



Universitat de Lleida

## Control biológico en cultivos hortícolas: efecto de los alimentos suplementarios en depredadores y parasitoides

Marta Fernández Oveja

Dipòsit Legal: L.242-2015

<http://hdl.handle.net/10803/293152>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



DEPARTAMENT DE PRODUCCIÓ VEGETAL I CIÈNCIA FORESTAL

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRÒNOMA  
UNIVERSITAT DE LLEIDA

**Control biològic en cultivos hortícoles: Efecto de los alimentos  
suplementarios en depredadores y parasitoides**

Memoria presentada por **Marta Fernández Oveja** para optar al título de  
Doctor por la Universitat de Lleida

Directoras:

**Dra. Rosa Gabarra**

**Dra. Judit Arnó**

IRTA – Centro Cabrils

Tutor:

**Dr. Ramon Albajes**

Universitat de Lleida

Esta tesis se ha llevado a cabo en el laboratorio de Entomología en el Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA, Cabrils). La autora fue financiada con una beca (BES-2008-007336 AGL2007-60371) del **Ministerio de Economía y Competitividad (antiguo MICINN)**.

Foto portada: Ninfa de *Macrolophus pygmaeus* en planta de pepino.

Foto contraportada: Ninfa de *Nesidiocoris tenuis* en planta de pepino.

## **Agradecimientos**

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. Rosa Gabarra y la Dra. Judit Arnó por su tiempo, dedicación, apoyo en la elaboración de este trabajo y la paciencia que han mostrado conmigo. Por todo lo que han contribuido para la mejora de mi formación como investigadora y todo lo que he aprendido durante todo este tiempo con ellas. Al Dr. Ramon Albajes, tutor de la Tesis, por su revisión y comentarios. Agradecer también al IRTA el haber puesto a mi disposición los recursos necesarios para llevar a cabo mi Tesis y al Ministerio de Economía y Competitividad (antiguo MICINN) por la financiación de la beca BES – 2008 – 007336 y del proyecto AGL2007 – 60371, que han permitido la realización de este trabajo. Al Dr. Jordi Riudavets y al Dr. Eric Lucas por sus sugerencias y correcciones. Al resto de investigadores del departamento de Entomología y a los técnicos y auxiliares de laboratorio que me han ayudado siempre que lo he pedido y los he necesitado. Gracias infinitas a Maria Vilas por todas esas flores que ha ido a buscar al campo y por ayudarme en parte de los ensayos de esta Tesis y sobre todo, por soportarme.

Muchas (muchísimas) gracias a mis compañeros de caseta, a los que ya no están y a los que se quedan (Manu, Georgina, Mireia, Hermi, Chelo, Nati, y Kathy) por los grandes momentos que hemos pasado juntos. Dedicatoria especial a Rafa, Lorena, Amaia y Pris, por las risas, las conversaciones, los mails, los ánimos y un largo etcétera, pero sobretodo por estar siempre ahí cuando los he necesitado, pese a la distancia.

Y sobre todo agradecer a mi familia, en especial a mis padres, por la paciencia que han tenido conmigo durante todo este tiempo.

A mis infantes

Perquè hi haurà un dia que no podrem més i llavors ho podrem tot  
Vicent Andrés Estellés

## Índice

<b>Resumen</b>	<b>9</b>
<b>Resum</b>	<b>10</b>
<b>Abstract</b>	<b>11</b>
<b>Introducción general</b>	<b>12</b>
Control biológico por conservación e inoculación y manejo del hábitat	13
Principales plagas de los cultivos hortícolas	14
Los depredadores polífagos y los parasitoides como agentes de control	15
Alimentos suplementarios y rendimiento de los enemigos naturales	17
Dispersión de los enemigos naturales. El papel de los compuestos volátiles	19
Control biológico en los cultivos hortícolas	20
Pepino	20
Tomate	22
<b>Objetivos</b>	<b>25</b>
<b><u>Chapter 1: Can supplemental foods enhance <i>Orius laevigatus</i> and <i>Orius majusculus</i> (Heteroptera: Anthocoridae) establishment in the crop?</u></b>	<b>26</b>
1 Introduction	27
2 Materials and Methods	28
2.1 Effect of supplemental foods on female longevity, reproduction and weight	29
2.2 Effect of supplemental food provision frequency on female longevity	30
2.3 Data analysis	30
3 Results	31
3.1 Effect of supplemental foods on female longevity, reproduction and weight	31
3.2 Effect of supplemental food provision frequency on female longevity	35
4 Discussion	36
<b><u>Chapter 2: The effect of supplemental foods in establishment of predatory Heteroptera in vegetable crops.</u></b>	<b>41</b>
1 Introduction	42
2 Materials and Methods	43
2.1 Effect of a supplemental foods on female longevity and reproduction	44
2.2 Effect of food supply frequency on female longevity	45

2.3	Data analysis	45
3	Results	46
3.1	Effect of a supplemental foods on female longevity and reproduction	46
3.2	Effect of food supply frequency on female longevity	50
4	Discussion	51

**Capítulo 3: Efecto de la adición de alimento suplementario sobre la dispersión de los depredadores polífagos. Eficacia de *Orius majusculus* en el control de trips en cultivo de pepino de invernadero** **56**

1	Introducción	57
2	Material y Métodos	61
2.1	Insectos	61
2.2	Material vegetal y dietas	62
2.3	Efecto del alimento suplementario en la dispersión de los depredadores	62
2.4	Efecto de <i>O. majusculus</i> y de los alimentos suplementarios sobre el control de <i>F. occidentalis</i>	63
2.5	Análisis estadístico.	65
3	Resultados	65
3.1	Efecto del alimento suplementario en la dispersión de los depredadores	65
3.2	Eficacia de <i>Orius majusculus</i> en el control de <i>Frankliniella occidentalis</i> en cultivo de pepino holandés bajo invernadero. Efecto de la adición de alimento suplementario en la instalación.	71
4	Discusión	74

**Capítulo 4: Selección de plantas en flor para optimizar la conservación de parasitoides de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) y de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)** **79**

