción de sexos de la descendencia fueron analizadas por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis por no cumplirse los supuestos del ANOVA.

Para la obtención de los parámetros demográficos de cada una de las cohortes (control y spirotetramat) se utilizó el programa Two-Sex Life (Chi, 2008), y se estimaron los siguientes parámetros poblacionales:

Crecimiento poblacional ( $r$ )

$$1 = \sum_{x=0}^{\infty} e^{-r(x-1)} l_x m_x$$

Tasa reproductiva neta ( $R_0$ )

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

Tiempo generacional ( $T$ )

$$T = \frac{\ln R_0}{r}$$

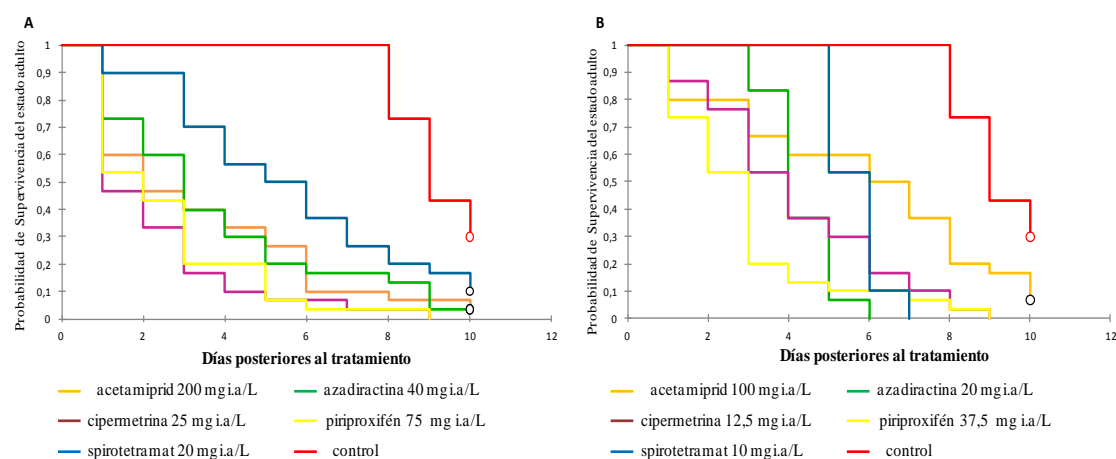
El análisis del efecto del insecticida spirotetramat sobre la demografía se llevo a cabo por medio de la prueba de t de Student o por la prueba de Kolmogorov-Smirnov, de acuerdo a la normalidad de los datos; previa obtención de los *pseudovalores* para las medias de los parámetros poblacionales por medio del método Bootstrap.

### 6.3 Resultados

#### Bioensayo de toxicidad sobre adultos del parasitoide *E. mundus*

##### Exposición residual por medio de superficies tratadas

*Análisis de supervivencia:* las curvas de supervivencia de adultos de *E. mundus* expuestos a superficies de vidrio tratadas (tratamiento residual), muestran que todos los insecticidas evaluados, a la MCRC; producen una reducción significativa de la supervivencia del parasitoide con respecto al control (**Figura 6.9 A**). Cipermetrina redujo drásticamente la supervivencia de los adultos en los primeros días posteriores al tratamiento (83,33 % de mortalidad acumulada a las 72 h). Los insecticidas acetamiprid y azadiractina causaron una disminución en la supervivencia similar a la producida por piriproxifén y spirotetramat a lo largo de los 12 días evaluados. El insecticida piriproxifén causó una mortalidad mayor (y por lo tanto un mayor descenso en la supervivencia) que el insecticida spirotetramat. Para los tratamientos con la mitad de la MCRC (**Figura 6.9 B**) se observó en las curvas de supervivencia del parasitoide expuesto a los insecticidas piriproxifén, acetamiprid y cipermetrina una disminución en la misma pasadas las 24 h posteriores al tratamiento (15-30 % de mortalidad acumulada), para el insecticida azadiractina esto se observó a las 72 h ( $\approx 20$  % de mortalidad acumulada) y para spirotetramat a las 96 h ( $\geq 40$  % de la mortalidad acumulada), lo que demuestra la baja toxicidad de este último sobre los adultos de *E. mundus* en comparación con el resto de los insecticidas.



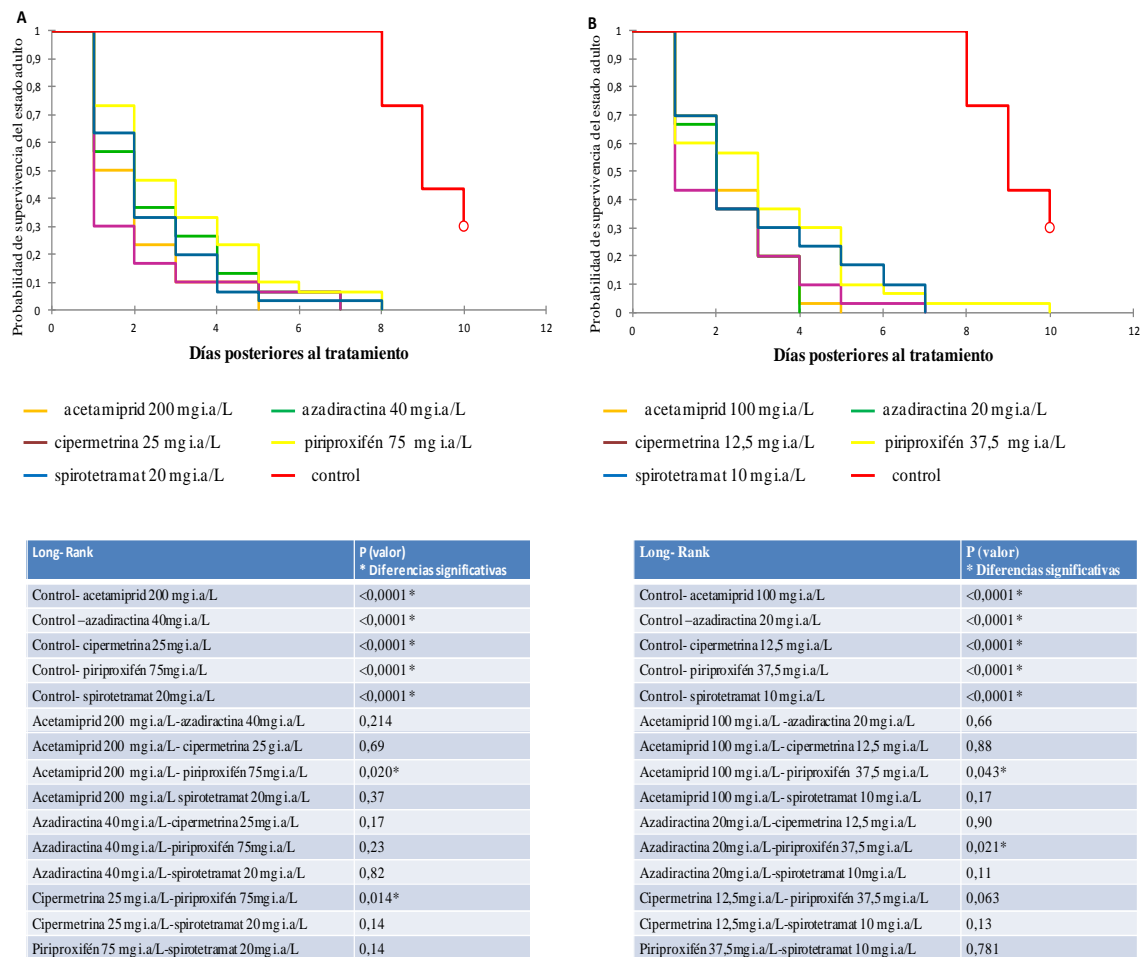
Long- Rank	P (valor) * Diferencias significativas
Control- acetamiprid 200 mg i.a/L	<0,0001 *
Control -azadiractina 40mg i.a/L	<0,0001 *
Control- cipermetrina 25mg i.a/L	<0,0001 *
Control- piriproxifén 75mg i.a/L	<0,0001 *
Control- spirotetramat 20mg i.a/L	<0,0001 *
Acetamiprid 200 mg i.a/L-azadiractina 40mg i.a/L	0,91
Acetamiprid 200 mg i.a/L- cipermetrina 25 mg i.a/L	0,03*
Acetamiprid 200 mg i.a/L- piriproxifén 75mg i.a/L	0,07
Acetamiprid 200 mg i.a/L- spirotetramat 20mg i.a/L	0,06
Azadiractina 40 mg i.a/L- cipermetrina 25mg i.a/L	0,018*
Azadiractina 40 mg i.a/L- piriproxifén 75mg i.a/L	0,10
Azadiractina 40 mg i.a/L- spirotetramat 20 mg i.a/L	0,06
Cipermetrina 25 mg i.a/L- piriproxifén 75mg i.a/L	0,45
Cipermetrina 25 mg i.a/L- spirotetramat 20 mg i.a/L	<0,0001 *
Piriproxifén 75 mg i.a/L- spirotetramat 20mg i.a/L	0,000 *

Long- Rank	P (valor) * Diferencias significativas
Control- acetamiprid 100 mg i.a/L	<0,0001 *
Control -azadiractina 20 mg i.a/L	<0,0001 *
Control- cipermetrina 12,5 mg i.a/L	<0,0001 *
Control- piriproxifén 37,5 mg i.a/L	<0,0001 *
Control- spirotetramat 10 mg i.a/L	<0,0001 *
Acetamiprid 100 mg i.a/L- azadiractina 20 mg i.a/L	0,0001*
Acetamiprid 100 mg i.a/L- cipermetrina 12,5 mg i.a/L	0,006*
Acetamiprid 100 mg i.a/L- piriproxifén 37,5 mg i.a/L	0,000*
Acetamiprid 100 mg i.a/L- spirotetramat 10 mg i.a/L	0,030*
Azadiractina 20mg i.a/L- cipermetrina 12,5 mg i.a/L	0,62
Azadiractina 20mg i.a/L- piriproxifén 37,5 mg i.a/L	0,003*
Azadiractina 20mg i.a/L- spirotetramat 10mg i.a/L	<0,0001 *
Cipermetrina 12,5mg i.a/L- piriproxifén 37,5 mg i.a/L	0,058
Cipermetrina 12,5mg i.a/L- spirotetramat 10 mg i.a/L	0,061
Piriproxifén 37,5mg i.a/L- spirotetramat 10 mg i.a/L	<0,0001 *

**Figura 6.9:** Toxicidad de la MCRC (A) y de la mitad de la misma (B) de los insecticidas acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat sobre la supervivencia del estado adulto de *Eretmocerus mundus* tras el tratamiento residual por medio de superficies de vidrio tratadas (parte superior de la figura). Resultados de la comparación entre tratamientos por medio de la prueba de logaritmo de rango (parte inferior de la figura), el asterisco denota diferencias significativas entre tratamientos.

Para el tratamiento de exposición residual por medio de superficies de hojas tratadas las curvas de supervivencia de adultos de *E. mundus* muestran que todos los insecticidas evaluados, tanto a la MCRC como a la mitad de la misma producen una reducción significativa de la supervivencia respecto del control (**Figura 6.10 A y B**). Cipermetrina produjo una mortalidad del 70 % para la MCRC y próxima al 60 % para la mitad de la concentración, transcurridas las primeras 24 h de exposición. El insecticida acetamiprid redujo la supervivencia de forma gradual tras un descenso brusco de la misma, pasadas las 24 h posteriores al tratamiento en ambas dosis evaluadas (MCRC y ½ de la MCRC). Los insecticidas azadiractina, spirotetramat y piriproxifén redujeron la supervivencia de manera paulatina a la MCRC, relación que no se mantuvo en los tratamientos realizados con la mitad de la MCRC, ya que azadiractina se diferenció

significativamente de piriproxifén. En este caso es el insecticida piriproxifén el que reduce en mayor medida la supervivencia en comparación con azadiractina hasta las 48 h posteriores al tratamiento; luego se invierte esta relación.



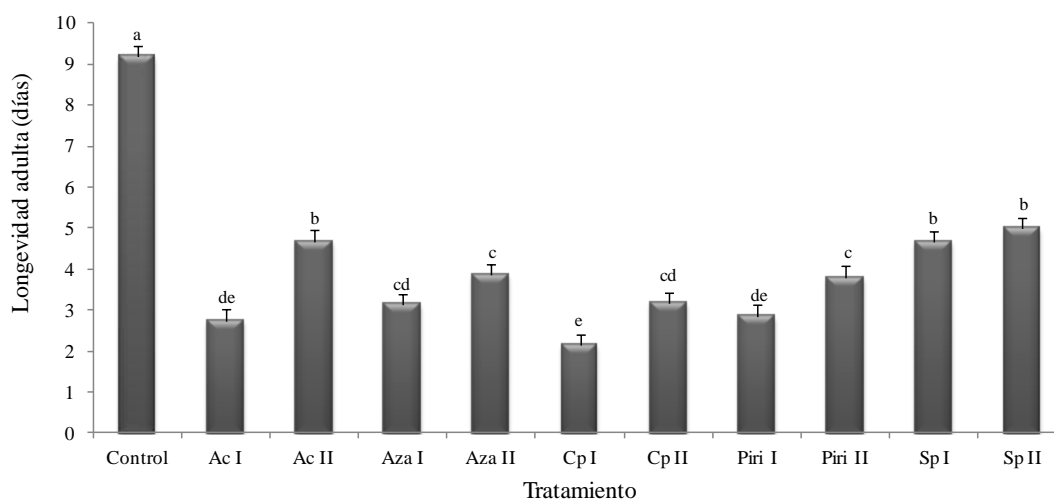
**Figura 6.10:** Toxicidad de la MCRC (A) y de la mitad de la misma (B) de los insecticidas acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotramat sobre la supervivencia del estado adulto de *Eretmocerus mundus* tras el tratamiento residual por medio de superficies de hojas (parte superior de la figura). Resultados de la comparación entre tratamientos por medio de la prueba de logaritmo de rango (parte inferior de la figura), el asterisco denota diferencias significativas entre tratamientos.

*Influencia del tipo de superficie sobre la eficacia del producto:* el ANOVA de dos factores reveló que tanto el tratamiento como la superficie de exposición produjeron un efecto significativo sobre la longevidad postratamiento de los adultos de *E. mundus*; además, se detectó una interacción significativa entre ambos factores (**Tabla 6.1**).

**Tabla 6.1:** Resultados de la prueba de ANOVA de dos factores para evaluar conjuntamente el tratamiento y la superficie sobre la longevidad postratamiento de los adultos de *Eretmocerus mundus*.

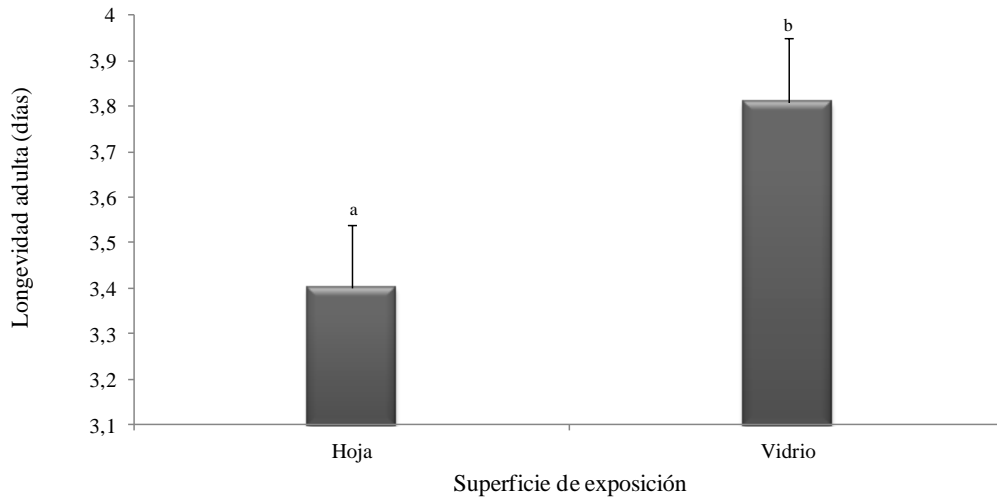
<i>Efecto</i>	<i>SS</i>	<i>g.l</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>Tratamiento</i>	2185,78	10	218,58	57,92	< 0,0001
<i>Superficie</i>	39,024	1	39,024	87,19	< 0,0001
<i>Tratamiento * Superficie</i>	193,67	10	19,36	5,13	< 0,0001

Al evaluar estadísticamente la longevidad adulta en función del tratamiento se observaron diferencias significativas con respecto al control en todos los tratamientos (ANOVA de un factor;  $F= 48,41$ ;  $g.l= 10,649$ ;  $p < 0,0001$ ). Cipermetrina 25 mg i.a/L fue el insecticida más tóxico, los individuos tratados con este insecticida solo vivieron dos días; mientras que ambas concentraciones de spirotetramat y acetamiprid 100 mg i.a/L mostraron la menor toxicidad permitiendo una longevidad cercana a los cinco días aproximadamente (**Figura 6.11**).