1	Introducción	80
2	Material y Métodos	83
2.1	Insectos	83
2.2	Material vegetal	83
2.3	Efecto de la presencia de flores sobre los parámetros biológicos de los parasitoides	84
2.3.1	Longevidad y supervivencia	84
2.3.2	Fecundidad	85
2.4	Efecto de la presencia de flores sobre la supervivencia de las plagas	86
2.5	Análisis estadístico	86
3	Resultados	87



3.1	Efecto de la presencia de flores sobre los parámetros biológicos de los parasitoides	87
3.1.1	Longevidad y supervivencia	87
3.1.2	Fecundidad	93
3.2	Supervivencia de las plagas	95
4	Discusión	97
	<b>Discusión general</b>	<b>104</b>
	<b>Conclusiones</b>	<b>109</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>111</b>

## Resumen

Los alimentos suplementarios pueden jugar un papel importante en el control biológico de plagas, ya que pueden facilitar la instalación de los enemigos naturales, mejorando su supervivencia y reproducción.

Actualmente para mejorar el establecimiento de depredadores en los cultivos se añaden huevos de *Ephestia kuehniella*, de elevado valor nutricional, pero excesivamente caros. Por ello se buscan alternativas que sean igual de óptimas, pero que resulten más económicas, como los cistos de *Artemia* sp. o el polen comercial de abeja. En pruebas de laboratorio, los cistos mejoraron la reproducción de cuatro depredadores polífagos (*Orius majusculus*, *Orius laevigatus*, *Macrolophus pygmaeus* y *Nesidiocoris tenuis*), mientras que el polen mejoró su longevidad. Un aspecto importante que debe tener el alimento a añadir en el cultivo es que permita la dispersión de los enemigos naturales hacia las plantas infestadas. La adición de cistos de *Artemia* sp. en la planta donde se realizó la suelta de los depredadores *O. majusculus*, *O. laevigatus* y *M. pygmaeus*, no interfirió en su dispersión y esta estuvo sobre todo influida por la presencia de insectos plaga en las plantas circundantes. Por otro lado, en un cultivo de pepino de invernadero y en jaulas de exclusión, se observó que una única aplicación de cistos de *Artemia* sp., solos o junto con polen, en el momento de la inoculación de *O. majusculus* mejoró su instalación en el cultivo, incrementando sus poblaciones y mejorando el control de *Frankliniella occidentalis*.

El néctar es un alimento que se encuentra de manera natural en los agroecosistemas y es una fuente de nutrientes para los parasitoides. Las especies vegetales *Fagopyrum esculentum*, *Lobularia maritima*, *Achillea millefolium* o *Sinapis alba*, mejoraron la longevidad y reproducción de las especies de parasitoides de *Tuta absoluta*, *Stenomomesius* sp. nr. *japonicus*, *Necremnus* sp. nr. *artynes* y *Bracon* sp. nr. *nigricans* y el parasitoide de *Bemisia tabaci*, *Eretmocerus mundus*. El néctar incrementó también la longevidad de *T. absoluta*, especialmente de los machos, aunque estas flores muy posiblemente no representan una amenaza para el cultivo ya que su efecto sobre los parasitoides sería mayor.

Los alimentos suplementarios estudiados mejoran los parámetros biológicos de los depredadores más abundantes en cultivos hortícolas y muy posiblemente pueden incrementar su eficacia de control. La introducción de recursos florales en los cultivos también tiene un efecto beneficioso en los parasitoides estudiados y la proximidad al cultivo de estas especies vegetales puede mejorar la eficacia del control. Por tanto, los alimentos suplementarios pueden mejorar los programas de control biológico por conservación e inoculación de depredadores y parasitoides.

## Resum

Els aliments suplementaris poden jugar un paper important en el control biològic de plagues, ja que poden facilitar la instal·lació dels enemics naturals, millorant la seva supervivència i reproducció.

Actualment per millorar l'establiment de depredadors en els cultius s'afegeixen ous d'*Ephestia kuehniella*, d'elevat valor nutricional, però excessivament cars. Per això es busquen alternatives que siguin igual d'òptimes, però que resultin més econòmiques, com els quists secs d'*Artemia* sp. o el pol·len comercial d'abella. En proves de laboratori, els quists van millorar la reproducció de quatre depredadors polífags (*Orius majusculus*, *Orius laevigatus*, *Macrolophus pygmaeus* i *Nesidiocoris tenuis*), mentre que el pol·len va millorar la seva longevitat. Un aspecte important que ha de tenir l'aliment a afegir en el cultiu és que permeti la dispersió dels enemics naturals cap a les plantes infestades. L'adició de quists d'*Artemia* sp. a la planta on es va realitzar la solta dels depredadors *O. majusculus*, *O. laevigatus* i *M. pygmaeus*, no va interferir en la seva dispersió i aquesta va estar sobretot influïda per la presència d'insectes plaga en les plantes circumdants. D'altra banda, en un cultiu de cogombre d'hivernacle i en gàbies d'exclusió, es va observar que una única aplicació de quists d'*Artemia* sp., sols o junt amb pol·len, en el moment de la inoculació d'*O. majusculus* va millorar la seva instal·lació en el cultiu, incrementant les seves poblacions i millorant el control de *Frankliniella occidentalis*.

El nèctar és un aliment que es troba de manera natural en els agroecosistemes i és una font de nutrients pels parasitoides. Les espècies vegetals *Fagopyrum esculentum*, *Lobularia maritima*, *Achillea millefolium* o *Sinapis alba*, van millorar la longevitat i reproducció de les espècies de parasitoides de *Tuta absoluta*, *Stenomiesius* sp. nr. *japonicus*, *Necremnus* sp. nr. *artynes* i *Bracon* nr. sp. *nigricans* i el parasitoide de *Bemisia tabaci*, *Eretmocerus mundus*. El nèctar va incrementar també la longevitat de *t. absoluta*, especialment dels mascles, encara que aquestes flors molt possiblement no representen una amenaça pel cultiu ja que el seu efecte sobre els parasitoides seria major.

Els aliments suplementaris estudiats milloren els paràmetres biològics dels depredadors més abundants en cultius hortícoles i molt possiblement poden incrementar la seva eficàcia de control. La introducció de recursos florals en els cultius també té un efecte beneficiós en els parasitoides estudiats i la proximitat al cultiu d'aquestes espècies vegetals pot millorar l'eficàcia dels controls. Per tant, els aliments suplementaris poden millorar els programes de control biològic per conservació i inoculació de depredadors i parasitoides.

## Abstract

The supplemental foods can play an important role in biological control of pests because they can facilitate the establishment of natural enemies, improving their survival and reproduction.

Nowadays, eggs of *Ephestia kuehniella* are supplied to improve the establishment of predators in crops, food with high nutritional value but excessively expensive. Therefore alternatives are searched that they are equally optimal but more economical, as the dry cysts of *Artemia* sp. and commercial bee pollen. In laboratory assays, cysts improved the reproduction of four polyphagous predators (*Orius majusculus*, *Orius laevigatus*, *Macrolophus pygmaeus* y *Nesidiocoris tenuis*), whereas the pollen improved their longevity. The food to add in crops must have an important trait; it must permit the dispersal of natural enemies towards infested plants. The addition of *Artemia* sp. cysts in the plant where *O. majusculus*, *O. laevigatus*, and *M. pygmaeus* were released did not interfere in their dispersal and this was especially influenced by the presence of insect pests in surrounding plants. On the other hand, in a greenhouse cucumber crop in exclusion cages, it was observed that only one application of cysts, either alone or together with pollen, at the moment of *O. majusculus* inoculation improved their establishment in crop, increasing their populations and improving their control of *Frankliniella occidentalis*.

Nectar is a food that is naturally found in agroecosystems and it is a source of nutrients for the parasitoids. The floral species *Fagopyrum esculentum*, *Lobularia maritima*, *Achillea millefolium* and *Sinapis alba* improved longevity and reproduction of the parasitoids species of *Tuta absoluta*, *Stenomesus* sp. nr. *japonicus*, *Necremnus* sp. nr. *artynes* y *Bracon* sp. nr. *nigricans* and a parasitoid of *Bemisia tabaci*, *Eretmocerus mundus*. Nectar also increased the longevity of *T. absoluta*, especially males, although these flowers quite possibly do not represent a threat to the crop and its effect over parasitoids would be greater.

The supplemental foods studied improve biological parameters of the most abundant predators in horticultural crops and quite possibly may increase their efficacy of control. The introduction of floral resources in the crops has also a useful effect on the parasitoids studied and the proximity of these plants can improve the efficacy of control. Therefore, supplemental foods can improve conservation and inoculation biological control programs of predators and parasitoids.

### **Introducción general**

El sector productivo de hortícolas es uno de los más importantes y dinámicos en la agricultura española. Tanto cuando se realiza en invernadero como al aire libre, se trata de una producción intensiva que favorece la proliferación de plagas polífagas en los cultivos. Los intentos por disminuir al máximo las poblaciones de estas plagas, han llevado a la aplicación continuada de tratamientos insecticidas (dirigidos, sobre todo, a evitar la transmisión de virus). Actualmente debido a la elevada demanda por parte del consumidor de productos sin residuos de pesticidas, la necesidad de una agricultura más sostenible, y por lo tanto de bajo impacto ambiental, hace que cada día sea más necesario la aplicación de técnicas más respetuosas con el medio ambiente (Gurr et al. 2004).

El Control Integrado de Plagas (CIP) aparece en la agricultura moderna como una necesidad para substituir las excesivas aplicaciones de productos químicos por otras técnicas menos perjudiciales para el medio ambiente. Estas técnicas incluyen el uso de métodos biológicos, químicos y culturales, así como el uso de la biotecnología (Albajes y Alomar 1999; Eilenberg et al. 2001; Heinz et al. 2004). Uno de los componentes más importantes del CIP es el control biológico, el cual consiste en el uso de enemigos naturales (depredadores, parasitoides y entomopatógenos) para mantener las densidades de las poblaciones plaga en unos niveles más bajos de los que tendrían en su ausencia (DeBach 1964). Según Eilenberg et al. (2001) existen cuatro tipos de control biológico: 1) **Clásico**, introducción intencionada de un agente de control exótico con la expectativa que se establezca y controle las plagas a largo plazo; 2) **Inoculación**, basado en la recogida, cría masiva y suelta periódica de un agente de control en pequeñas cantidades para el control temporal de una plaga. Se espera que el agente de control se instale, se reproduzca y al cabo de varias generaciones llegue a controlar la plaga; 3) **Inundativo**, basado en la recogida, cría masiva y suelta periódica en

grandes cantidades de un agente de control biológico que permita suprimir la plaga únicamente con los organismos liberados y no con su descendencia; 4) **Conservativo**, basado en la modificación del medio y de las prácticas habituales para proteger y aumentar las poblaciones ya existentes de enemigos naturales.

Actualmente, el control biológico en cultivos hortícolas intensivos se basa en la inoculación y/o conservación de depredadores y parasitoides.

### **Control biológico por conservación e inoculación y manejo del hábitat**

El control biológico puede ser una alternativa al uso generalizado de pesticidas y un componente importante en la agricultura sostenible. Se basa principalmente bien en la explotación de los enemigos naturales autóctonos que son capaces de colonizar los cultivos de manera espontánea, control biológico por conservación (CBC), o en la utilización de enemigos naturales producidos masivamente y liberados (control biológico inoculativo) (Barbosa 1998; Pickett y Bugg 1998; Gurr y Wratten 1999; Jonsson et al. 2008). En el caso de la inoculación, su eficacia depende de la capacidad del enemigo natural liberado de multiplicarse y de reducir la población de la plaga. Por ello la liberación puede ir acompañada de la adición de alimentos suplementarios que mejoren y favorezcan la instalación de los agentes de control (Eilenberg et al., 2001).