**Figura 6.11:** Longevidad de adultos de *Eretmocerus mundus* tratados con diferentes insecticidas. Los datos corresponden a valores medios  $\pm$  ES. Prueba de ANOVA de un factor ( $F= 48,41$ ;  $g.l= 10,649$ ;  $p < 0,0001$ ), letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas. AcI: acetamiprid 200 mg i.a/L, AcII: acetamiprid 100 mg i.a/L, AzaI: azadiractina 40 mg i.a/L, AzaII: azadiractina 20 mg i.a/L, CipI: cipermetrina 25 mg i.a/L, CipII: cipermetrina 12, 5 mg i.a/L, PiriI: piriproxifén 75 mg i.a/L, PiriII: piriproxifén 37, 5 mg i.a/L, SpI: spirotetramat 20 mg i.a/L, SpII: spirotetramat 10 mg i.a/L.

Además se encontraron diferencias significativas cuando se evaluó la longevidad adulta en función de la superficie de exposición, observándose una mayor longevidad en los adultos que fueron tratados por medio de superficies de vidrio (ANOVA de un factor,  $F= 45,23$ ;  $g.l= 1,658$ ;  $p < 0,0001$ ) (**Figura 6.12**).



**Figura 6.12:** Longevidad de adultos de *Eretmocerus mundus* expuestos a insecticidas a través de dos superficies distintas. Los datos corresponden a valores medios  $\pm$  ES. Prueba de ANOVA de un factor ( $F= 45,23$ ;  $g.l= 1,658$ ;  $p < 0,0001$ ), letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

*Evaluación de la capacidad reproductiva de hembras sobrevivientes a la exposición residual:* en la **Tabla 6.2** se muestra los resultados obtenidos para este ensayo. Los puntos finales de evaluación ecotoxicológica para los efectos subletales fueron los siguientes:

Parasitismo efectivo (número de ninfas que muestran signos de parasitismo): ninguno de los insecticidas tuvo un efecto sobre el mismo tanto al primero ( $K= 5,83$ ;  $p= 0,32$ ) como al quinto ( $K= 9,02$ ;  $p= 0,10$ ) día de exposición al huésped.

Porcentaje de emergencia de la progenie (número de adultos emergidos de las ninfas que fueron parasitadas): los insecticidas azadiractina, cipermetrina y piriproxifén se diferenciaron significativamente del control ( $F= 4,96$ ;  $g.l= 5,24$ ;  $p= 0,0029$ ) provocando una reducción de este parámetro en el primer día de exposición al huésped. Al finalizar los cinco días de exposición, solo acetamiprid y piriproxifén fueron diferentes respecto del control ( $F= 1,96$ ;  $g.l= 5,24$ ;  $p= 0,012$ ) y también provocaron una reducción.

Proporción de sexos (número de hembras / (número de machos + número de hembras)) de la progenie: no se observaron diferencias significativas respecto del control para el primer día de exposición al huésped ( $F= 0,67$ ;  $g.l= 5,17$ ;  $p= 0,65$ ) en todos los insecticidas evaluados. Para el quinto día cipermetrina solo fue diferente respecto del control ( $K= 12,12$ ;  $p= 0,03$ ) provocando un sesgo hacia la proporción de machos cercano al 92 %. No obstante, cabe destacar que se observó una tendencia al aumento en el número de machos en la mayoría (acetamiprid, azadiractina, piriproxifén, spirotetramat) de los insecticidas evaluados.

Longevidad de la progenie: se observó una disminución de un 34 - 36 % para los insecticidas acetamiprid, azadiractina y piriproxifén.

**Tabla 6.2:** Efectos subletales de acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat sobre la capacidad reproductiva de las hembras del parasitoide sobrevivientes al tratamiento de exposición residual por medio de superficies de vidrio tratadas. Los datos corresponden a valores medios  $\pm$  ES.

Tratamiento/ Concentración	Parasitismo efectivo <sup>(2)</sup> (1 <sup>er</sup> día de exposición al huésped %)	Parasitismo efectivo <sup>(2)</sup> (acumulado durante 5 días consecutivos %)	Porcentaje de emergencia de la progenie <sup>(1)</sup> (1 <sup>er</sup> día de exposición al huésped )	Porcentaje de emergencia de la progenie <sup>(1)</sup> (acumulado durante 5 días consecutivos )	Proporción de sexos de la progenie <sup>(1)</sup> (1 <sup>er</sup> día de exposición al huésped %)	Proporción de sexos de la progenie <sup>(2)</sup> (acumulado durante 5 días consecutivos %)	Longevidad de la Progenie <sup>(2)</sup>
Control (0 mg i.a/L)	41,33 (20,63) <b>a</b>	40,71 (12,11) <b>a</b>	96 ( $\pm$ 14,99) <b>a</b>	89,99 ( $\pm$ 4,04) <b>a</b>	0,31 ( $\pm$ 0,10) <b>a</b>	0,53 (0,033) <b>a</b>	6,96 (0,09) <b>a</b>
Acetamiprid (100 mg i.a/L)	25,33 (15,38) <b>a</b>	18,67 (9,91) <b>a</b>	64,66 ( $\pm$ 14,99) <b>abc</b>	76,34 ( $\pm$ 4,04) <b>c</b>	0,12 ( $\pm$ 0,12) <b>a</b>	0,146 (0,149) <b>ab</b>	4,49 (0,80) <b>b</b>
Azadiractina (20 mg i.a/L)	17,46 (22,9) <b>a</b>	15,02 (2,19) <b>a</b>	53,99 ( $\pm$ 14,99) <b>bc</b>	88,77( $\pm$ 4,04) <b>ab</b>	0,23 ( $\pm$ 0,14) <b>a</b>	0,26 (0,26) <b>ab</b>	4,61 (0,53) <b>b</b>
Cipermetrina (12,5 mg i.a/L)	49,55 (46,55) <b>a</b>	20,81(17,50) <b>a</b>	29,33 ( $\pm$ 14,99) <b>c</b>	80,67 ( $\pm$ 4,04) <b>abc</b>	0,17 ( $\pm$ 0,12) <b>a</b>	0,084 (0,17) <b>b</b>	4,87 (0,75) <b>ab</b>
Piriproxifén (37,5 mg i.a /L)	11,33 (17,5) <b>a</b>	20,66 (10,33) <b>a</b>	29,33 ( $\pm$ 14,99) <b>c</b>	77,94 ( $\pm$ 4,04) <b>bc</b>	0,0 ( $\pm$ 0,17) <b>a</b>	0,23 (0,08) <b>ab</b>	4,61 (0,53) <b>b</b>
Spirotetramat (20 mg i.a/L)	29,11(21,49) <b>a</b>	30,35 (16,59) <b>a</b>	91 ( $\pm$ 14,99) <b>ab</b>	84,47 ( $\pm$ 4,04) <b>abc</b>	0,27 ( $\pm$ 0,10) <b>a</b>	0,30 (0,26) <b>ab</b>	6,45 (0,10) <b>ab</b>
<i>Análisis Estadístico</i>	K= 5,83 p = 0,32	K = 9,02 p= 0,10	F= 4,96 g.l= ,24 p= 0,0029	F= 1,96 g.l= 5,24 p= 0,012	F= 0,67 g.l= 5,17 p= 0,65	K= 12,13 p= 0,03	K= 20,69 p= 0,0009

<sup>(1)</sup> Prueba de ANOVA; <sup>(2)</sup> Prueba de Kruskal Wallis; letras diferentes dentro de cada columna denotan diferencias significativas entre tratamientos.



## Bioensayos de efectos a largo plazo a nivel comportamental en adultos del parasitoide *E. mundus*

### Respuestas comportamentales frente a residuos de insecticidas

Los resultados obtenidos en este bioensayo muestran que todos los insecticidas evaluados afectaron en alguna medida el comportamiento (alimentación, aseo, caminado, contacto y búsqueda sobre la superficie tratada, temblores, volteo, hiperactividad) del parasitoide *E. mundus*, tanto a la MCRC como a la mitad de la misma (**Tabla 6.3**). Así para la frecuencia del comportamiento *caminado* solo los insecticidas acetamiprid (200 y 100 mg i.a/l) y azadiractina (20 mg i.a/L) se diferenciaron significativamente del control ( $K= 65,11$ ;  $p<0,0001$ ) produciendo un aumento en la misma. Para el *aseo o acicalamiento*, el acetamiprid (200 mg i.a), la azadiractina (20 mg i.a/L) y el piriproxifén (75 mg i.a/L) fueron diferentes del control ( $K= 26,57$ ;  $p= 0,003$ ) y también produjeron un aumento en este comportamiento. La frecuencia de *alimentación* se vio disminuida por los insecticidas acetamiprid (100 mg i.a/L), azadiractina (40 mg i.a/L) y cipermetrina (25 y 12,5 mg i.a/L). Con respecto al *contacto y a la búsqueda sobre la superficie tratada*; todos los insecticidas, con excepción de spirotetramat (20 mg i.a/L), redujeron significativamente la frecuencia de este parámetro con respecto al control ( $F= 4,89$ ;  $g.l= 10,207$ ;  $p= 0,0001$ ). Por último los comportamientos *temblores, volteo e hiperactividad* solo fueron observados para los insecticidas neurotóxicos acetamiprid y cipermetrina; ya que estos cambios solo se producen y se deben a los efectos de estos compuestos sobre el SNC de los insectos, interfiriendo con el funcionamiento del impulso nervioso en las sinapsis entre axones o la unión neuromuscular. El principal efecto de las MCRC de ambos insecticidas fue el *volteo*; los individuos contaminados no lograron recuperarse de la acción del tóxico durante el tiempo de observación y murieron a las 24 h postratamiento. Para la mitad de la MCRC en los parasitoides expuestos a cipermetrina se observaron *temblores* y en los expuestos a acetamiprid un aumento en la actividad locomotora o *hiperactividad*.

En síntesis, los resultados muestran que se puede establecer un orden en la toxicidad de los insecticidas evaluados sobre el comportamiento de los adultos de *E.mundus*: cipermetrina  $\geq$  acetamiprid  $>$  azadiractina = piriproxifén  $>$  spirotetramat.

**Tabla 6.3:** Respuesta comportamental de adultos de *Eretmocerus mundus* frente a residuos de diferentes insecticidas. Los datos corresponden a valores medios  $\pm$  ES.

Tratamiento/ Concentración	Caminado <sup>(2)</sup> (frecuencia)	Contacto y búsqueda sobre la superficie tratada <sup>(1)</sup> (frecuencia)	Aseo/ Acicalamiento <sup>(2)</sup> (frecuencia)	Alimentación <sup>(2)</sup> (frecuencia)	Temblores/Volteo/ Hiperactividad <sup>(1)</sup> (frecuencia)
Control 0 (mg i.a/L)	3,25 (2,88) abc	0,60 ( $\pm$ 0,06) a	4,65 (2,9) a	0,5 (0,68) a	0,0 ( $\pm$ 0,25) a
Acetamiprid 200 (mg i.a/L)	6,75 (5,39) d	0,25 ( $\pm$ 0,06) cdef	8,1 (5,41) b	0,15 (0,36) ab	2,72 ( $\pm$ 0,33) b
Acetamiprid 100 (mg i.a/L)	6,65 (3,12) d	0,11 ( $\pm$ 0,06) ef	5,7 (1,97) ab	0,05 (0,22) b	3,6 ( $\pm$ 0,25) c
Azadiractina 40 (mg i.a/L)	1,5 (2,43) ab	0,24 ( $\pm$ 0,06) cdef	6 (4,93) ab	0,05 (0,22) b	-----
Azadiractina 20 (mg i.a/L)	7,6 (3,31) d	0,21 ( $\pm$ 0,06) cdef	8,3 (4,14) b	0,1 (0,30) ab	-----
Cipermetrina 25 (mg i.a/L)	0,9 (1,9) a	0,30 ( $\pm$ 0,06) bcde	5 (5,53) ab	0,0 (0,0) b	3,53( $\pm$ 0,29 ) c
Cipermetrina 12,5 (mg i.a/L)	3,68 (4,58) abc	0,08 ( $\pm$ 0,06) f	7,36 (6,48) ab	0,05 (0,22) b	5,11 ( $\pm$ 0,27) d
Piriproxifén 75 (mg i.a/L)	5,5 (2,8) cd	0,38 ( $\pm$ 0,06) bc	9,25 (4,91) b	0,15 (0,36) ab	-----
Piriproxifén 37,5 (mg i.a/L)	6,57 (5,15) cd	0,06 ( $\pm$ 0,06) bcd	6,21 (4,03) ab	0,16 (0,37) ab	-----
Spirotetramat 20 (mg i.a/L)	2,75 (3,64) abc	0,44 ( $\pm$ 0,06) ab	3,33 (2,81) ab	0,35 (1,56) ab	-----
Spirotetramat 10 (mg i.a/L)	4,7 (3,06) bcd	0,18 ( $\pm$ 0,06) def	5,95 (3,90) ab	0,25 (0,55) ab	-----
<i>Análisis Estadístico</i>	K=65,11 p<0,0001	F= 4,89 g.l= 10/,207 p= 0,0001	K= 26,57 p= 0,003	K= 22,64 p= 0,01	F= 53,82 g.l= :4,78 p<0,0001

<sup>(1)</sup> Prueba de ANOVA; <sup>(2)</sup> Prueba de Kruskal Wallis; letras diferentes dentro de cada columna denotan diferencias significativas entre tratamientos.

### Respuestas frente a huéspedes tratados y no tratados (ensayos de elección)

Las hembras de *E. mundus* mostraron la capacidad de discernir entre un huésped tratado y uno no tratado, lo que se tradujo en los porcentajes de parasitismo diferencial obtenidos en los ensayos con acetamiprid, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat (Tabla 6.4). En estos tratamientos, las hembras parasitaron más ninfas no tratadas que aquellas que habían recibido tratamiento; para el caso del insecticida azadiractina las hembras no fueron capaces de parasitar ninguno de los dos tipos de ninfas (tratadas y no tratadas). Todos los insecticidas mostraron un efecto disuasorio de la oviposición mayor al 50%, llegando a un valor de 100 % para el insecticida acetamiprid.

**Tabla 6.4:** Efecto de acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat sobre las pruebas de elección de huéspedes para oviposición en hembras del parasitoide *Eretmocerus mundus*. Los datos corresponden a valores medios  $\pm$  ES.

Tratamiento/ Concentración	Parasitismo Efectivo (%)		Estadístico Z de Wilcoxon	P	DO (%)
	PENNT	PENT			
Acetamiprid (200 mg i.a/L)	28,41(15,8)	0,0 (0,00)	5,96	p<0,0001	100
Azadiractina (40 mg i.a/L)	-----	-----	-----	-----	---
Cipermetrina (25 mg i.a/L)	14,10 (12)	0,49 (1,69)	4,053	p<0,0001	89,16
Piriproxifén (75 mg i.a /L)	38,14 (23,5)	1,66 (4,14)	5,47	p<0,0001	96,66
Spirotetramat (20 mg i.a/L)	81,51 (13,51)	3,61 (5,58)	16,5	p<0,0001	95,46

PENNT: % parasitismo efectivo ninfas no tratadas.

PENT: % parasitismo efectivo ninfas tratadas.

DO: efecto disuasorio de la oviposición (Riba y Martí, 1996; Alzogaray *et al.*, 2000).

### Respuestas comportamentales durante la cópula y la oviposición

La **Tabla 6.5** presenta los resultados obtenidos en el ensayo de *cópula*. Se puede observar que:

Los insecticidas acetamiprid y azadiractina modificaron el tiempo de encuentro entre el macho y la hembra produciendo un aumento en el mismo ( $K= 19$ ,  $p= 0,001$ ).

La posición del macho con respecto a la hembra al momento de la cópula solo se vio modificada por los insecticidas acetamiprid y azadiractina debido a que la hembra se encontraba recostada sobre uno de sus laterales o no adoptaba una actitud pasiva dificultando la subida y el agarre del macho.

El tiempo de duración de la cópula solo fue diferente del control para el insecticida azadiractina ( $K= 11$ ,  $p= 0,028$ ). No obstante, cabe destacar que se observó un aumento en el mismo para resto de los insecticidas evaluados.