El CBC consiste en la creación de un entorno apropiado para los enemigos naturales, teniendo en cuenta los factores que pueden influirlos, como son los factores abióticos (temperatura, fotoperiodo, ventilación), los pesticidas, el acceso a fuentes de alimentación alternativas, los efectos asociados a las plantas (oviposición, refugios) y las interacciones con otros enemigos naturales. Su objetivo es aumentar el impacto de los enemigos naturales autóctonos sobre la plaga, por ello, incluye una serie de modificaciones del hábitat destinadas a crear las condiciones que favorezcan la supervivencia, fecundidad, longevidad y acción

de los enemigos naturales y mejorar su colonización del cultivo (Pickett y Bugg 1998; Landis et al. 2000; Alomar y Albajes 2003; Gardiner et al. 2008). Una práctica habitual es la creación de infraestructuras ecológicas con especies vegetales seleccionadas para conservar a los insectos beneficiosos. Estas infraestructuras pueden proveer a los enemigos naturales de alimento, además de refugio (Landis et al. 2000; Gurr et al. 2004; Alomar y Albajes 2005; Jonsson et al. 2008).

Los agroecosistemas a menudo, están formados por entornos muy desfavorables para los enemigos naturales, debido a la existencia de un elevado número de perturbaciones. El área Mediterránea se caracteriza por tener una producción hortícola muy intensiva con una elevada presión de plagas polífagas y asociadas a estas plagas, se encuentran abundantes poblaciones de depredadores y parasitoides nativos. La conservación de los enemigos naturales de estas plagas mediante programas CIP basados en el control biológico, permite mantenerlas bajo control (Nicoli y Burgio 1997; Albajes et al. 1999; Gerling et al. 2001).

### **Principales plagas de los cultivos hortícolas**

Entre las principales plagas de los cultivos hortícolas intensivos en la cuenca mediterránea se encuentran, la mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae), el trips *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) y el lepidóptero minador *Tuta absoluta* Myerick (Lepidoptera: Gelechiidae). Las moscas blancas se alimentan de la savia de las plantas que obtienen a través del estilete bucal que insertan en los vasos del floema provocando el debilitamiento de la planta. Debido a su alimentación en el floema, algunas especies, y especialmente *B. tabaci*, son vectores muy eficientes de virosis importantes que ocasionan graves daños a cultivos de solanáceas y cucurbitáceas. *Frankliniella occidentalis* es una plaga importante, tanto al aire libre como en

cultivos protegidos, de un amplio número de cultivos hortícolas especialmente tomate, pimiento y pepino; también es un vector eficiente del virus del bronceado del tomate TSWV. La polilla del tomate *T. absoluta* reduce el rendimiento y la calidad del fruto, lo que puede provocar elevadas pérdidas de cosecha en los cultivos de tomate severamente infestado.

### **Los depredadores polífagos y los parasitoides como agentes de control**

Las plagas anteriormente citadas pueden ser controladas por depredadores y parasitoides autóctonos que colonizan de manera espontánea los cultivos. La mayoría de estos depredadores son polífagos y omnívoros. Una ventaja de esta polifagia y omnivoría, es que pueden mantenerse en el cultivo alimentándose de otras presas o de la planta antes de que aparezca la plaga. Además, una vez establecidos en el cultivo, al no depender únicamente de una única presa, pueden ejercer el control cuando la densidad de presas es baja y mantenerse en el cultivo previniendo la re-infestación de la plaga (Albajes y Alomar 1999).

En el área Mediterránea los cultivos hortícolas, tanto al aire libre como en invernadero, afectados por *B. tabaci*, *F. occidentalis* y *T. absoluta* son colonizados espontáneamente por diferentes enemigos naturales (depredadores y parasitoides). Destacan dentro del grupo de los depredadores los míridos *Macrolophus pygmaeus* Rambur y *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Hemiptera: Miridae) y los antocóridos *Orius majusculus* Reuter y *Orius laevigatus* Fieber (Hemiptera: Anthocoridae) (Riudavets y Castañé 1998; Castañé et al. 2004; Arnó et al. 2008; Sánchez y Lacasa 2008). *Macrolophus pygmaeus* y *N. tenuis* son dos especies autóctonas de la cuenca mediterránea y debido a su polifagia, son eficaces depredando un amplio rango de presas, como moscas blancas, trips, lepidópteros y otros artrópodos plaga de los cultivos hortícolas (Riudavets y Castañé 1998; Arnó et al. 2003; Urbaneja et al. 2009; Arnó et al. 2010b; Urbaneja et al. 2012). Tanto los estados inmaduros



como los adultos pueden alimentarse de diferentes niveles tróficos dado que aparte de artrópodos (plagas, parasitoides y otros depredadores), también pueden alimentarse de alimentos de origen vegetal (Alomar y Wiedenmann, 1996; Coll y Ruberson, 1998; Eubanks y Styrsky, 2005). Los míridos tienen una elevada dependencia de la planta ya que la utilizan como substrato donde realizar la puesta y también obtienen de ella diversos nutrientes (Perdikis y Lykouressis 2000; Portillo et al. 2012) y agua, que es necesaria para la digestión extra-oral que realizan. No obstante, esta alimentación sobre la planta puede resultar negativa cuando implica un riesgo para el cultivo (Castañé et al. 2011). En cultivos comerciales es muy extraño que *M. pygmaeus* cause daños, sin embargo, el caso de *N. tenuis* es más conflictivo ya que puede afectar el desarrollo de la planta y su producción cuando el nivel de presa es bajo y la densidad del depredador elevada (Sánchez y Lacasa 2008; Calvo et al. 2009; Arnó et al. 2010a). Los depredadores polífagos *O. majusculus* y *O. laevigatus*, son dos especies paleárticas y dos de los enemigos naturales ampliamente utilizados en programas de control biológico, tanto en estrategias de inoculación como de conservación, de los trips *F. occidentalis* (Fischer et al. 1992; Chambers et al. 1993; Castañé et al. 1999). Como los míridos, estos depredadores son polífagos, alimentándose también de alimentos de origen vegetal y obteniendo beneficios nutricionales de ellos (Pumariño y Alomar, 2012).

En cuanto a los parasitoides, podemos citar las especies nativas *Stenomesus* sp. nr. *japonicus* Ashmead y *Necremnus* sp. nr. *artynes* Walker (Hymenoptera: Eulohidae) y el bracónido *Bracon* sp. nr. *nigricans* Szépliget (Hymenoptera: Braconidae). Estas tres especies, que son ectoparasitoides de larvas de *T. absoluta*, son las que se han encontrado más frecuentemente asociadas a esta plaga en las diferentes áreas productoras de tomate del área mediterránea (Zappalà et al. 2013; Gabarra et al. 2014). Otra especie que se ha considerado uno de los agentes de

control biológico más importantes que aparece de forma espontánea en los invernaderos, es *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoide específico de *B. tabaci* (Gerling et al. 2001; Arnó et al. 2010b). Sus hembras depositan los huevos entre la ninfa y la superficie de la hoja y es la larva de primer estadio del parasitoide la que penetra en el huésped (Gerling et al. 1998). Actualmente se utiliza para el control biológico de *B. tabaci* (Arnó et al. 2010b; Zappalà et al. 2013; Gabarra et al. 2014)

### **Alimentos suplementarios y rendimiento de los enemigos naturales**

Los alimentos suplementarios tienen el potencial de mejorar la eficiencia de los enemigos naturales, por tanto, de incrementar la eficacia del control biológico de plagas (Mcmurtry y Scriven 1966; Hagen 1986; Van Rijn et al. 2002; Wäckers et al. 2005). Durante los periodos en que la presa está ausente o en los que su densidad es muy baja, por ejemplo, durante el periodo inmediatamente posterior al trasplante, estos alimentos pueden facilitar el establecimiento del enemigo natural en el cultivo (Crum et al. 1998). El alimento seleccionado para aplicar en campo, debería facilitar la dispersión de los enemigos naturales hacia las plantas infestadas de plaga, evitar que abandonen estas plantas y mejorar la instalación del enemigo natural incrementando su fecundidad y supervivencia (Wade et al. 2008b).

Uno de los inconvenientes del uso de depredadores en control biológico es el lento establecimiento en el cultivo. Según la especie, puede durar varias semanas hasta que se desarrollan unos niveles de población elevados como para controlar la plaga (Lenfant et al. 2000; Castañé et al. 2006b). Una de las prácticas estudiadas para compensar este retraso es proveer a los depredadores con un alimento alternativo que pueden ser, soluciones ricas en carbohidratos y/o proteínas o presas alternativas que se distribuyen sobre el cultivo (Lenfant et al. 2000; Van Rijn et al. 2002; Mensah y Singleton 2003; Wade et al. 2008; Put et al. 2012). Este es el caso

de los huevos de *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), ya que tienen un elevado valor nutricional y se ha demostrado que mejoran la longevidad y la fecundidad de algunos depredadores. Pero la utilización de estos huevos supone un elevado coste económico y por ello se han realizado estudios para encontrar alimentos alternativos que mejoren la instalación de los depredadores en los cultivos. Los cistos del crustáceo braquiópodo *Artemia* sp. Leach (Branchiopoda: Artemiidae), usados habitualmente como fuente de alimento en acuicultura, son un alimento que permite el desarrollo y la reproducción de diferentes especies de *Orius* y de *M. pygmaeus* (Arijs y De Clercq 2001; De Clercq et al. 2005; Castañé et al. 2006; Vandekerkhove et al. 2009). Estas mismas especies de depredadores son capaces de alimentarse de polen (Cocuzza et al. 1997; Vandekerkhove y De Clercq 2010; Wong y Frank 2013). Por lo tanto ambos alimentos pueden ser una buena alternativa a la utilización de huevos de *E. kuehniella* como alimento suplementario para la instalación de depredadores en el cultivo.

Por otro lado, los alimentos de origen vegetal como el néctar (floral y extra floral) y el polen, que se encuentran de manera natural en los agroecosistemas, pueden satisfacer las necesidades metabólicas y reproductivas de los parasitoides (Quicke 1997). Los parasitoides juegan un papel importante en el control biológico de plagas y alcanzan su máximo potencial biológico cuando disponen de un alimento rico en nutrientes, especialmente de azúcares y aminoácidos, como el polen o el néctar. Estos alimentos les permitirán maximizar su vida útil así como su capacidad reproductiva (Thompson 1999). A partir de los datos de los muestreos en campo sobre abundancia de himenópteros parasitoides, las especies de plantas potencialmente interesantes para la conservación de parasitoides serían *Lobularia maritima* (L.), *Sinapis alba* (L.) y *Achillea millefolium* (L.). Estas, junto a *Fagopyrum esculentum* (Moench), han sido objeto de diferentes estudios que han evaluado su efecto sobre la abundancia y los parámetros biológicos de diferentes

especies de himenópteros parasitoides entre los que se incluyen eulófidos, braconídeos y especies del género *Trichogramma* (Manojlovic et al. 2000; Wäckers 2004; Vattala et al. 2006; Witting-Bissinger et al. 2008; Winkler et al. 2009a). El uso de estas flores en los márgenes de los cultivos, es una opción para mejorar la disponibilidad de néctar para los insectos beneficiosos en los agro-ecosistemas (Winkler et al. 2009a). No obstante, que los recursos florales que provea una planta o plantas pueda mejorar la longevidad, supervivencia y/o fecundidad de un enemigo natural, no es garantía que ese mismo recurso colocado en la proximidad del campo de cultivo sea una fuente de enemigos naturales para el cultivo (Jervis et al. 2004).

### **Dispersión de los enemigos naturales. El papel de los compuestos volátiles**

La dispersión y colonización del cultivo por parte de los enemigos naturales juega un papel importante en el éxito del control biológico. Se ha demostrado, tanto teórica como empíricamente, que una colonización temprana de los cultivos por los enemigos naturales es un elemento clave en su capacidad para suprimir las poblaciones plaga (Settle et al. 1996; Ives y Settle 1997; Landis y Werf 1997; Bianchi et al. 2009). Por otro lado, la dispersión es el proceso por el cual se conectan sub-poblaciones, uniéndose de este modo en una población espacialmente estructurada (Taylor 1990; Hanski y Gilpin 1997; Ellner et al. 2001; Holland y Hastings 2008).