El insecticida piriproxifén (75 mg i.a/L) no pudo ser evaluado en su totalidad ya que durante el tiempo de observación los individuos evaluados de todas las parejas con excepción de una, realizaron trabajos de limpieza o permanecieron quietos en los extremos opuestos del vial de observación. La única pareja en la cual pudo corroborarse la cópula, mostró una modificación en el tiempo de encuentro y en la duración de la cópula, aunque la posición del macho con respecto a la hembra al momento de la cópula fue normal.

El insecticida spirotetramat (20 mg i.a/L) no fue diferente respecto del control para ninguno de los parámetros evaluados.

Por último, por su efecto tóxico, la cipermetrina a la MCRC (25 mg i.a/L) no pudo ser evaluada en este ensayo.

**Tabla 6.5:** Respuestas comportamentales observadas en parejas de *Eretmocerus mundus* al momento de la cópula. Los datos corresponden a valores medios  $\pm$  ES.

Tratamiento/ Concentración	Tiempo transcurrido hasta el encuentro entre macho y hembra (s) <sup>(1)</sup>	Posición del macho con respecto a la hembra al momento de la cópula	Duración de la cópula(s) <sup>(1)</sup>
Control (0 mg i.a/L)	24 (11,38) <b>a</b>	Normal	2,9 (0,55) <b>a</b>
Acetamiprid (200 mg i.a /L)	195 (292) <b>b</b>	Anormal	49 (37) <b>ab</b>
Azadiractina (40 mg i.a/L)	690 (782) <b>b</b>	Anormal	79 (56) <b>b</b>
Spirotetramat (20 mg i.a/L)	77 (84) <b>ab</b>	Normal	29 (48) <b>ab</b>
<i>Análisis Estadístico</i>	$K= 19$ $p= 0,001$		$K= 11$ $p= 0,028$

<sup>(1)</sup> Prueba de Kruskal Wallis; letras diferentes dentro de cada columna denotan diferencias significativas entre tratamientos.

En los ensayos de *oviposición* y *parasitismo* realizados con las hembras del parasitoide *E. mundus* se observó que todos los insecticidas, con excepción de spirotetramat 20 mg i.a/L, retardan el encuentro con el huésped (la hembra tarda más en encontrarlos) y modifican la secuencia normal de comportamientos seguidos al encuentro del mismo y previos a la oviposición.

Las hembras tratadas con acetamiprid y piriproxifén fueron las que más tardaron en encontrar al huésped, en las tratadas con spirotetramat el tiempo no fue significativamente diferente respecto del control ( $K= 30,18$ ;  $p \leq 0,0001$ ) (**Tabla 6.6**). Las hembras tratadas con azadiractina no lograron encontrar al huésped, ya que realizaron trabajos de limpieza o permanecieron quietas durante el tiempo de observación. Como en los ensayos anteriores, las hembras tratadas con cipermetrina mostraron síntomas de intoxicación neurotóxica (como temblores y volteo) por lo que no fueron incluidas en la evaluación.

**Tabla 6.6:** Tiempo empleado por las hembras de *Eretmocerus mundus* en la búsqueda de su huésped tras ser tratadas con insecticidas. Los datos corresponden a valores medios  $\pm$  ES

Tratamiento /Concentración	Tiempo transcurrido hasta el encuentro del huésped <sup>(1)</sup>
Control (0 mg i.a/L)	9,33 ( $\pm$ 5,30) <b>a</b>
Acetamiprid (200 mg i.a/L)	390 ( $\pm$ 182) <b>b</b>
Piriproxifén (75 mg i.a/L)	43,75 (23) <b>b</b>
Spirotetramat (20 mg i.a/L)	15 (4,26) <b>a</b>
<i>Análisis Estadístico</i>	K= 30,18 p<0,0001

<sup>(1)</sup> Prueba de Kruskal Wallis; letras diferentes dentro de cada columna denotan diferencias significativas entre tratamientos.

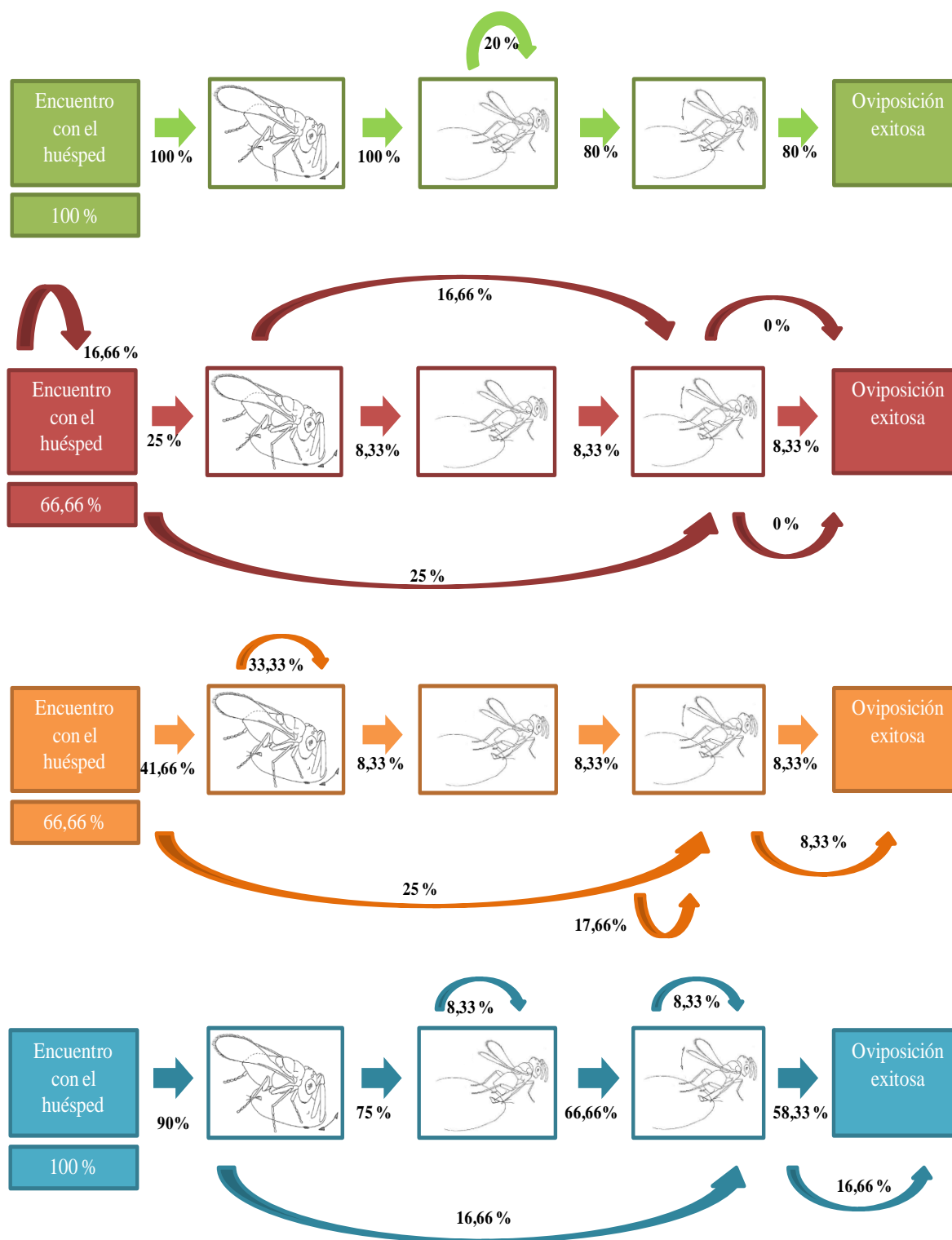
Los comportamientos relacionados con la evaluación de la calidad del huésped y previos a la oviposición, también se vieron modificados por la acción de los distintos insecticidas (**Figura 6.13**).

La prueba antenal fue realizada por el 25 y el 42 % de las hembras tratadas con los insecticidas acetamiprid y piriproxifén respectivamente; el resto de las hembras realizó principalmente trabajos de limpieza frotándose las antenas o las mandíbulas con el primer par de patas o las patas entre sí. Spirotetramat no modificó este comportamiento, ya que el 92 % de las hembras realizó la prueba antenal característica.

Por otro lado, la prueba con el ovipositor sólo fue realizada por el 8,33 % de las hembras que fueron tratadas con los insecticidas acetamiprid y piriproxifén. En general, las hembras tratadas obviaban este comportamiento y adoptaban directamente la postura de oviposición formando, en la mayoría de los casos, un ángulo recto con respecto al huésped. Nuevamente spirotetramat fue el insecticida con menor impacto sobre este comportamiento ya que afectó solamente al 17 % de las hembras aproximadamente.

La adopción de la postura de oviposición fue llevada a cabo por el 50,34 y 83 % de las hembras tratadas con acetamiprid, piriproxifén y spirotetramat, respectivamente.

Para comprobar el éxito de la oviposición, las ninfas expuestas a las hembras de *E. mundus* fueron observadas hasta el reconocimiento de los signos de parasitismo efectivo (desplazamiento de los micetomas de las ninfas hacia los laterales de la misma o formación de pupas anaranjadas). Solo el 8,33; 16,66 y el 75 % de las hembras tratadas con acetamiprid, piriproxifén y spirotetramat respectivamente mostraron una oviposición exitosa.



**Figura 6.13:** Esquemas cuantitativos de los comportamientos seguidos por las hembras de *Eretmocerus mundus* tratadas con diferentes insecticidas tras el encuentro de su huésped. **Verde:** control, **Rojo:** acetamiprid 200 mg i.a/L, **Naranja:** piriproxifen 75 mg i.a /L, **Celeste:** spirotetramat 20 mg i.a/L. Azadiractina 40 mg i.a/L y cipermetrina 25 mg i.a /L no son representados debido a que las hembras tratadas con estos insecticidas no fueron capaces de encontrar a su huésped. Las flechas indican el pasaje unidireccional entre uno y otro paso de la secuencia de comportamiento. Los números indican el porcentaje de hembras que realizaron el comportamiento.

## Bioensayo de efectos a largo plazo sobre la demografía del parasitoide *E. mundus*

### Efecto de spirotetramat sobre parámetros biológicos de *E.mundus*

Spirotetramat redujo la longevidad de los machos y de las hembras adultas (**Tabla 6.7**). Las hembras tratadas mostraron una marcada disminución del parasitismo efectivo (56 %) respecto del control ( $F= 79,75$ ;  $g.l= 1,27$ ;  $p< 0,0001$ ). El porcentaje de emergencia de la progenie fue menor y significativamente diferente del control ( $F= 104,83$ ;  $g.l= 1,27$ ;  $p< 0,0001$ ). Además, la proporción de sexos de la descendencia se vio sesgada hacia los machos (0,61: 0,31) en la cohorte tratada con spirotetramat en comparación con el control (0,49: 0,51).

**Tabla 6.7:** Efectos subletales de la exposición de adultos de *Eretmocerus mundus* a spirotetramat sobre diferentes parámetros biológicos. Los datos corresponden a valores medios  $\pm$  ES.

Tratamiento/ Concentración	Longevidad (días)		Parasitismo Efectivo (%) <sup>(a)</sup> <sup>(1)</sup>	Porcentaje de emergencia de la progenie <sup>(b)</sup> <sup>(1)</sup>	Proporción de sexos(hembras) <sup>(c)</sup> <sup>(2)</sup>
	Machos <sup>(1)</sup>	Hembras <sup>(2)</sup>			
Control (0 mg i.a/L)	10,18( $\pm$ 0,22) <b>a</b>	9,28 (0,6) <b>a</b>	71,07 ( $\pm$ 3,26) <b>a</b>	68,85 ( $\pm$ 2,94) <b>a</b>	0,51 (0,034) <b>a</b>
Spirotetramat (20 mg i.a/L)	5,93 ( $\pm$ 0,22) <b>b</b>	5,73 (1,4) <b>b</b>	30 ( $\pm$ 3,15) <b>b</b>	27 ( $\pm$ 2,84) <b>b</b>	0,39 (0,23) <b>b</b>
<i>Análisis Estadístico</i>	F= 174 g.l= 1,29 p< 0,0001	K= 21,52 p= 0,05	F= 79,75 g.l= 1,27 p< 0,0001	F= 104,83 g.l = 1, 27 p< 0,0001	K= 8,88 p:0,05

<sup>(1)</sup> Prueba de ANOVA; <sup>(2)</sup> Prueba de Kruskal Wallis; letras diferentes dentro de cada columna denotan diferencias significativas entre tratamientos.

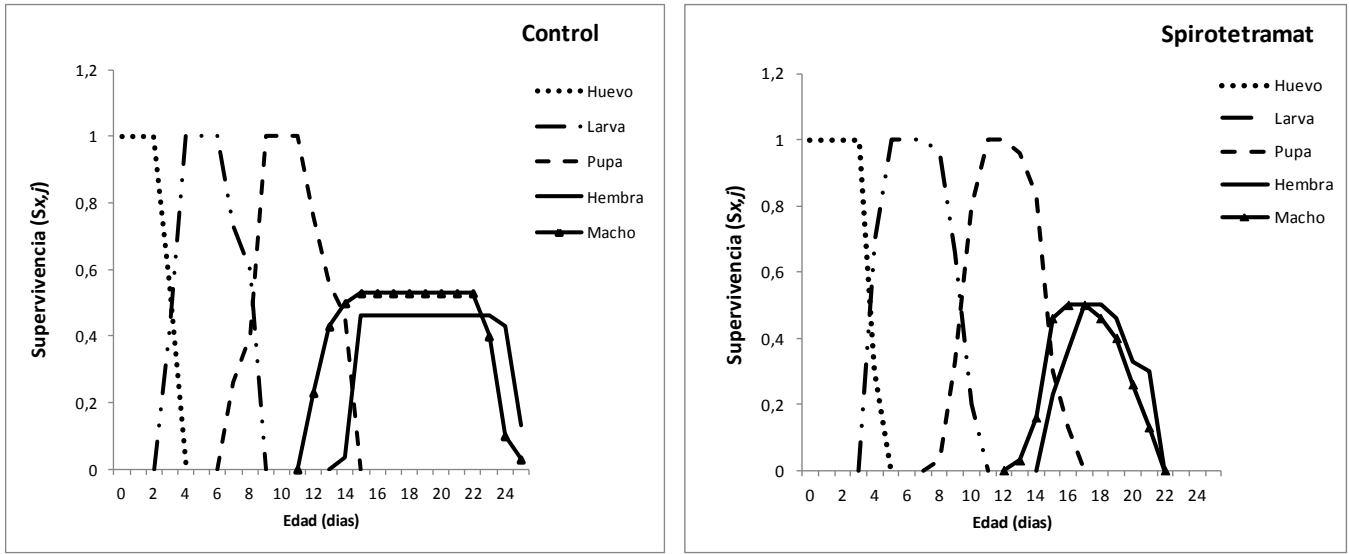
a: número de huéspedes que muestran signos de parasitismo.

b: porcentaje de adultos emergidos de los huéspedes que fueron parasitados.

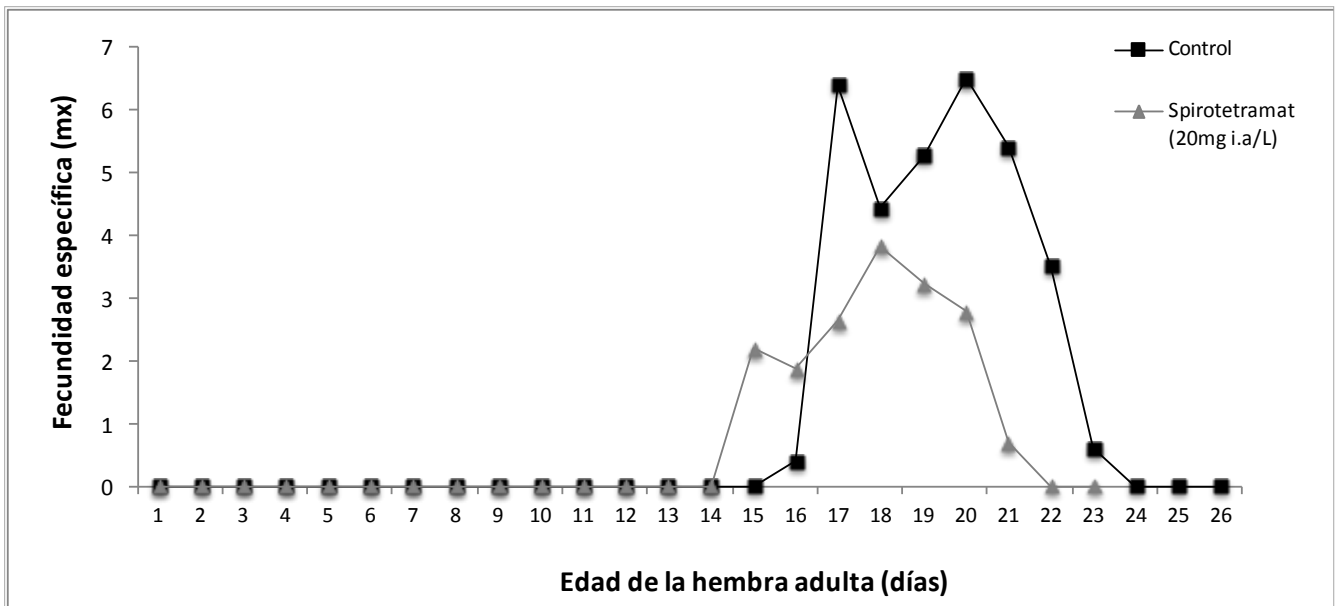
c: número de hembras / ( número de machos + número de hembras).

El efecto negativo de spirotetramat también puede ser observado en las curvas de supervivencia por estado ( $S_x, j$ ) (**Figura 6.14**). La mortalidad de los adultos de la cohorte tratada con spirotetramat fue del 20 % aproximadamente, mientras que la mortalidad natural en la cohorte control fue casi nula, como resultado se obtuvieron curvas de supervivencia más bajas en la etapa adulta. La fecundidad específica ( $m_x$ ) se redujo en las hembras tratadas con el insecticida (**Figura 6.15**).





**Figura 6.14:** Supervivencia por estado y edad ( $S_{x,j}$ ) de *Eretmocerus mundus*; **Control** (sin insecticida) y **spirotetramat**. La flecha indica el momento de exposición del parasitoide (estado adulto) al insecticida.



**Figura 6.15:** Fecundidad específica ( $m_x$ ) en hembras de *Eretmocerus mundus*; **Control** (sin insecticida) y **spirotetramat**. La flecha indica el momento de exposición del parasitoide (estado adulto) al insecticida.

### Efecto de spirotetramat sobre parámetros demográficos de *E. mundus*

La aplicación de spirotetramat sobre los adultos de *E. mundus* afectó la mayoría de los parámetros demográficos evaluados (**Tabla 6.8**). Se observó una reducción en la tasa intrínseca de crecimiento ( $r$ ) (KS= 5,44;  $p < 0,0001$ ) y en la tasa reproductiva neta ( $Ro$ ) ( $t = 24,52$ ;  $p < 0,0001$ ) del 17 y 52% respectivamente, comparado con el control. El tiempo generacional se redujo aproximadamente un 8% en comparación a la población control (KS= 7,07;  $p < 0,0001$ ).

**Tabla 6.8:** Efectos de spirotetramat sobre los parámetros demográficos de *Eretmocerus mundus* expuestos al insecticida en el estado adulto. Los datos corresponden a valores medios  $\pm$  ES.

Parámetros poblacionales	Control (0 mg i.a/L)	Spirotetramat (20 mg i.a/L)	Análisis Estadístico
Tasa intrínseca de crecimiento ( $r$ ) **	0,18 ( $\pm 0,01$ ) a	0,15 ( $\pm 0,01$ ) b	KS= 5,44 $p < 0,0001$
Tasa reproductiva neta ( $Ro$ )*	31,76 ( $\pm 6,05$ ) a	15,11 ( $\pm 3,07$ ) b	$t = 24,52$ $p < 0,0001$
Tiempo generacional ( $T$ )**	19,08 ( $\pm 0,12$ ) a	17,39 ( $\pm 0,27$ ) b	KS= 7,07 $p < 0,0001$

Las medias de los datos fueron obtenidas por el método Bootstrap. \* Prueba de t de Student, \*\* Prueba de Kolomogorov-Smirnov. Dentro de cada fila los datos seguidos con letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos.

## 6.4 Discusión

Un aspecto importante en la evaluación del potencial de un enemigo natural como agente de control biológico radica en la realización de estudios tanto de la biología de la especie como de su compatibilidad con diferentes insecticidas. La evaluación de la selectividad de los plaguicidas implica el conocimiento de los efectos letales (a corto plazo) y subletales (a largo plazo) de estos sobre los enemigos naturales (Stark *et al.*, 2004). La necesidad de conocer los efectos subletales de los plaguicidas sobre los enemigos naturales de plagas agrícolas se ha ido incrementando en los últimos años (Stark y Banks, 2003; Desneux *et al.*, 2007) ya que pueden condicionar el desempeño del enemigo natural como agente de control biológico. Debido a que estudios previos (Schneider *et al.*, 2004, 2008, 2009; Rimoldi *et al.*, 2008, 2012 a, b; Francesena *et al.*, 2008, 2012, 2013; Fogel *et al.*, 2009, 2013; Benamú *et al.*, 2010, 2013; Haramboure *et al.*, 2010, 2013; Mirande *et al.*, 2010) han demostrado que

concentraciones subletales producen efectos secundarios de importancia en los enemigos naturales, la ecotoxicología actual no puede desconocer ni subvalorar estos parámetros cuando se evalúa un tóxico, de cara a compatibilizar el control químico y el biológico.

Los bioensayos de toxicidad, comportamentales y demográficos realizados con adultos del parasitoide, mostraron que los insecticidas evaluados producen tanto efectos letales como subletales en *E. mundus*.

Los resultados de los bioensayos de toxicidad realizados a través de exposición residual por medio de superficie tratada (vidrio–hoja), muestran que todos los insecticidas evaluados redujeron la supervivencia de los adultos de *E. mundus*, independientemente de la concentración y el insecticida. Cipermetrina fue el insecticida más tóxico y el que mostró una elevada disminución en la supervivencia (aproximadamente un 80 % de mortalidad) a las 24 h de realizado el tratamiento. Similares resultados han sido descritos por Sugiyama *et al.*, (2011) quienes encontraron una baja supervivencia en adultos de *E. mundus*, *E. formosa* y *E. eremicus* tratados con piretroides sintéticos. Asimismo Suh *et al.*, (2000) observaron una elevada mortalidad durante las primeras 24 h postratamiento en adultos de *Trichogramma exiguum* Pinto y Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae) expuestos a cipermetrina. Del mismo modo Saber *et al.*, (2005) y Desneux *et al.*, (2006a) observaron un efecto tóxico, acompañado de una baja supervivencia de deltametrina sobre *Trissolcus grandis* Thomson (Hymenoptera: Scelionidae) y *D. rapae*, respectivamente. Los insecticidas acetamiprid, azadiractina y piriproxifén mostraron menor toxicidad en comparación con cipermetrina; tras un descenso inicial de la supervivencia transcurridas las primeras horas del tratamiento, se observó una disminución cercana al 10 % durante el tiempo restante del ensayo. Estos resultados son consistentes con lo reportado por diversos autores quienes han señalado una baja toxicidad (efectos a corto plazo) y un alto porcentaje de supervivencia asociados a piriproxifén (Prabhaker *et al.*, 2007; Sugiyama *et al.*, 2011; Vanaclocha *et al.*, 2013) como así también para azadiractina (Prince y Schuster 1991; Zuazua *et al.*, 2003; Luna Cruz *et al.*, 2011) en adultos de parasitoides de diferentes géneros (*Aphytis*, *Aphidius*, *Encarsia*, *Eretmocerus*, *Tamarixia*) del orden Hymenoptera. En cuanto al acetamiprid, su selectividad en comparación con los insecticidas convencionales, es discutida teniendo en cuenta los altos valores de toxicidad obtenidos en adultos del parasitoide *E. mundus*. Efectos similares han sido citados por Prabhaker *et al.*, (2007) en adultos de *A. melinus*, *E. eremicus* y *E. formosa* y por Sugiyama *et al.*, (2011) para adultos de *E. mundus*, *E. eremicus* y *E. formosa* tratados con este

insecticida. Spirotetramat resultó ser el menos tóxico de todos los insecticidas evaluados. Resultados similares fueron reportados por Frewin *et al.*, (2012) para *A. certus*, por Moens *et al.*, (2012) para *M. mediator* y por Vanaclocha *et al.*, (2012) y Garcerá *et al.*, (2013) para *A. melinus*.

En estos ensayos la superficie de exposición desempeñó un papel importante en cuanto a la toxicidad. Así, el tratamiento realizado con hojas mostró una mayor disminución en la supervivencia que el tratamiento realizado en superficie de vidrio a igual concentración. Estos resultados podrían deberse a que quizás los metabolitos secundarios producidos por la degradación del insecticida por acción metabólica de la hoja, resulten más tóxicos que el insecticida en sí (Castro Jiménez, 2002). Esta susceptibilidad diferencial frente a diferentes superficies de exposición coincide con lo reportado por Desneux *et al.*, (2006b), quienes encontraron diferencias en la mortalidad de adultos de *A. ervi* tratados por medio de distintas vías de exposición con deltametrina. También Wang *et al.*, (2008) obtuvieron resultados equivalentes con adultos de *Anagrus nilaparvatae* Pang y Wang (Hymenoptera: Mymaridae) tratados con 14 insecticidas diferentes (organofosforados, carbamatos, piretroides, insecticidas reguladores del crecimiento, neonicotinoides entre otros) en ensayos con residuos sobre discos foliares y vidrio. Liu *et al.*, (2012) encontraron además este tipo de diferencias pero para el parasitoide *T. triozae*. Los presentes estudios comprueban que las superficies inertes (vidrio) propuestas por la OICB para evaluar el efecto residual de los plaguicidas pueden subestimar el efecto tóxico de los mismos sobre organismos no blanco.

Conjuntamente con el análisis de supervivencia en los ensayos de toxicidad se evaluaron los efectos subletales de la MCRC del insecticida spirotetramat y el efecto de la mitad de la misma de los insecticidas acetamiprid, azadiractina, cipermetrina y piriproxifén sobre la capacidad reproductiva de hembras sobrevivientes al tratamiento residual en vidrio.

Ninguno de los insecticidas evaluados redujo el parasitismo efectivo de las hembras. Cipermetrina redujo el porcentaje de emergencia de la progenie (primer día de exposición) y fue el único insecticida que generó un sesgo en la proporción de sexos de la progenie hacia los machos. Resultados similares fueron encontrados por Abedi *et al.*, (2014) quienes observaron una disminución en el número de huevos puestos por hembra y en la fecundidad en adultos del parasitoide *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) tratados con cipermetrina sin embargo la proporción de sexos no se vio

alterada. Los insecticidas acetamiprid y piriproxifén afectaron el porcentaje de emergencia y la longevidad de la progenie. Estos resultados concuerdan, en parte, con lo reportado por Sohrabi *et al.*, (2013) quienes observaron que imidacloprid (neonicotinoide) afectó la fecundidad de las hembras del parasitoide *E. mundus*, mientras que buprofezin (IGRs) no tuvo efecto sobre este parámetro. Estos mismos insecticidas no afectaron la capacidad reproductiva de las hembras del parasitoide *E. inaron* (Sohrabi *et al.*, 2012). El insecticida azadiractina también provocó una reducción en el porcentaje de emergencia y la longevidad de la progenie. Estas observaciones son consistentes con lo reportado por Abedi *et al.*, (2014) quienes observaron que azadiractina provocó una reducción en la oviposición y en la fecundidad en las hembras del parasitoide *H. hebetor*. Sin embargo Schneider., (2002) no observó efectos adversos de este insecticida sobre la capacidad reproductiva de hembras del parasitoide *H. didymator*. Spirotetramat no afectó la capacidad reproductiva de las hembras. Resultados similares han sido encontrados por Mansour *et al.*, (2011) y Moens *et al.*, (2012) para *A. sp. near pseudococci* y *M. mediator* respectivamente.

Los resultados de los bioensayos sobre el comportamiento de *E. mundus* muestran que la mayoría de los insecticidas evaluados en este capítulo de tesis afectaron el desempeño normal tanto de las hembras como de los machos del parasitoide, en los comportamientos asociados a los mecanismos de cópula, búsqueda del huésped, oviposición y parasitismo.

Los resultados obtenidos en el ensayo de respuesta comportamental frente a residuos de insecticidas sugieren que los adultos de *E. mundus* son susceptibles a cuatro de los cinco insecticidas evaluados (acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén) y evidencian el efecto negativo de estos sobre el comportamiento del parasitoide. Las respuestas encontradas fueron variadas. El primer tipo de respuesta observado en los parasitoides al entrar en contacto con los residuos del insecticida fue el aseo y acicalamiento. Si bien solo se vio un aumento en las frecuencias de este en los individuos tratados con acetamiprid, azadiractina y piriproxifén, en el resto de los tratamientos también se observó este tipo de comportamiento. Algunos autores sugieren que el aseo es un acto reflejo iniciado por una irritación de los quimio y mecanoreceptores que se encuentran en la superficie del cuerpo del insecto (Reingold y Camhi, 1978). Por lo que la realización de este comportamiento eliminaría los contaminantes de las áreas irritadas afectadas (Gratwick, 1975). Inmediatamente después del aseo, se vio que los insecticidas acetamiprid y cipermetrina provocaron

temblores, volteo e hiperactividad, respuestas esperables y relacionadas con el deterioro en la percepción y en las actividades motoras que estos insecticidas causan al actuar sobre el SNC (Haynes, 1988). Comportamientos similares asociados con la intoxicación por insecticidas neurotóxicos, han sido observados por Longly y Jepson, (1996) en adultos de *Aphidius rhopalosiphii* de Stefani-Perez (Hymenoptera: Braconidae) expuestos a deltametrina. De igual manera Salerno *et al.*, (2002) y Desneux *et al.*, (2004a) vieron también que las hembras del parasitoide *Trissolcus basalis* Wollaston (Hymenoptera: Scelionidae) y las hembras de *A. ervi*, eran incapaces de mantener una postura normal o caminar normalmente durante las primeras 24 h posteriores al tratamiento con deltametrina y lambda-cyhalothrin respectivamente.

Asimismo se pudieron observar otros tipos de comportamientos y respuestas como un aumento en la frecuencia de caminado (en acetamiprid, azadiractina y piriproxifén) asociada quizás a la irritación que producen los insecticidas sobre los mecano y quimiorreceptores como se mencionó anteriormente. Una disminución en la alimentación (en acetamiprid, azadiractina y cipermetrina) que podría deberse a una estimulación disuasoria de los quimiorreceptores localizados sobre la superficie de las partes bucales del insecto como así también a una interferencia de la fagoestimulación producida por el insecticida (Schumutter, 1990; Mordue (Luntz) *et al.*, 1998). Y finalmente para todos los insecticidas con excepción de spirotetramat se vio una reducción en el contacto y la búsqueda sobre la superficie tratada. Con respecto a este último punto resultados similares han sido reportados por Bartlett, (1965) quien observo que al exponer individuos de dos especies de parasitoides *A. melinus* y *Metaphycus luteolus* Timberlake (Hymenoptera: Encyrtidae) a una superficie mitad tratada con insecticida y mitad no tratada, los adultos permanecían más tiempo en la mitad donde no había insecticida. Longley y Jepson, (1996) también reportaron que las hembras de *A. rhopalosiphii* tendían a permanecer poco tiempo o evitaban los parches que contenían huéspedes de *Sitobion avenae* Fabricius (Hemiptera: Aphididae) tratados con deltametrina. Por último el insecticida spirotetramat no tuvo ningún efecto sobre las conductas de comportamiento.

Los ensayos de elección mostraron que las hembras de *E. mundus* poseen cierta capacidad para discernir (con excepción de azadiractina) un huésped tratado con insecticida de uno no tratado para su parasitación. Los niveles de parasitismo observados en los ensayos realizados con las MCRD de los insecticidas acetamiprid, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat fueron mayores en los huéspedes no

contaminados. Esta diferencia en cada una de las opciones (huésped tratado *versus* huésped no tratado) está relacionada y quizás se deba al alto porcentaje encontrado para el efecto disuasorio de la oviposición en cada uno de los tratamientos. Si bien no existe demasiada literatura al respecto, estos resultados coinciden con lo reportado por Liu y Standly, (1997) quienes observaron que al ofrecer huéspedes tratados y no tratados con el insecticida piriproxifén a hembras de los parasitoides *E. tranversa*, *E. formosa* y *E. pergandiela*, los niveles de parasitismo resultaron más elevados en las ninfas sin tratar. Asimismo, Hoddle *et al.*, (2001) reportaron que las hembras del parasitoide *E. eremicus* realizaron más búsquedas de huéspedes en las hojas no tratadas con insecticida que en las tratadas con piriproxifén. Schneider, (2002) también observó que los hembras del parasitoide *H. didymator* fueron capaces de elegir entre huéspedes tratados y no tratados con los insecticidas diflubenzuron y spinosad. En cuanto a las pruebas de elección realizadas con el insecticida azadiractina las hembras no fueron capaces de diferenciar un huésped tratado de uno no tratado. No se observó parasitismo en ninguna de las opciones ofrecidas (huésped tratado *versus* huésped no tratado); esto podría deberse a la alto poder repelente (Barlet., 1965) y al efecto antialimentario que produce este compuesto y que ha sido estudiado en diferentes insectos (Shmutterer, 1990). Contrariamente a lo observado aquí Schneider, (2002) observó que las hembras del parasitoide *H. didymator* parasitaron más cantidad de larvas de *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae) no tratadas que tratadas con este insecticida.