Los compuestos volátiles juegan un papel importante en la colonización y dispersión de los enemigos naturales en los cultivos. Uno de los principales atributos asociado a la efectividad de los enemigos naturales, es su elevada eficiencia en la búsqueda de alimento (Carvalho et al. 2011). Se sabe que para localizar la plaga, los enemigos naturales pueden utilizar, en conjunto o por separado, diferentes tipos de señales, tanto químicas, físicas y mecánicas (Greany y

Hagen 1981; Letourneau 1988). El éxito de la búsqueda y encuentro de la plaga por el enemigo natural, está asociado a la capacidad de este último en reconocer los compuestos volátiles asociados con la presencia de la plaga o con los daños que esta produce en la planta (Turlings et al. 1990; Vet y Dicke 1992; Tumlinson 1993; Dicke 1994; Dicke 1999).

La orientación, localización y la exploración del complejo planta-herbívoro por los enemigos naturales incluye complicadas interacciones físico-químicas, como por ejemplo la liberación por parte de las plantas de compuestos que pueden atraer a los enemigos naturales hacia los herbívoros responsables de los daños (Dicke et al. 1990; Turlings et al. 1990; Takabayashi y Dicke 1996; Dicke y Hilker 2003). Por otro lado, la cantidad de volátiles emitido está en función de daño producido, así a mayor daño mecánico en los tejidos vegetales, mayor cantidad de volátiles emitidos por la planta (Rodríguez-Saona et al. 2002; Rodríguez-Saona et al. 2003; Delphia et al. 2007).

### **Control biológico en los cultivos hortícolas** **Pepino**

El pepino (*Cucumis sativus* L.) se produce en muchas regiones del mundo, especialmente al norte de Europa, la región Mediterránea, el norte de África, Canadá y Japón. En España es uno de los cultivos hortícolas más importantes. En el 2011 la superficie destinada a su cultivo fue de 8.206 hectáreas, de las cuales 7.271 fueron bajo invernadero. En el mismo año, la producción total fue de 719.219 toneladas, de las cuales el 96% se obtuvo en el área mediterránea de Andalucía, Murcia y Cataluña (MAGRAMA 2011).

Las plagas más importantes del pepino en invernadero son el trips *F. occidentalis* y la mosca blanca *B. tabaci*, tanto por los daños directos que producen como por su capacidad de transmitir virus. En pepino holandés, que se destina

mayoritariamente a la exportación, es especialmente importante el control de *F. occidentalis* ya que produce grandes pérdidas económicas por los daños causados en frutos asociados a su alimentación y/o puesta (Rosenheim et al. 1990; Welter et al. 1990; Shipp et al. 2000).

La práctica habitual para el control de trips en pepino es el uso de ácaros fitoseidos (Gillespie 1989; Shipp et al. 2004; Messelink et al. 2006; Calvo y Belda 2008). También, los depredadores de la familia Anthocoridae, que colonizan de manera espontánea los cultivos, son muy eficaces en la regulación de poblaciones naturales de trips (Lacasa et al. 2008). Los Miridae también incluyen a los trips en su dieta, pero no muestran preferencia por esta presa, por lo que su uso está más limitado en el control de esta plaga. Uno de los inconvenientes del uso de ácaros depredadores y de algunas especies de *Orius* en pepino, como *O. laevigatus*, es que son dependientes del polen. Los cultivares modernos de este cultivo son ginoicos, es decir, solo producen flores femeninas, por lo que no disponen de polen para que los depredadores puedan alimentarse de él (Ramakers y O’Niell 1999) y esto afecta a su instalación de en el cultivo y con ello, al control de trips. Una ventaja de la utilización de *O. majusculus* frente a los ácaros fitoseidos o de otras especies de *Orius*, es que esta especie es más independiente del polen y, aunque también puede alimentarse de él, no es su alimento principal. Se considera que *O. majusculus* es una especie que habita en las hojas, a diferencia de *O. laevigatus*, que se encuentra en las flores (Chambers et al. 1993), es por esto que su uso en pepino puede ser más adecuado dado que la gran mayor parte de la población de las larvas de *F. occidentalis* se encuentra en las hojas (Ramakers y O’Niell 1999).

Son muy numerosos los enemigos naturales conocidos de *B. tabaci*, aunque muy pocos son producidos comercialmente para su liberación (Calvo and Belda 2008). En este grupo encontramos parasitoides, depredadores y hongos entomopatógenos. Dentro del grupo de los parasitoides encontramos *Encarsia*

*formosa* Gahan, *Eretmocerus eremicus* Rose and Zolnerowich (Hymenoptera: Aphelinidae) y *E. mundus*, siendo este último el más utilizado ya que resulta más eficaz frente *B. tabaci* (Stansly et al. 2005a). Entre los depredadores que pueden establecerse en pepino, destacan los míridos *M. pygmaeus* y *N. tenuis*, el neuróptero *Chrysoperla carnea* Stephens (Neurotera: Chrysopidae) y el ácaro *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) (Arnó et al. 2010b), que es el agente de control que se emplea actualmente, ya que puede establecerse en pepino y presenta un ciclo de desarrollo muy corto, por lo que incrementa rápidamente sus poblaciones y es capaz de ejercer un control eficaz de *B. tabaci* (Nomikou et al. 2001; Calvo et al. 2010). El uso de míridos y de *C. carnea* plantea ciertos problemas ya que tienen un ciclo de desarrollo muy largo que limita su uso en pepino, por tratarse un cultivo de ciclo corto. Esto haría necesario emplear dosis de suelta que harían económicamente inviable el control de plagas. A parte de los organismos anteriormente citados, existen otras especies como el mírido *Dicyphus tamaninii* Wagner que, siguiendo en el cultivo unas estrategias que favorezcan su aparición y conservación, pueden ayudar de forma importante al control de esta plaga (Gabarra et al. 1995; Castañé et al. 2000). También sería el caso de varias especies de *Orius*, a pesar que se consideran principalmente depredadores de trips, estudios de campo y laboratorio muestran que también consumen mosca blanca (Arnó et al. 2008).

### **Tomate**

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) es el producto hortícola de mayor importancia económica a nivel mundial. Dentro de la UE, España se encuentra entre los principales productores, siendo con diferencia el cultivo hortícola con mayor producción, en el 2011 la superficie destinada al cultivo fue de

51.204 hectáreas, con una producción total de 3.864.120 toneladas, de las cuales el 40% se obtuvo en Andalucía (MAGRAMA 2011).

Las principales plagas del tomate son las moscas blancas *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae) y *B. tabaci*. En los últimos años, la mosca blanca *B. tabaci* ha sido considerada la plaga clave del tomate por su capacidad de transmitir virus que provocan grandes pérdidas económicas. Pero, a finales del 2006 se detectó en la provincia de Castellón la presencia de la polilla del tomate *T. absoluta* (Urbaneja et al. 2007), la cual se convirtió rápidamente en una de las plagas más importantes de este cultivo. Existen otras plagas que también pueden causar importantes daños económicos, como varias especies de lepidópteros, el trips *F. occidentalis*, minadores del género *Liriomyza* (Diptera: Agromyzidae), ácaros y diversas especies de pulgones. Para el manejo de estos fitófagos, tanto en cultivos de invernadero como al aire libre, se ha recurrido al manejo integrado de plagas en el que el control biológico juega un papel importante (Gabarra et al. 2008) y las estrategias utilizadas son la inoculación y la conservación de enemigos naturales.

Para el control biológico de *T. vaporariorum* en invernadero se ha utilizado durante muchos años *E. formosa*, realizando pequeñas inoculaciones a bajas dosis de manera continuada (Gabarra et al. 2008), aunque su eficacia baja notablemente con condiciones climáticas adversas (van Lenteren y Martin 1999). El mírido *M. pygmaeus*, solo o junto a *E. formosa*, se usa en muchos invernaderos de tomate donde antes solo se usaba el parasitoide. Al ser un depredador polífago, también controla otras plagas como minadores de hojas, araña roja, pulgones y trips. Cuando apareció *B. tabaci* se usó también *E. formosa*, pero al conseguir unos niveles de control insatisfactorios se decidió usar el parasitoide exótico *E. eremicus*. Sin embargo se observó que las poblaciones de *E. eremicus* fueron reemplazadas por poblaciones espontáneas de *E. mundus* (Stansly et al. 2005b) y



pasó a usarse como agente de control de *B. tabaci*. Cuando los niveles de *B. tabaci* son muy elevados se introduce el depredador *N. tenuis* junto a *E. mundus* (Gabarra et al. 2008), aunque el uso de *N. tenuis* no es muy recomendable ya que es fitófago y cuando las poblaciones del depredador son muy elevadas y la presa es escasa, puede causar daños en el cultivo.

En el caso del lepidóptero *T. absoluta*, las pruebas de laboratorio indican que los míridos depredadores *M. pygmaeus* y *N. tenuis* son voraces depredadores de huevos (Urbaneja et al. 2009). También se han encontrado varias especies de parasitoides de larvas, entre las más abundantes están *N. sp. nr. artynes*, *S. nr. japonicus* y *B. nr. nigricans* (Urbaneja et al. 2012; Zappalà et al. 2012; Ferracini et al. 2012; Biondi et al. 2013a; Zappalà et al. 2013; Gabarra et al. 2014), por lo que las estrategias de control irían encaminadas en la conservación de estos parasitoides.

### Objetivos

El objetivo general de esta tesis es mejorar los programas de control biológico por conservación e inoculación de depredadores polífagos y parasitoides en cultivos hortícolas, mediante el aporte de alimentos suplementarios. Para desarrollar este objetivo general se han identificado diferentes objetivos parciales:

Determinar si alimentos suplementarios, tanto de origen animal o vegetal, mejoran el establecimiento temprano de los depredadores polífagos *O. majusculus*, *O. laevigatus*, *M. pygmaeus* y *N. tenuis*. También, determinar cómo afecta la frecuencia de aporte del alimento suplementario en la longevidad de los depredadores. **Capítulos 1 y 2**

Determinar si la adición de un alimento suplementario en la planta en la que se liberan los depredadores polífagos afecta a su capacidad de dispersión. Así como, determinar el efecto de la adición de alimentos suplementarios sobre el establecimiento de *O. majusculus* y sobre su eficacia en el control de *F. occidentalis* en cultivo de pepino de invernadero. **Capítulo 3**

Determinar el efecto de siete plantas en flor sobre la supervivencia y reproducción de cuatro especies de parasitoides (*S. nr. japonicus*, *N. nr. artynes*, *B. nr. nigricans* y *E. mundus*) y sobre la supervivencia de las plagas que parasitan *T. absoluta* y *B. tabaci*. **Capítulo 4**

# 1

**Can supplemental foods enhance *Orius laevigatus* and *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae) establishment in the crop?**



Adulto y huevos de *O. laevigatus*

### 1 Introduction

Seasonal inoculation and conservation of natural enemies has proven to be useful in controlling several polyphagous pests that attack greenhouse vegetable crops (Albajes et al. 1999; Heinz et al. 2004). Overall, the efficacy of biological control programs is closely linked to an early establishment of the natural enemies in the crop. This early establishment can be enhanced by cultural practices, one of these being the provision of supplemental food when prey is scarce (van Lenteren and Manzaroli 1999; Perdikis et al. 2011; Put et al. 2012). A suitable food source should retain natural enemies in the target crop and increase their fecundity, fertility, searching capacity, and survival (van Rijn et al. 2002; Wade et al. 2008b).