Para finalizar la parte de la discusión referida a los aspectos comportamentales en *E. mundus*, cabe señalar que los resultados de los ensayos de cópula mostraron que el tiempo requerido por el macho para encontrar a la hembra y la posición de este, con respecto a la hembra en el momento de la cópula, solo se vieron modificadas por los insecticidas acetamiprid (200 mg i.a/L) y azadiractina (40 mg i.a/L). El tiempo de duración de la cópula solo fue afectado por azadiractina, aunque se observó un aumento en el mismo en el resto de los insecticidas evaluados. Nuevamente aquí el insecticida spirotetramat (20 mg i.a/L) no mostró ningún tipo de efecto sobre los puntos finales evaluados. Si bien existe literatura sobre como los insecticidas afectan la percepción de las feromonas sexuales en insectos (Delpuech *et al.*, 1998, 1999, a, b, 2012; Bayram *et al.*, 2010) que brinda una posible explicación al aumento del tiempo de encuentro entre machos y hembras del parasitoide *E. mundus* previo a la cópula. No hay suficiente información acerca de la modificación que podrían generar los diferentes insecticidas en la secuencia de comportamientos seguida al encuentro entre macho y hembra y que

culmina con la cópula. Por lo tanto, resulta difícil atribuir una posible causa a los mismos.

Los resultados de los ensayos de oviposición y parasitismo realizados con las hembras de *E. mundus* mostraron que todos los insecticidas (con excepción de spirotetramat) retardan el encuentro con el huésped y que en los casos en los que pudo ser evaluado (acetamiprid, piriproxifén y spirotetramat) también modifican la secuencia normal de comportamientos seguidos al encuentro del huésped y previos a la oviposición. Acetamiprid fue el insecticida que mayor incidencia tuvo sobre los comportamientos asociados con la oviposición. Esto coincide con lo reportado por Tran *et al.*, (2004) quienes observaron que el insecticida imidacloprid (neonicotinoide) retrasó el encuentro con el huésped, disminuyó las frecuencias de la prueba de oviposición y la oviposición propiamente dicha de las hembras del parasitoide *Neochrysocharis formosa* Westwood (Hymenoptera: Eulophidae) tratadas con este insecticida. Desneux *et al.*, (2004a) también observaron una disminución en las frecuencias de los comportamientos de oviposición (prueba antenal, prueba con el ovipositor y oviposición) en hembras del parasitoide *A. ervi* tratadas con lambda-cyhalothrin. Sin embargo, las hembras de los parasitoides *D. rapae* y *Aphidius matricariae* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) no mostraron modificación en las frecuencias de los comportamientos asociados a la oviposición al ser tratadas con deltametrina (Desneux *et al.*, 2004b). El insecticida piriproxifén causó un efecto intermedio, tras el encuentro con el huésped las hembras o bien realizaban la prueba antenal y luego se dedicaban a realizar trabajos de aseo; o adoptaban directamente la postura de oviposición saltándose los pasos previos. Spirotetramat fue el insecticida que menos modificó la secuencia normal de comportamientos previos a la oviposición.

Por último los efectos subletales de los insecticidas sobre los adultos de los enemigos naturales, son relevantes a la hora de considerar el crecimiento poblacional, ya que la alteración de la supervivencia y los parámetros reproductivos impacta directamente en los parámetros demográficos (tasa intrínseca de crecimiento poblacional y tasa neta reproductiva) y condiciona el crecimiento poblacional de la especie en cuestión, pudiendo reducir o eliminar las poblaciones del mismo a nivel local (Stark *et al.*, 2003). De este modo podrían poner en riesgo el equilibrio de las relaciones tróficas presentes en los agroecosistemas, como las relaciones depredador-presa, huésped-parasitoide.



El ensayo demográfico realizado con la MCRC del insecticida spirotetramat mostró que este afecta tanto los parámetros biológicos como los parámetros demográficos, reduciendo la tasa intrínseca de crecimiento poblacional  $r$ , la tasa reproductiva neta  $R_0$  y el tiempo generacional  $T$ . Estos estudios son novedosos y representan el primer reporte de efectos subletales de este insecticida a nivel demográfico. Los resultados obtenidos aquí aportan evidencia significativa que debería ser tenida en cuenta a la hora de incorporar este insecticida en programas de MIP, si bien primero debería ser corroborada su acción en condiciones de campo.

Los bioensayos realizados en este capítulo de tesis proporcionan nuevos conocimientos sobre los efectos subletales de los insecticidas acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y spirotetramat y ponen de relieve una vez más la importancia de las evaluaciones de los mismos en los estudios ecotoxicológicos realizados de cara a la implementación de un programa de MIP, en donde el control biológico sea la principal herramienta utilizada.

Asimismo estos resultados aportan importante información sobre la selectividad de estos insecticidas hacia los adultos de *E. mundus*, evidenciando que estos muestran una alta susceptibilidad hacia cipermetrina y acetamiprid, siguiendo por azadiractina y piriproxifén y finalmente hacia spirotetramat.

Un importante punto que cabe mencionar al finalizar esta discusión es el alto impacto que tuvieron la mayoría (con excepción de spirotetramat) de los insecticidas sobre el desempeño normal de las hembras del parasitoide en los comportamientos asociados a la búsqueda del huésped, oviposición y parasitismo. Aspectos relevantes, junto con otros atributos, de la biología del parasitoide que son importantes a la hora de la implementación de un programa de control biológico exitoso.

# **CAPITULO 7**

## **“Conclusiones”**

La evaluación ecotoxicológica de los efectos de los plaguicidas sobre los enemigos naturales de plagas agrícolas constituye actualmente un objetivo primordial en países desarrollados. En Argentina, estudios de este tipo resultan novedosos y aportan información de base para la toma de decisiones en el marco del manejo sustentable de agroecosistemas. Teniendo en cuenta que la agricultura es uno de los pilares fundamentales de la economía en el país, la búsqueda de programas de manejo tendientes a disminuir los niveles de ingreso de plaguicidas a los ecosistemas, debería ser un objetivo primordial. Para ello, resulta imprescindible conocer la selectividad de los plaguicidas sobre los enemigos naturales y otros organismos benéficos (polinizadores), comúnmente presentes en los agroecosistemas. Estas evaluaciones deben considerar tanto la eficacia de acción sobre la plaga, como la toxicidad potencial sobre los enemigos naturales, prestando especial atención en la susceptibilidad de cada estadio y en los efectos subletales, que son considerados en menor medida en estudios afines.

El análisis de los resultados de los experimentos descriptos en esta tesis permite arribar a las siguientes conclusiones:

- ✚ El segundo estadio ninfal de *B. tabaci* (estadio preferido por el parasitoide *E. mundus* para la oviposición) mostró una susceptibilidad diferencial hacia los diferentes grupos de insecticidas evaluados. El insecticida azadiractina resultó ser el más tóxico (efectivo de cara al control) y piriproxifén el menos tóxico (menos efectivo de cara al control). Cipermetrina y acetamiprid mostraron una baja eficacia en el control de esta especie de mosca blanca, observándose un cierto grado de tolerancia por parte de las ninfas hacia estos insecticidas. Spirotetramat mostró una toxicidad media-alta, modificó el comportamiento de oviposición (las hembras no oviponen en hojas tratadas con este insecticida) de los adultos de *B. tabaci*; no afectó la eclosión de los huevos tratados, pero los primeros estadios ninfales que emergieron de los huevos tratados murieron poco después de su fijación en la hoja.
- ✚ El estado de pupa de *E. mundus* fue altamente susceptible a la mayoría de los insecticidas evaluados. Todos los insecticidas, con excepción de spirotetramat, redujeron la emergencia de los adultos, mostrando el insecticida spirotetramat la menor toxicidad y azadiractina la mayor. El desarrollo normal del parasitoide

durante el período intermuda pupa-adulto fue afectado por todos los insecticidas. Efectos subletales teratológicos (malformaciones) fueron observados en las pupas tratadas con acetamiprid, azadiractina, cipermetrina y piriproxifén siendo más marcados en este último. La capacidad reproductiva en las hembras sobrevivientes a los tratamientos con azadiractina, cipermetrina y spirotetramat fue drásticamente afectada por azadiractina y cipermetrina. Spirotetramat no mostró ningún efecto perjudicial sobre esta, solo se observó una disminución en la longevidad de la progenie.

✚ El estado adulto de *E. mundus* fue altamente susceptible hacia los insecticidas acetamiprid, azadiractina, cipermetrina, piriproxifén y en menor medida para spirotetramat. La supervivencia de los mismos fue drásticamente afectada por cipermetrina y en menor medida por spirotetramat. La evaluación de los efectos subletales sobre la capacidad reproductiva de hembras sobrevivientes a los cinco insecticidas evaluados mostró que el parasitismo efectivo (número de ninfas que mostraron signos de parasitismo) fue el único parámetro que no se vio afectado por la acción de los insecticidas. El resto de los parámetros evaluados tuvo algún tipo de modificación dependiendo del insecticida evaluado. Se observó un sesgo hacia los machos en la descendencia de las hembras tratadas con cipermetrina. Los efectos subletales evaluados a nivel comportamental mostraron que cuatro (acetamiprid, azadiractina, cipermetrina y piriproxifén) de los cinco insecticidas considerados afectaron el desempeño normal tanto de los machos como de las hembras del parasitoide en los comportamientos asociados a los mecanismos de cópula, búsqueda del huésped, oviposición y parasitismo.

✚ Acetamiprid al igual que otros nicotinoideos es considerado un insecticida bioracional por la USEPA y ha sido incorporado como tal en los agroecosistemas de la región para reemplazar a los productos convencionales de amplio espectro como los organoclorados y organofosforados. Sin embargo, los resultados de los bioensayos muestran su alta toxicidad hacia *E. mundus*. Por lo tanto, este producto no sería recomendable para un programa de MIP, en donde se usen en conjunto con estrategias de control biológico con este parasitoide, aunque deberían realizarse estudios en condiciones de semicampo o campo a fin de evaluar la persistencia del mismo.

- ✚ De acuerdo a los resultados obtenidos, la inocuidad del insecticida azadiractina, ampliamente utilizado en producción orgánica, también debería ser corroborada a campo ya que el estado de pupa de *E. mundus* fue altamente susceptible a este insecticida.
- ✚ El insecticida spirotetramat muestra una baja toxicidad hacia *E. mundus*. No se observaron efectos nocivos (letales ni subletales) sobre el estado de pupa en condiciones de laboratorio. Tampoco se observaron efectos adversos en la supervivencia, ni en el desempeño normal de los adultos del parasitoide en los comportamientos asociados a los mecanismos de cópula, búsqueda del huésped, oviposición y parasitismo.
- ✚ Spirotetramat redujo los parámetros demográficos del parasitoide: tasa intrínseca de crecimiento poblacional  $r$ , tasa reproductiva neta  $R_0$  y tiempo generacional  $T$  cuando la exposición fue realizada en estado adulto, con implicancias en el crecimiento poblacional de la especie.
- ✚ La baja toxicidad de spirotetramat hacia *E. mundus* permitiría su uso en conjunto con el parasitoide en programas de MIP. Aunque estudios de toxicidad en condiciones de semicampo y campo serían recomendables a futuro a fin de completar el perfil toxicológico de este compuesto, sobre todo teniendo en cuenta los resultados del bioensayo a nivel demográfico realizado con adultos del parasitoide.
- ✚ Este proyecto de investigación de tesis doctoral proporciona nuevos protocolos para la evaluación del impacto de los insecticidas a nivel comportamental en microhimenópteros. Estos permiten diferenciar los comportamientos más relevantes del parasitoide, categorizarlos y establecer frecuencias en poblaciones control y luego analizar su modificación por la acción de insecticidas.
- ✚ Al mismo tiempo esta investigación proporciona nuevos conocimientos sobre los efectos secundarios de diversos insecticidas sobre atributos biológicos y ecológicos del parasitoide *E. mundus*. Además pone de relieve la importancia de evaluar los efectos subletales de los plaguicidas para conocer el impacto real de los mismos sobre organismos no blanco.

**APENDICE I**  
“Producción Científica y Referencias  
Bibliográficas “

## PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS - ENCUENTROS - JORNADAS Y SIMPOSIOS

- Primer Congreso Latinoamericano de Etología Aplicada realizado los días 6 y 7 de junio de **2008** en el Instituto de Investigaciones Clemente Estable (IIBCE) Montevideo Uruguay. Presentación de póster “Cambios en el comportamiento de oviposición de *Trissolcus basal* (Hymenoptera: Scelionidae) expuestos a Cipermetrina y Spinosad. **Francesena, N.**, Treuque, A., Aliardi, D., Scheneider, M.I.
- 61<sup>th</sup> International Symposium on Crop Protection. Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Belgium, **2009**. Poster Presentation, “Compatibility of Methoxyfenozide with *Eriopsis connexa*, *Chrysoperla externa*, *Trissolcus basal* and *Trichopoda giacomelli*”. Schneider, M.I, Pineda, S., **Francesena, N.**, Treuque, A.
- II Jornadas de Enfermedades y Plagas en Cultivos Bajo Cubierta, organizadas por el CIDEFI- Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales-Universidad Nacional de La Plata y la Agencia de Extensión Rural Gran Buenos Aires del INTA, realizadas los días 3,4 y 5 de junio de **2009**. Participación en carácter de asistente.
- III Reunión Argentina de Parasitoidólogos “Abordando distintas perspectivas” Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 26 al 28 de noviembre de **2009**, participación en carácter de asistente.
- IV Reunión Argentina de Parasitoidólogos “Aprovechando la diversidad de capacidades”, realizada los días 20 al 22 de octubre de **2010** en Concordia, Provincia de Entre Ríos, Argentina, participación en carácter de expositor: “Evaluación de efectos subletales de insecticidas sobre aspectos bioecológicos y comportamentales de *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoide de *Bemisia tabaci*”.
- III Jornadas de enfermedades y plagas en cultivos bajo cubierta, organizadas por el CIDEFI – Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales- Universidad Nacional de La Plata y la Agencia de Extensión Rural Gran Buenos Aires del INTA, realizadas los días 29,30 de junio y 1 de julio de **2011**. Participación en carácter de asistente.
- VIII Congreso Argentino de Entomología: “Los insectos y el Hombre, Diversidad de interacciones, Diversidad de miradas”, realizado los días 17 al 20 de abril de **2012** en la Ciudad

de San Carlos de Bariloche, Provincia de Río Negro, Argentina. Presentación de póster: “Toxicidad de cipermetrina en diferentes estadios de *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae) parasitoide de *Bemisia tabaci*”. **Francesena, N.**, Stadler, T., Schneider, M. I.

- 64<sup>th</sup> International Symposium on Crop Protection Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Belgium, May 22, **2012**. Poster Presentation: “Preliminary studies of effectiveness and selectivity of Movento<sup>®</sup> on *Bemisia tabaci* and its parasitoid *Eretmocerus mundus*”. **Francesena, N.**, Haramboure, M., Smaghe, G., Stadler T., Schneider, M.I.

- 13° Simpósio de Controle Biológico (SICONBIOL), Sociedade Entomológica do Brasil, 15 a 18 de setembro de **2013**, no Centro de Convenções em Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil. Apresentação de pôster “Sublethal effects of spirotetramat and cypermethrin residues on reproductive parameters and longevity of a *Bemisia tabaci* parasitoid *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae)”. **Francesena, N.**, Stadler, T., Schneider, M.I.

- V Reunión Argentina de Parasitoidólogos “Nuevos desafíos en el estudio de parasitoides” realizada los días 18 al 20 de septiembre de **2013** en San Miguel de Tucumán, Argentina, participación en carácter de expositor: “Toxicidad de diferentes insecticidas sobre pupas de *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoide de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)”. **Francesena, N.**, Stadler, T., Schneider. M.I.

- 66<sup>th</sup> International Symposium on Crop Protection. Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Belgium, May 20, **2014**. Poster Presentation. Behavioral changes in *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae) by insecticides action. **Francesena, N.**, Smaghe, G., Stadler, T., Schneider, M.I.

## TRABAJOS PUBLICADOS

- **Francesena, N.**, Haramboure M., Smaghe, G., Stadler T., Schneider M.I., **2012**. “Preliminary studies of effectiveness and selectivity of Movento<sup>®</sup> on *Bemisia tabaci* and its parasitoid *Eretmocerus mundus*. Communication in Agriculture and Applied Biological Science 77(4): (727-733).

- **Francesena, N.**, Stadler, T., Schneider, M.I., **2013**. Toxicidad de diferentes insecticidas sobre pupas de *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoide de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Acta Zoológica Lilloana 57-Suplemento, V Reunión Argentina de Parasitoidólogos-(40-42).



## Referencias Bibliográficas

- Abedi, Z., Saber, M., Gharekhani, G., Mehrvar, A., Kamita, S.G., **2014**. Lethal and sublethal effects of azadirachtin and cypermethrin on *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Economic Entomology* 107(2): 638-45.
- Ahmad, M., Arif, M.I., Ahmad, Z., Denholm, I., **2001**. Cotton whitefly (*Bemisia tabaci*) resistance to organophosphate and pyrethroid. *Pest Management Science* 58 (2): 203-208.
- Altieri, M. A, Nicholls, C. I., **2009**. Biodiversidad y Manejo de Plagas en Agroecosistemas. Icaria editorial, S.A.
- Alzogaray, R.A., **1996**. Tesis Doctoral Caracterización de la toxicidad de insecticidas piretroides en *Triatoma infestans* (Klug).
- Alzogaray, R., Montan, A., Zerba, E., **2000**. Repellency of deet to nymphs of *Triatoma infestans*. *Medical and Veterinary Entomology* 14: 6-10.
- Andrade Carvalho, G., Sekiguchi Godoy, M., Silva Parreira, D., Lasmar, O., Rodrigues Souza, J., Fonseca Moscardini, V., **2010**. Selectivity of growth regulators and neonicotinoids for adults of *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) *Revista Colombiana de Entomología* 36 (2):195-201.
- Ardeh, M.J., **2004**. Whitefly control potential of *Eretmocerus* parasitoids with different reproductive modes. Thesis Wageningen University ISBN: 90-8504-174-0.
- Ardeh, M.J., de Jong, P.W., van Lenteren, J.C., **2005**. Selection of *Bemisia* nymphal stages for oviposition or feeding, and host-handling times of arrhenotokous and thelytokous *Eretmocerus mundus* and arrhenotokous *E. Eremicus*. *BioControl* 50(3): 449-463.
- Armengaud, C., Lambin, M., Gauthier, M., **2002**. Effects of imidacloprid on the neural processes of memory in honey bees in Devillers, J; Pham-Delegue, M.H., Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals, New York: Taylor & Francis, p. 85.
- Bayran, A., Salerno, G., Onofri, A., Conti, E., **2010**. Sub-lethal effects of two pyrethroids on biological parameters and behavioral responses to host cues in the egg parasitoid *Telenomus busseolae*. *Biological Control* 53: 153-160.
- Bartlett, B.R. **1965**. The repellent effects of some pesticides to hymenopterous parasites and coccinellid predators. *Journal of Economic Entomology* 58(2): 294-296.
- Basit, M., Saeed, S., Saleem, M.A., Denholm, I., Shah, M., **2013**. Detection of Resistance, Cross-Resistance and Stability Resistance to New Chemistry Insecticides in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) *Journal of Economic Entomology* 106 (3): 1414-1422.

- Benamú M.A., Schneider, M.I., Sanchez, N.E., **2010**. Effects of the herbicide glyphosate on biological attributes of *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae), in laboratory. Chemosphere 78: 871-876.
- Benamú, M.A., Schneider, M.I., Gonzales, A., Sanchez, N.E., **2013**. Short and long term effects of three neurotoxic insecticides on the orb-web spider *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae): Implications for IPM programs. Ecotoxicology 22(7): 1155-1164.
- Blanco, C.A., Bernal, J.S., **2003**. Insecticidas y control biológico. In: Silva, G y R. Hepp (eds). Bases para el Manejo racional de insecticidas. Concepción, Chile. p. 71
- Botto E., Ceriani S., López S., Saini E., Cedola C., Segade G., Viscarret M., **1998**. Control biológico de plagas hortícolas en ambientes protegidos. La experiencia hasta el presente. Revista de Investigaciones Agropecuarias (RIA) 29(1): 83-98.
- Boursier, C.M, Bosco, D., Coulibaly, A., Negre, M., 2011. Are traditional neem extract preparations as efficient as a commercial formulation of azadirachtin A? Crop Protection 30(3): 318-322.
- Brück, A.E, Elbert A., Fischer, R., Krueguer S., Kühnhold J., Klueken A.M., Nauen R., Niebes J.F., Reckmann, U., Schnorbach, H.J., Steffens R., van Waetermeulen, X.,**2009**. Movento® an innovative ambimobile insecticide for sucking insect pest control in agriculture: Biological profile and field performance. Crop Protection 28: 838-844.
- Byrne, D.N., Bellows, T.S., **1991**. Whitefly biology. Annual Review of Entomology 36: 431- 457.
- Byrne, F.J., Gorman, K.J., Cahill, M., Denholm, I. and. Devonshire. A.L., **2000**. The role of b-type esterases in conferring insecticides resistance in the tobacco whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn). Pest Management Science 56: 867-874.
- Cáceres, S., Gnoatto I.L., Ishikawa, A., **1984**. Dinámica Poblacional de insectos y Ácaros en Tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) para primicia producido bajo cobertura plástica y a campo. Soc. Arg. Oler. Resúmenes VII Reunión Nacional y I Internacional. San Pedro (Bs. As.). Set. 1984. p.100.
- Cáceres, S., Ishikawa, A., Ramírez, M.H., Lenscak, M. P., **1995**. Estimación de niveles de presencia de polilla del tomate *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick). XIII Congreso Argentino de Horticultura. Las Termas de Río Hondo, Sgo. del Estero; 11-14 Sep., 1995. Resúmenes p. 95.
- Cáceres, S., **2004**. Moscas blancas del complejo *Bemisia tabaci* en cultivos hortícolas de Corrientes. Estrategias de manejo. En: Mosca blanca. Jornadas de actualización. 5 de Julio de 2004 INTA. p.15
- Cáceres, S., **2005**. Eficiente control biológico de la mosca blanca en Corrientes. Boletín INTA Informa N° 366.

- Cappello, V.Y., Fortunato, N., **2008**. Dirección Provincial de Recursos Naturales, Programa de Gestión Ambiental en Agroecosistemas. Organismo Provincial para el Desarrollo Sustentable (OPDS), Gobernación Provincia de Bs. As.
- CASAFE, **2013/2015**. Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes: Guía de productos fitosanitarios. CASAFE 16 (ed). Buenos Aires. Argentina.
- Castro Jiménez. J., **2002**. Tesis Doctoral Determinación, persistencia y distribución de insecticidas de uso agrícola en el medio ambiente.
- Castle, S.J., Palumbo, J.C., Prabhaker, N., Horowitz, A.R., Denholm, I., **2010**. Ecological determinants of *Bemisia tabaci* resistance to insecticides, Chapter. 16, pp. 423-465 INP. Stansly and S. E. Naranjo, [eds.], *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*, Springer Science and Business Media B. V., Dordrecht, The Netherlands.
- CFHB (Censo florihortícola bonaerense) **2005**. Informe de avance del Censo Florihortícola de la Provincia de Buenos Aires. Ministerio de Asuntos Agrarios, Secretaria de Agricultura y Ganadería. [www.maa.gba.gov.ar](http://www.maa.gba.gov.ar) (última fecha de acceso 23/10/2013).
- Chapman, R.F., **1998**. *The Insects: Structure and Function* 4<sup>th</sup> edition. Cambridge University Press.
- Chacón Castro, Y., López, S.N., **2010**. Biología de *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoide del complejo *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae), en condiciones de laboratorio. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 69: 1-2.
- Chi, H., **1997**. Computer program for the Probit Analysis. National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan (<http://www.znu.ac.ir/agriculture/pages/plantprotection/software/index.htm>, última fecha de acceso 24/01/2014).
- Chi, H., **2008**. TWSEX-MSChart: computer program for age-stage, two-sex life table analysis (<http://140.120.197.183/Ecology>, última fecha de acceso 24/01/2014).
- Cieza, R.I., **2004**. Asesoramiento profesional y manejo de nuevas tecnologías en unidades de producción hortícolas del Gran La Plata. *Scientia Agraria* 5: 79-85.
- Cohen, S., **1990**. Epidemiology of whitefly-transmitted viruses. En: Gerling, D. (Ed.). *Whiteflies: their bionomics, pest status and management*. Intercept Ltd. Andover, UK, pp 211-225.
- Colamarino I., Curcio N., Ocampo F., del Torran C., **2006**. La producción hortícola en la Argentina, SAGPyA.
- Coudriet, D.L., Prabhaker, N., Meyerdir, K, D.E., **1985**. Sweet - potato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) - effects of neem - seed extract on oviposition and immature stages. *Environmental Entomology* 14: 776- 779.

- Croft, B.A., **1990**. Artropod Biological Control Agents and Pesticides. B. A. Croft (Ed.), John Wiley, New York.
- Cruz Estrada, A., Gamboa Angulo, M., Borges Argáez, R., Ruiz Sánchez, E., **2013**. Insecticidal effects of plant extract on immature whitefly *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyroideae) ElectronicJournal of Biotechnology, 16, no. 1 (<http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue1-fulltext>, última fecha de acceso 16/11/2013).
- Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M., Pham Del`egue, M.H., **2004**. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. Ecotoxicology and Environmental Safety 57: 410–19.
- Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., **2005**. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 48: 242–50.
- De Barro, P.J., Shu-Sheng, L., Boykin, M.L., Dinsdale, A.B., **2011**. *Bemisia tabaci*: A Statement of Species Status Annual Reviews of Entomology 56: 1-19.
- Delfino, M.A., **1994**. Descripción de dos nuevas especies de Uroleucon (Homoptera: Aphididae). Revista Chilena de Entomología 21: 31-40.
- Delfino, M.A., Monelos, H.L., Peri, P.L., Buffa, L.M., **2007**. Áfidos (Hemiptera, Aphididae) de interés económico en la provincia de Santa Cruz. RIA 36: 147-154.
- Delpuech, J.M, Gareau, E., Terrier, O., Fouillet, P., **1998**. Sublethal effects of the insecticide chlorpyrifos on the sex pheromonal communication of *Trichogramma brassicae*. Chemosphere 36(8): 1175-1185.
- Delpuech, J.M, Legallet, B., Terrier, O., Fouillet, P., **1999a**. Modifications of the sex pheromonal communication of *Trichogramma brassicae* by a sublethal dose of deltamethrin. Chemosphere 38 (4): 729-739.
- Delpuech, J.M., Gareau, E., Froment, B., Allemand, R., Bouletreau, M., **1999b**, Effects of different insecticide doses on sex pheromone communication in *Trichogramma brassicae* (Hym.: Trichogrammatidae). Annales de la Société Entomologique de France 35(supplement): 514-516.
- Delpuech, J.M., Dupont, C., Allemand, R., **2012**, Effects of deltamethrin on the specific discrimination of sex pheromones in two sympatric *Trichogramma* species. Ecotoxicology and Environmental Safety 84: 32-38.
- Desneux, N., Pham Delègue, M.H., Kaiser, L., **2004a**. Effects of sub-lethal and lethal doses of lambda-cyhalothrin on oviposition experience and host-searching behaviour of a parasitic wasp, *Aphidius ervi*. Pest Management Science 60(4): 381-9.

- Desneux N., Wajnberg E., Fauvergue X., Privet S., Kaiser, L., **2004b**. Oviposition behavior and patch-time allocation in two aphid parasitoids exposed to deltamethrin residues. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 112: 227-235.
- Desneux, N., Ramírez Romero, R., Kaiser, L., **2006a**. Multistep bioassay to predict recolonization potential of emerging parasitoids after a pesticide treatment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25 (10): 2675-2682.
- Desneux, N., Denoyelle, R., Kaiser, L., **2006b**. A multi-step bioassay to assess the effect of the deltamethrin on the parasitic wasp *Aphidius ervi*. *Chemosphere* 65: 1697-1706.
- Desneux N., Decourtye A., Delpuech J.M., **2007**. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology* 52: 81-106.
- Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys, K.A.G., Burgio, G., Arpaia, S., Narváez-Vasquez, C.A., Gonzalez-Cabrera, J., Catalán-Ruescas, D., Tabone, E., Frandon, J., Pizzol, J., Poncet, C., Cabello, T., 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: 197-215.
- Devine, G.J., Furlong M.J., **2007**. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. *Agriculture and Humman Values* 24: 281-306.
- Elbert A., Nauen R., Leicht, W., **1998**. Imidacloprid, a novel chloronicotinyl insecticide: biological activity and agricultural importance. En: Ishaaya I., Degheele D. (Eds.). *Insecticides with novel modes of action: mechanism and application*. New York: Springer. pp 50–73.
- Environmental Protection Agency (EPA). [www.epa.org](http://www.epa.org) (última fecha de acceso 04/04/2014).
- Estay, P., 2000. Polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick). (<http://alerce.inia.cl/docs/Informativos/-informativo09.pdf> , última fecha de acceso 10/12/2013).
- Fernandez, M.M., Medina, P., Del Estal, P., Viñuela, E., **2010**. Testing side- effects on the most protected life stage of *Eretmocerus mundus* (Mercet) (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoid of the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera, Aleyrodidae) in the laboratory. *Pesticides and Beneficial Organisms IOBC/wprs Bulletin* Vol 55: 101-107.
- Fogel, M., Rimoldi, F., Pineda, S., Schneider, M.I., Ronco, A., **2009**. Side Effects of teflubenzuron and chlorfenapyr in *Eriopis connexa* eggs (Coleoptera: Coccinellidae). *Communication of Applied Biological Science* 74(2): 419-424.
- Fogel, M., Schneider, M.I., Desneux, N., Ronco, A., **2013**. Impact of the neonicotinoid acetamiprid on immature stages of the predator *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ecotoxicology* 22 (6):1063-71.

- Food and Agriculture Organization. **1975**. Rep. FAO Panel of experts on integrated pest control, 5th, Oct. 15–25, 1974. Rome, Italy: FAO-UN, Meeting Rep. 1975/M/2. p.41.
- Food and Agriculture Organization (FAO). **2001**. Crop Protection (<http://www.fao.org/ag/guides/subject/h.htm>, última fecha de acceso 15/02/2014).
- Forbes, V.E, Calow, P., Grimm, V., **2010**. Integrating population modelling into ecological risk assessment. *Integrated Environmental Assessment Management* 6: 191–3.
- Francesena, N., Treuque, A., Aliardi, D., Schneider, M. **2008**. Cambios en el comportamiento de oviposición de *Trissolcus basalís* (Hymenoptera: Scelionidae) expuestos a cipermetrina y spinosad. En Libro de Resúmenes I Congreso Latinoamericano de Etología Aplicada.
- Francesena, N., Haramboure, M., Smagghe, G., Stadler T., Schneider, M.I., **2012**. Preliminary studies of effectiveness and selectivity of Movento<sup>®</sup> on *Bemisia tabaci* and its parasitoid *Eretmocerus mundus*. *Communication in Agriculture and Applied Biological* 77(4): 727-733.
- Francesena, N., Stadler, T., Schneider M.I., **2013**. Toxicidad de diferentes insecticidas sobre pupas de *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoide de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Acta Zoológica Lilloana* 57 – Suplemento, V Reunión Argentina de Parasitoidólogos- (40-42).
- Frewin, A.J., Schaafsma, A.W, Hallet, R.H., **2012**. Susceptibility of *Aphelinus certus* to foliar-applied insecticides currently or potentially registered for soybean aphid control. *Pest Management Science* 68 (2): 202-208.
- Gabarra, R., **2002**. Control Integrado de moscas blancas y pulgones en cultivos de invernadero. *Phytoma España* 135: 84-86.
- Garcerá, C., Ouyang, Y., Scott, S.J, Moltó, E., Grafton Cardwell, E.E., **2013**. Effects of Spirotetramat on *Aonidiella aurantii* (Homoptera: Diaspididae) and Its Parasitoid, *Aphytus milinus* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Journal of Economic Entomology* 106 (5): 2126-2134.
- García, M., **2011**. El Cinturón Hortícola Platense: ahogándonos en un mar de plásticos. Un ensayo acerca de la tecnología, el ambiente y la política. *Theomai* (23): 35-75.
- Gerling, D., **1990**. Natural enemies of whiteflies: predators and parasitoids. In *Whiteflies: their Bionomics. Pest Status and Management*. Ed. D. Gerling, Intercept Ltd, Andover UK. pp.147-185.
- Gerling, D., Tremblay, E., Orion, T., **1991**. Initial stages of the vital capsule formation in the *Eretmocerus–Bemisia tabaci* association. *Redia* 74: 411–415.
- Gerling, D., Quicke, D.L.J., Orion, T., **1998**. Oviposition mechanism in the whitefly parasitoids *Encarsia transvena* and *Eretmocerus mundus*. *Biocontrol* 43: 117–123.

- Gerling, D., Friend, R., **2000**. Biological studies whit *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) in Israel. OILB/SROP: Bulletin 23: 117-123.
- Gerling, D., Blackburn, M.B., **2013**. Immature development of *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae). Arthropod Structure and Development 42: 309-314.
- Gill, R.J., **1990**. The morphology of whiteflies, pp. 47-90. In: Gerling, D. (Ed.). Whiteflies: their Bionomics, Pest Status and Management. Intercept, Ltd. Andover, Hants, U. K.
- Girbal Blacha, N.M., **2001**. La historiografía agraria argentina: enfoques microhistóricos regionales para la microhistoria rural del siglo XX (1980-1999). En: Estudios Interdisciplinarios de América Latina y el Caribe 2. Vol. 12. Instituto de Historia y Cultura de América Latina. Universidad de Tel Aviv. Tel Aviv, Israel.
- Gonsebatt, G.G., Viscarret, M.M., Lietti M.M., **2012**. Whitefly species (Hemiptera: Aleyrodidae) on wild and cultivated plants in the horticultural region of Rosario, Santa Fe, Argentina. Revista de la Sociedad Entomologica Argentina 71 (1-2): 125-136.
- Gonzales Zamora, J.E., Gallardo, J.M., García, M.M., **1997**. Toxicity of different pesticides on pupae of *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) parasitizing *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). Bulletin OILB 20(4): 114-120.
- Gratwick, M., **1957**. The contamination of insects of different species exposed to dust deposits. Bulletin of Entomological Research 48: 741-753.
- Greco, N., Sánchez, N., Pereyra, P., **2002**. Principios de manejo de plagas. En Agroecología. El camino hacia una agricultura sustentable. Cap. 13. S.J. Sarandón (Editor). Ediciones Científicas Americanas.
- Haynes., **1998**. Sublethal Effects of Neurotoxic Insecticides on Insect Behavior. Annual Review of Entomology 33: 149-168.
- Haramboure, M., Mirande, L., Smagghe, G., Pineda, S., Schneider, M.I., **2010**. Compatibility of a *Melia azaderach* extract with *Eriopsis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). Communication in Agriculture and Applied Biological Sciences 75(3): 373-378.
- Haramboure, M., Francesena, N., Reboredo, G.R., Smegghe, G., Alzogaray, R.A., Schneider, M.I., **2013**. Toxicity of cypermethrin on the Neotropical lacewing *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). Behavior disruption and recovery capacity Communication in Agriculture and Applied Biological Sciences 78(2): 339-344.
- Hassan, S.A., Bigler, F., Blaisinger, H., **1985**. Standard methods to test the side effects of pesticides on natural enemies of insects and mites. EPPO Bulletin 15: 214-255.
- Hassan S.A., **1994**. Activities of the IOBC/WPRS working group Pesticides and beneficial organisms. IOBC/ WPRS Bulletin 17(10): 1-5.

- Hoddle, M. S., Van Driesche, R.G., Lyon, S.M., Sanderson, J. P., **2001**. Compatibility of Insect Growth Regulators with *Eretmocerus eremicus* (Hymenoptera: Aphelinidae) for Whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) Control on Poinsettias. *Biological Control* 20: 122–131.
- Hoddle, M., **2003**. The biology and Management of Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii* Bellows and Perring (Homoptera: Aleyrodidae) on Greenhouse Grown Ornamental. <http://biocontrol.ucr.edu/bemisia.html>. (última fecha de acceso 14/08/2013)
- Horn, D.J., **1988**. Ecological approach to Pest management. Elsevier (Ed.), London.
- Hsieh, C.Y., Allen, W.W., **1986**. Effects of Insecticides on Emergence, Survival, Longevity, and Fecundity of the Parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Aphididae) from Mummified *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 79: 1599-1602.
- INDEC. [www.indec.mecon.gov.ar](http://www.indec.mecon.gov.ar). (ultima fecha de acceso 10/12/13).
- Iannacone, J.O., Reyes, M.U., **2001**. Efecto de la Retenonina y Neem sobre *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) y *Liriomyza huidobrensis* Blanchard (Diptera: Agromyzyidae) plagas del tomate en Perú. *Agronomía Tropical* 51(1): 65-79.
- Ishaaya I., Barazani, A., Kontsedalov, S., Horowitz, A.R., **2007**. Insecticides with novel modes of action: Mechanism, selectivity and cross-resistance. *Entomological Research* 37: 148–152.
- Jones, W.A, Ciomperlik, M.A., Wolfenbarger D.A., **1998**. Lethal and Sublethal Effects of Insecticides on Two Parasitoids Attacking *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). *Biological Control* 11(1): 70-76.
- Kogan, M., **1998**. Integrated Pest Management: Historical perspectives and contemporary developments. *Annual Review of Entomology* 43: 243-270.
- Kogan, M., Jepson, P., **2007**. Perspectives in ecological theory and integrated pest Management. Kogan, M. and P. Jepson (Eds). Cambridge University Press, USA. p 588.
- Kumar, P., Poehling, H.M., Borgemeister, C., **2005**. Effects of different application methods of azadirachtin against sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants. *Journal of Applied Entomology* 129: 489- 497.
- Kumar, B.V., Kuttalam, S and Chandrasekaran, S., **2009**. Efficacy of a new insecticide spirotetramat against cotton whitefly. *Pesticide Research Journal* 21: 45-48.
- Ladd, T. L., M. Jacobson and Buriff, C.R., **1978**. Japanese beetles: extracts from *neem tree* seeds as feeding deterrents. *Journal of Economic Entomology* 71: 810-813.
- Landis, D.A, Wratten, S.D., Gurr, G.M., **2000**. Habitat Management to Conserve Natural Enemies of Arthropod Pest. *Agriculture Annual Review of Entomology* 45: 175–201.



- Liang, P., Tian, Y.A., Biondi, A., Desneux, N., Gao, X.W., **2012**. Short-term and transgenerational effects of the neonicotinoid nitenpyran on susceptibility to insecticides in whitefly species. *Ecotoxicology* 21: 1889–1898.
- Liu, T.X., Stansly, P.A., **1995**. Deposition and bioassay of insecticides applied by leaf dip and spray tower against *Bemisia argentifolli* nymphs (Homoptera, Aleyrodidae). *Pesticide Science* 44: 317- 322.
- Liu, T.X., Stansly, P.A., **1996**. Pupal Orientation and Emergence of Some Aphelinid Parasitoids (Hymenoptera: Aphelinidae) of *Bemisia argentifolli* (Homoptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America* 89(3): 385-390.
- Liu, T.X., Stansly, P.A., **1997**. Effects of Pyriproxyfen on Three Species of Encarsia (Hymenoptera: Aphelinidae), Endoparasitoids of *Bemisia argentifolli* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* 90 (2): 404-411.
- Liu, T.X., **2004**. Toxicity and efficacy of spiromesifen, a tetrionic acid insecticide, against sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) on melons and collards. *Crop Protection* 23(6): 505-513.
- Liu, T.X., Zhang, Y.M., Peng, L.N., Rojas, P., Trumble, J.T., **2012**. Risk assessment of selected insecticides on *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Journal of Economic Entomology* 105(2): 490-6.
- Longley, M., Jepson, P.C., **1996**. The influence of insecticide residues on primary parasitoid and hyperparasitoid foraging behaviour in the laboratory. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 81: 259–269.
- López, S.N., Evans G.A., **2008a**. Nuevos registros de especies del género *Eretmocerus* (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoides de *Trialeurodes vaporariorum* y el complejo *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) en Argentina *Revista de la Sociedad Entomologica Argentina* 67 (1-2): 185-187.
- López, S.M., Andorno, A.V., **2008b**. Evaluation of the local population of *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae) for biological control of *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) in greenhouse peppers in Argentina. *Biological Control* 50(3): 317-323.
- Luna Cruz, J., Lomeli Flores, R., Rodríguez Leyva, E., Ortega Arenas, L., Huerta de La Peña, H., **2011**. Toxicidad de cuatro insecticidas sobre *Tamarixia triozae* (Burks) (Hymenoptera: Eulophidae) y su hospedero *Bactericera Cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae). *Acta Zoológica Mexicana* 27(3): 509-526.
- Luna, M.G., Sánchez, N.E, Pereyra, P.C., Nieves, E., Savino, V., Luft E., Virla, E., Speranza, S., **2012**. Biological control of *Tuta absoluta* in Argentina and Italy: evaluation of indigenous insects as natural enemies. *EPPO Bulletin* 42(2): 260–267.

- Mansour, R., Suma, P., Mazzeo, G., Lebdi, K.G, Russo, A., **2011**. Evaluating side effects of newer insecticides on the vine mealybug parasitoid *Anagyrus sp., near pseudococci*, with implications for integrate pest management in vineyards. *Phytoparasitica* 39(4): 369-376.
- Marcic, D., Petronijevic, S., Drobnjakovic, T., Prijovic, M., Peric, P., Milenkovic, S., **2011**. The effects of spirotetramat on life history traits and population growth of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology* 56: 113-122.
- Martin, J.H., Mifsud, D., Rapisarda, C., **2000**. The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of Europe and Mediterranean basin. *Bulletin of Entomological Research* 90: 407-448.
- Mathews, G.A., **1984**. What is a pest? Pest management. Longman Group Limited. Burnt Mill, Harlow, UK. pp.1-3.
- Meisner, J., Wysoki, M., Ascher, K.R.S., **1976**. The residual effect of some products from neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds upon larvae of *Boarmia (Ascotis) selenaria* Schiff in laboratory trials. *Phytoparasitica* 4: 185-192.
- Mirande, L., Haramboure, M., Smagghe, G., Pineda, S., Schneider, M. I., **2010**. Side effects of glyphosate on the life parameters of *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) in Argentina. *Communication in Agriculture and Applied Biological Sciences* 75(3): 367-372.
- Mirande L., Desneux, N., Haramboure, M., Schneider, M.I., **2015**. Intraguild predation between an exotic and a native coccinellid in Argentina: the role of prey density. *Journal of Pest Science* 88(1): 155-162.
- Molina, E.Y., Higuera, Y.B., Zambrano, B., **1997**. Efectividad del aceite y del extracto acuoso de la hoja de nim sobre la mosca blanca del melón *Bemisia tabaci* (Gennadius). En: Resúmenes. XV Congreso Venezolano de Entomología. Trujillo, Venezuela. p. 78.
- Moens, J., Tirry, L., de Clerq, P., **2012**. Susceptibility of cocooned pupae and adults of the parasitoid *Microplitis mediator* to select insecticides. *Phytoparasitica* 40(1): 5-9.
- Mommaerts, V., Reynders, S., Boulet, J., Besard, L., Sterk, G., Smagghe, G., **2010**. Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. *Ecotoxicology* 19: 207-210.
- Morales, F.J., Martínez, A.K., Velasco, A. C., **2003**. Nuevos brotes de begomovirus en Colombia. *Fitopatología Colombiana* 26(1): 75-79.
- Mordue, A.J., Blackwell, A., **1993**. *Azadirachtin*: an update. *Journal of Insect Physiology* 39: 903-924.
- Mordue (Luntz), A.J., Simmonds, M.S.J., Ley, S.V., Blaney, W.M., Mordue, W., Nasiruddin, M., Nisbet, A.J., **1998**. Actions of azadirachtin, a plant allelochemical, against insects. *Pesticide Science* 54: 277-284.

- Moura, A.P., Carvalho, G.A., Pereira, A.E., Rocha, L.C.D., **2006**. Selectivity evaluation of insecticides used to control tomato pests to *Trichogramma pretiosum*. *BioControl* 51: 769-778.
- Nauen, R., Konanz, S., **2005**. Spiromesifen as a new chemical option for resistance management in whiteflies and spider mites. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 58: 485-502.
- Nauen R., Reckmann, U., Thomzik, J., Thielert, W., **2008**. Biological profile of spirotetramat (Movento<sup>®</sup>) – a new twoway systemic (ambimobile) insecticide against sucking pest species. *Bayer Crop Science Journal* 61: 245-278.
- Nechols, J.R., Tauber, M. J., **1977**. Age-specific interaction between the greenhouse whitefly and *Encarsia formosa*: Influence of host on the parasite's oviposition and development. *Environmental Entomology* 6:143-149.
- Nieto Nafría, J.M., Delfino, M.A., Mier Durante, M.P., **1994**. La afidofauna de la Argentina: su conocimiento en 1992. Universidad de León, León, España. p. 235.
- Nieves Aldrey, J.L., Fontal Cazalla, F.M., **1999**. Filogenia y Evolución del orden Hymenoptera, pp.459-474 en Melic, A., J.J. de Haro, M. Méndez e I. Ribera (eds). Evolución y filogenia de Arthropoda. Volumen monográfico SEA, Nro 26.
- Oliveira, M.R.V., Henneberryb, T.J., Andersonc, P., **2001**. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci* *Crop Protection* 20: 709-723.
- Otoïdobia, L.C., Vincent, C., Stewart, K.R., **2003**. Field Efficacy and Baseline Toxicities of Pyriproxifen, Acetamiprid, and Diafenthiuron against *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) in Burkina Faso (West Africa). *Journal of Environmental Science and Health Part B Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes* 38(6): 757-769.
- Otoni, E.B., **2000**. EthoLog 2.2: A tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments and Computers* 32 (3), 446-449.
- Ortega Arenas, L.D., Lagunes Tejeda, A., Rodríguez Maciel, C., Rodríguez Hernández, C. Alatorre Rosas, R., Bárcenas Ortega, N.M. **1998**. Susceptibilidad a insecticidas en adultos de mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Homoptera: Aleyrodidae) de Tepoztlán, Morelos, México. *Agrociencia* 32: 249-254.
- Palumbo, J.C., Horowitz, A.R., Prabhaker, N., **2001**. Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection* 20(9): 739-765.
- Palacios, S.M., Carpinella, M.C., Mangeaud, A., Valladares, G., Defagó, M.T., Ferrayoli, C.G., **2008**. Effect of *Melia azadirach* fruit extract on *Trialeurodes vaporariorum* in organic crops under greenhouse. *Biopesticides International* 4(2): 121-127.

- Pérez, M.E., Haramboure, M., Mirande, L., Romanelli, G., Schneider, M. I., Autino, J. C., **2013**. Biological activity of three alkyl cinnamates on young larvae of *Tuta absoluta*. *Communication in Agriculture and Applied Biological Sciences* 78(2): 299-304.
- Polack, L.A., Saini, E., García Sampedro, C., **2002**. Guía de Monitoreo y Reconocimiento de Plagas y Enemigos Naturales de Tomate y Pimiento. *Boletín de Divulgación N° 13*. EEA INTA San Pedro. 50 pp.
- Polack, L.A. **2005**. Manejo Integrado de Moscas Blancas. *Boletín Hortícola Año°10, N° 31*, 23-30.
- Polack, L.A. **2008**. Interacciones tritróficas involucradas en el control de plagas de cultivos hortícolas. Tesis Doctoral, FCNyM, UNLP. p.172.
- Polack, L. A., Silvestre, C., Baron, C., **2011**. Irregularidad en la madurez del tomate provocada por *Bemisia tabaci* en el Cinturón Hortícola Platense. *Boletín Hortícola Año 16*. 48: 34-35.
- Prabhaker, N., Coudriet, D. L, Meyerdirk, D. E., **1985**. Insecticide resistance in the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* 78(4): 748-752.
- Prabhaker, N., Morse, J.G., Castle, S.J., Naranjo, S.E., Henneberry, T.J, Toscano, N.C., **2007**. Toxicity of seven foliar insecticides to four insect parasitoids attacking citrus and cotton pests. *Journal of Economic Entomology* 100(4): 1053-61.
- Pradhan, S and Jotwani, M.G., **1971**. Repeated confirmation of our discovery of antifeed ant property of neem kernel. *Entomological News* 1: 75-77.
- Price, J.F., Schuster, D.J., **1991**. Effects of natural and synthetic insecticides on sweet potato whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) and its hymenopterous parasitoids. *Florida Entomologist* 74: 60- 68.
- Raguraman, S., Singh, R., **1999**. Biological effects of Neem (*Azadirachta indica*) seed oil on an egg parasitoid, *Trichogramma chilonis*. *Journal of Economic Entomology* 92(6):1274-1280.
- Reingold, S. C. and Camhi, J. M., **1978**. Abdominal grooming in the cockroach: development of an adult behavior. *Journal of Insects Physiology* 24: 101-110.
- Riba, M., Martí, J., **1996**. Actividad biológica de la azadiractina sobre *Nezara viridula* (L.). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 22: 169-177.
- Rimoldi F., Schneider M.I., Ronco A.E., **2008**. Susceptibility of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) to conventional and biorational insecticides. *Environmental Entomology* 37: 1252-1257.

- Rimoldi, F., Fogel, M., Schneider, M.I., Ronco, A., **2012a**. Lethal and Sublethal effects of cypermethrin and methoxyfenozide on the larvae of *Rachiplusia nu* (Guenee) (Lepidoptera: Noctuidae). *Invertebrate Development and Reproduction* 56(3): 202-208.
- Rimoldi, F., Schneider, M., Ronco, A. **2012b**. Short and Long-term Effects of Endosulfan, Cypermethrin, Spinosad, and Methoxyfenozide on Adults of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae), *Journal of Economic Entomology* 105(6): 1982-1987.
- Roditakis, E., Roditakis, N.E., Tsagkarakou, A., **2005**. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. *Pest Management Science* 61: 577-582.
- Roditakis, E., Tsagkarakou, A., Vontas, J., **2006**. Identification of mutations in the para-sodium channel of *Bemisia tabaci* from Crete associated with resistance to pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85: 161-166.
- Root, R.B., **1973**. Organization of plant arthropod associations in simple and diverse habitats: the fauna of collards (*Brassica oleracea*). *Ecological Monographs* 43: 95-124.
- Romanelli, G.P., Virla, E.G., Duchowicz, P.R., Gaddi, A.L., Ruiz, D.M, Bennardi, D.O., del Valle Ortiz E., Autino, J.C., **2010**. Sustainable synthesis of flavonoid derivatives, QSAR, study and insecticidal activity against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58: 6290- 6295.
- Rose, M., Zolnerowich, G., Hunter, M., **1996**. Systematics, *Eretmocerus* and Biological Control. In D. Gerling, (ed.), *Bemisia 1995: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management*. Intercept, LTD. pp. 477-497.
- Rose, M., Zolnerowich, G., **1997**. The genus *Eretmocerus* (Hymenoptera: Aphelinidae): Parasites of Whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). Technical brochure produced for California Department of Food and Agriculture.
- Rosen, D., De Bach, P., **1979**. Species of *Aphytis* of the World (Hymenoptera: Aphelinidae). Israel Universities Press, Jerusalem, and Junk, The Hague, The Netherlands.
- Russell, L.M., **1957**. Synonyms of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: 104 Aleyrodidae). *Bulletin Brooklyn Entomological Society* 52: 122-123.
- Saber, M., Hejazl, M.J., Hassan, S.A., **2004**. Effects of Azadirachtin/Neemazal on different stages and adult life table parameters of *Trichogramma cacoeciae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of Economic Entomology* 97(3): 905-910.
- Saber, M., Hejazl, M.J, Kamal, K., Moharramipour, S., **2005**. Lethal and sublethal effects of fenitrothion and deltamethrin residues and the egg parasitoid *Trissolcus grandis* (Hymenoptera: Scelionidae). *Journal of Economic Entomology* 98(1): 35-40.

- Saber, M., **2011**. Acute and population level toxicity of imidacloprid and fenpyroximate on an important egg parasitoid, *Trichogramma cacoeciae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Ecotoxicology* 20(6): 1476-1484.
- Sarandón, S.J., **2002**. Agroecología. El camino hacia una agricultura sustentable. Manejo de malezas en una agricultura sustentable. Sarandón, S.J. (Ed.). Ediciones Científicas Americanas. La Plata-Buenos Aires, República Argentina. p. 557.
- Salas, J., Mendoza, O., **2001**. Evaluación de un extracto de Nim en el control de *Bemisia tabaci* y *Liriomyza sativae* en tomate. *Agronomía tropical* 51(2): 221-234.
- Salerno, G., Colazza, S., Conti, E., **2002**. Sublethal effects of deltamethrin on walking behaviour and response to host kairomone of the egg parasitoid *Trissolcus basalidis*. *Pest Management Science* 58(7): 663-668.
- Saxena, R.C., Liquids, N.J., Justo, H.D., **1981**. Neem seed oil, a potential antifeedant for the control of the rice brown plant hopper, *Nilaparvata lugens*, pp. 171-188. In H. Schmutterer, K. R. S. Ascher and H. Rembold [eds.], *Proceedings, First International Neem Conference, 16-18 June, 1980, Rottach-Egern, Federal Republic of Germany*. German Agency for Technical Cooperation, Eschborn.
- Schmutterer, H. **1990**. Properties and potential of natural pesticides from the Neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology* 35: 271-297.
- Schneider, M.I., **2002**. Optimización del empleo en lucha biológica *Hyposoter didymator* (Thunberg) y evaluación ecotoxicológica de modernos plaguicidas en laboratorio. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
- Schneider M.I., Smagghe G., Viñuela E., **2003a**. Susceptibility of *Hyposoter didymator* (Hymenoptera: Ichneumonidae) adults to several IGRs pesticides and spinosad by different exposure methods. *IOBC/WPRS Bulletin* 26(5): 111-122.
- Schneider M.I., Smagghe G., Gobbi A., Viñuela E. **2003b**. Toxicity and pharmacokinetics of seven novel insecticides on pupae of *Hyposoter didymator* (Hymenoptera: Ichneumonidae), a parasitoid of early larval instars of lepidopteran pests. *Journal of Economic Entomology* 96(4): 1054-1065.
- Schneider M.I., Smagghe G., Viñuela, E. **2004**. Comparative effects of several insect growth regulators and spinosad on the different developmental stages of the endoparasitoid *Hyposoter didymator* (Thunberg) *IOBC/WPRS Bulletin* 27(6): 13-20.
- Schneider M.I., Smagghe G., Pineda S., Viñuela, E., **2008**. The ecological impact of four IGR insecticides in adults of *Hyposoter didymator* (Hym, Ichneumonidae): pharmacokinetics approach. *Ecotoxicology* 17: 181-188.

- Schneider M.I., Sanchez, N., Pineda S., Chi H., Ronco A. **2009**. Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). Ecological Approach. Chemosphere 76: 1451-1455.
- Schuster, D.J., Mueller T.F., Kring J.B and Price, J.F., **1990**. Relationship of the sweetpotato whitefly to a new tomato fruit disorder. Florida Hortscience 25: 1618-20.
- Schuster, D.J., Mann, R.S., Toapanta, M., Cordero, R., Thompson, S., Cyman, S., Shurtleff, A., Andmorrisii, R.F., **2010**. Monitoring neonicotinoid resistance in biotype B of *Bemisia tabaci* in Florida. Pest Management Science 66: 186-195.
- Shchukin, A., Wool, D., **1994**. Pyrethroids resistance and esterase activity in selected laboratory populations of sweetpotato whiteflies, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). European Journal Entomology 91: 285-295.
- Simmonds, M.S.J., Blaney W.M., **1996**. Azadirachtin: advances in understanding its activity as an antifeedant. Proceedings of the 9th International Symposium on Insect-Plant Relationships Volume 53: 23-26.
- Smith, H., Giurcanu, M.C., **2013**. Residual effects of new insecticides on eggs and nymph densities of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Florida Entomologist 96(2): 504-511.
- Sohrabi, F., Shishehbor, P., Saber, M., Mosaddegh, M.S., **2012**. Lethal and sublethal effects of imidacloprid and buprofezin on the whitefly parasitoid *Encarsia inaron* (Hymenoptera: Aphelinidae). Crop Protection 32: 83-89.
- Sohrabi, F., Shishehbor, P., Saber, M., Mosaddegh, M.S., **2013**. Lethal and sublethal effects of imidacloprid and buprofezin on the sweetpotato whitefly parasitoid *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae). Crop Protection 45: 98 -103.
- Spiro, T.G., Stigliani, W.M., **2004**. Química medioambiental. Segunda edición. Pearson Educación S.A. (editorial). Madrid, España. p.619.
- Stanly, P.A., Calvo, J., Urbaneja, A., **2005**. Release rates for control of *Bemisia tabaci* (Homoptera. Aleyrodidae) biotype "Q" with *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae) in greenhouse tomato and pepper. Biological Control 35: 124-133.
- Stark, J.D., Banks, J.E. **2003**. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. Annual Review of Entomology 48: 505-19.
- Stark, J.D., Banks, J.E., Acheampong, S., **2004**. Estimating susceptibility of biological control agents to pesticides: influence of life history strategies and population structure. Biological Control 29: 392-398.
- Stark J.D., Vargas R., Banks J.E., **2007**. Incorporating ecologically relevant measures of pesticide effect for estimating the compatibility of pesticides and biocontrol agents. Journal of Economic Entomology 100(4): 1027-1032.

- Stenersen, J., **2004**. Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology. CRC Publisher, New York.
- Strassera, M.E., **2006**. Características Bioecológicas de *Bemisia tabaci* (Gennadius) y su peligrosidad como plaga en el cultivo de Pimiento. Boletín Hortícola 33: 35-39.
- Strassera, M.E., **2007a**. Dificultades del manejo de plagas en sistemas bajo cubierta en el Cinturón Hortícola Platense y posibles medidas de control. Boletín Hortícola 36: 33-36
- Strassera, M.E., Polack, L.A., Mezquiriz, N., Martínez Quintana, O.R., **2007b**. Evaluación de diferentes tratamientos para el control de la mosca blanca de los invernáculos, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae) en tomate bajo cubierta en el Cinturón Hortícola Platense. Congreso Argentino de Horticultura. 30. Simposio Internacional sobre Cultivos Protegidos.
- Strassera, M.E., **2009**. Análisis de la sustentabilidad de tres alternativas de manejo de Plagas en tomate bajo cubierta en el Cinturón Hortícola Platense. Trabajo de Tesis de Magister Scientiae en Protección Vegetal con orientación en Manejo de plagas animales FCAYF-UNLP. La Plata, República Argentina.
- Sugiyama, K., Katayama, H., Satio, T., **2011**. Effect of insecticides on the mortalities of three whitefly parasitoid species, *Eretmocerus mundus*, *Eretmocerus eremicus* and *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae). Applied Entomology and Zoology 46: 311-317.
- Suh C.P., Orr, D.B., Van Duyn, J. W., **2000**. Effect of Insecticides on *Trichogramma exiguum* (Trichogrammatidae: Hymenoptera) Preimaginal Development and Adult Survival. Journal of Economic Entomology 93(3): 577-583.
- Sullivan, J.J., Goh, K.S., **2008**. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. Journal of Pesticide Science 33(4): 339-350.
- Téllez, M.M., Lara, L., Stansly, PH., Urbaneja, A., **2003**. *Eretmocerus mundus* (Hym.: Aphelinidae), parasitoide autóctono de *Bemisia tabaci* (Hom.: Aleyrodidae): Primeros resultados de eficacia en judía. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 29: 511-521.
- Thompson, H.M., **2003**. Behavioral effects of pesticides in bees: their potential for use in risk assessment. Ecotoxicology 12: 317-30.
- Tran, D.H., Takagi, M., Takasu, K., **2004**. Effects of selective insecticides on host searching and oviposition behavior of *Neochrysocharis formosa* (Westwood) (Hymenoptera Eulophidae), a larval parasitoid of the American serpentine leafminer. Applied Entomology and Zoology 39(3): 435-441.
- Tripplehorn, C.A., Johnson, N.F., **2005**. Borror and De Long's. Introduction to the Study of Insects. Thomson Brooks/Cole, Belmont, California, USA.



- Tucuch Haas, J.I., Rodríguez Maciel, J.C., Lagunes Tejeda, A., Silva Aguayo, G., Aguilar Medel, S., Robles Bermúdez, A., González Camacho, J.M., **2010**. Toxicidad de spiromesifen en los estados biológicos de *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae). Neotropical Entomology 39(3): 436-440.
- Urbaneja A., Stansly, P., Calvo, J., Beltrán, D., Lara, L., vd. Blom, J., **2003**. *Eretmocerus mundus*: Control Biológico de *Bemisia tabaci*. Phytoma. 144: 139-142.
- Urbaneja, A., Sánchez, E., Stansly, P. A., **2007**. Life history of *Eretmocerus mundus*, a parasitoid of *Bemisia tabaci*, on tomato and sweet pepper. BioControl 52: 25-39.
- Valle Pinheiro, P., Dias Quintela, E., Pereira de Oliveira, J., Seraphin, J.C., **2009**. Toxicity of neem oil to *Bemisia tabaci* biotype B nymphs reared on dry bean. Agropecuaria Brasileira 44(4): 354-360.
- van Driesche, R.G., Hoddle, M.S., Center, T.D., **2007**. Control de Plagas y Malezas por Enemigos Naturales. USDA Eds.
- van Lenteren, J.C., Woetts, J., **1988**. Biological and integrated pest control in greenhouses. Annual of Review Entomology 33: 239-269.
- Vanaclocha, P., Vidal Quist, C., Oheix, S., Montón, H., Planes, L., Catalán, J.A., Verdú, M. J., Urbaneja, A., **2013**. Acute toxicity in laboratory tests of fresh and aged residues of pesticides used in citrus on the parasitoid *Aphytis melinus*. Journal of Pest Science 86(2): 329-336.
- Veitch, G.E., Boyer, A., Ley, S.V., **2008**. The azadirachtin story. Angewandte Chemie International Edition.47: 9402-9429.
- Viñuela, E., Adan, A., Gonzales, M., Budia, F., Smagghe, G., Del Estal, P., **1997**. Spinosad y azadiractina: efectos de dos plaguicidas naturales hacia *Podisus maculiventris* (Say) (Hemiptera: Pentatomidae). Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas 24 (1): 57-66.
- Viñuela, E., Adan, A., Smagghe, G., González, M., Medina, M.P., Budia, F., Vogt, H., Del Estal, P., **2000**. Laboratory effects of ingestion of *azadirachtin* by two pests (*Ceratitidis capitata* and *Spodoptera exigua*) and three natural enemies (*Chrysoperla carnea*, *Opius concolor* and *Podisus maculiventris*). Bioscience Science Technology 10: 165-177.
- Viscarret, M.M., Botto, E.N., **1996**. Descripción e identificación de *Trialeurodes vaporarium* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera, Homoptera: Aleyrodidae). Revista Chilena de Entomología 23: 51-58.
- Viscarret, M., **2000a**. Estudios biológicos sobre Aleyrodidae (Insecta: Hemiptera) con especial énfasis en el complejo *Bemisia tabaci* y su posible control biológico. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. U.B.A.

- Viscarret, M.M., Botto, E.N., Polaszek, A., **2000b**. List of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) of economic importance and their natural enemies (Hymenoptera: Aphelinidae) in Argentina. *Revista Chilena de Entomología* 26: 5-11.
- Viscarret, M.M., López, S.N., Botto, E., **2001**. Estudios fitotoxícos y de tabla de vida y fecundidad sobre el biotipo ARG1 del complejo *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 60: 167-176.
- Wang, H.Y., Yang, Y., Su, J.Y., Shen, J.L., Gao, C.F., Zhu, Y.C., **2008**. Assessment of the impact of insecticides on *Anagrus nilaparvatae* (Pang et Wang) (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid of the rice planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Crop protection* 27: 514-522.
- Wang, Z., Yan, H., Yang, Y and Wu, Y., **2010**. Biotype and insecticide resistance status of the whitefly *Bemisia tabaci* in China. *Pest Management Science* 66: 1360-1366.
- Ware, G.W., **1983**. Pesticide. Theory and Application. Freeman and company (Eds). San Francisco, USA. p. 308.
- Ware, G.W., **2004**. The Pesticide Book, 6<sup>th</sup> eds. Meister Pub Co.
- Warthen, J.D., **1979**. Azadirachta indica: a source of insect feeding inhibitors and growth regulators. USDA, Agricultural Reviews and Manuals. ARM-NE-4.
- Youn, Y.N., Seo, M.J., Shin, J.G., Jang, C., Yub, Y.M., **2003**. Toxicity of greenhouse pesticides to multicolored Asian lady beetles, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control* 28: 164-170.
- Zandi-Sohani, N., Shishehbor. P., Kocheili, F., **2009**. Parasitism of cotton whitefly, *Bemisia tabaci* on cucumber by *Eretmocerus mundus*: bionomics in relation to temperature. *Crop Protection* 28: 963-967.
- Zar, J. H., **1996**. Biostatistical analysis. 3<sup>er</sup> eds. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall. 863pp.
- Zuazua, F., Araya, J.E., Guerrero, M.A., **2003**. Efectos letales de insecticidas sobre *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Aphididae), parasitoide de *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera: Aphididae). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 29: 299-307.
- Zunino, M., **2007**. Argentina: lo que la soya se llevó... Desnutrición y hambre en el país de los alimentos. Centro de Investigaciones Económicas y Políticas de Acción Comunitaria (CIEPAC). Chiapas, México.