The polyphagous predators *Orius laevigatus* (Fieber) and *Orius majusculus* (Reuter) (Hemiptera: Anthocoridae) are important biological control agents of thrips (Riudavets and Castañé 1998), although they may also feed on other important vegetable pests such as *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) (Arnó et al. 2008) and aphids (Alvarado et al. 1997). They are commonly used as natural enemies to control western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) (van Lenteren 2011), not only in seasonal inoculative programs of mass-reared individuals, but also in conservation biological control strategies that enhance naturally occurring colonization (Castañé et al. 1999; van Lenteren and Martin 1999; Sánchez et al. 2000; Arnó et al. 2010b).

*Orius laevigatus* and *O. majusculus*, as many other Heteroptera, are zoophytophagous and both their immature and adult forms can feed on different trophic levels (i.e. other arthropods and plant food such as pollen, nectar or honeydew). Many studies have shown that predatory Heteroptera obtain nutritional benefits from plant food (Naranjo and Gibson 1996; Coll and Guershon 2002). However, plant food is nutritionally poor for predators because of its relative lack of protein (Yong 2003). When prey is scarce, the provision of supplemental food

might provide predators with the nutrients they cannot obtain from plants, also increasing their individual fitness and, as a consequence, their density in the crop, thus enhancing pest control (Wade et al. 2008b). *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) is the factitious prey commonly used in commercial mass rearings of these predatory bugs and has been proposed as an alternative source of nutrition to enhance the establishment of generalist predators early in a crop when prey is scarce (van Lenteren and Manzaroli 1999). Other factitious foods used in mass rearings are the cysts of *Artemia* sp. (Branchiopoda: Artemiidae) (De Clercq et al. 2005; Castañé et al. 2006b) and pollen, which enable predators to sustain reproduction and adult longevity even in the absence of prey (Cocuzza et al. 1997b; Vandekerkhove and De Clercq 2010).

The objective of the present study was to evaluate the effect of three supplemental foods on the longevity, reproduction and weight of *O. majusculus* and *O. laevigatus* as well as to analyze how food supply frequency affects predator longevity. The ultimate goal of this evaluation is to find out if any of the tested foods may be used as supplementary source of nutrients to enhance early establishment of these predators in the crop when prey is scarce.

## 2 Materials and Methods

Cucumber plants (cv. Makerter F1, Fitó<sup>®</sup>) were grown from seeds and kept free of herbivores in an insect-proof cage until the first true leaf expanded (approximately two weeks).

*Orius laevigatus* and *O. majusculus* individuals were obtained from laboratory colonies reared on green bean pods with *E. kuehniella* eggs as prey and maintained at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  RH and under 16:8 h (light: dark) photoperiod. Rearings were initiated using individuals collected on horticultural crops near Barcelona (Spain).

Three supplemental foods were tested: 1) *E. kuehniella* eggs (Biotop<sup>®</sup>, Vallbone, France) kept in the freezer at -20 °C until use; 2) finely ground pellets of dry commercial multifloral bee pollen (Mielar S.A, Barcelona, Spain); and 3) dry cysts of *Artemia* sp. with a high unsaturated fatty acid content from Asiatic lakes (INVE Animal Health S.A., Dendermonde, Belgium). Foods were always supplied *ad libitum* glued onto a 1cm<sup>2</sup> area of a Post-it<sup>®</sup> and renewed three times a week, unless another frequency is indicated (see section 2.2).

All experiments were conducted in climate chambers at the same conditions mentioned above.

### **2.1 Effect of supplemental foods on female longevity, reproduction and weight**

Experiment 1. To evaluate longevity, pairs of less than 72 h old females were isolated in ventilated plastic cages (9 cm diameter, 11 cm high) with a water dispenser and a piece of crumpled paper to provide hiding places and avoid cannibalism. One of the tested supplemental foods was supplied in each cage. Eight to 10 females of each *Orius* species were fed with each supplemental food. Females in cages with water but without supplemental food were used as controls. Survival was monitored on a daily basis until predators died.

Experiment 2. To measure the effect on fecundity, 5 – 7 day old females that had already passed their preoviposition period were used. Each female was isolated for seven days in a ventilated plastic cage (11.5 cm diameter, 21 cm high) with a cucumber plant as oviposition substrate and one of the supplemental foods. After removing the female, the laid eggs were counted under a stereomicroscope. A total of 10 females were evaluated for each food source. Cages with plants but without supplemental food were used as controls.

Experiment 3. Five to 7 days old females were individually weighted on a Sartorius Analytic A200s precision balance (precision 0.001 g) (Sartorius, Goettingen, Germany) and afterwards isolated during 3 days in plastic ventilated cages (7.5 cm diameter, 4.7 cm high) with a water dispenser, a piece of green bean pod with both ends sealed with hot paraffin to prevent desiccation, and one of the supplemental foods. After that period of time, females were weighed again and dissected by removing and cutting their abdomen on the left side in Ringer's solution. The ovaries were observed under a stereomicroscope and the number of chorionated oocytes was recorded following the classification by Ma and Ramaswamy (1987). Females in cages with water and the green bean pod but without supplemental food were used as controls. Eighteen females were measured for each treatment.

### **2.2 Effect of supplemental food provision frequency on female longevity**

The above mentioned experiment 1 was repeated with no food replacement three times a week but only provided once at the beginning of the experiment without any additional change.

### **2.3 Data analysis**

A one-way ANOVA was used to determine differences in longevity, fecundity, number of chorionated oocytes and weight of females among treatments; means were separated with Tukey's test ( $P < 0.05$ ). To evaluate the effect of food supply frequency on female longevity the ratio of the longevity of fed females to that of control females (receiving water only) was calculated. Differences in longevity ratio between the two food supply frequencies tested were analyzed using a two-tailed t test ( $P < 0.05$ ). In all analysis, data were transformed by SQRT ( $x +$

0.5) or  $\log(x+1)$  when necessary to homogenize variances. All data were statistically analyzed using SAS Enterprise Guide 4 (SAS 2006).

### 3 Results

#### 3.1 Effect of supplemental foods on female longevity, reproduction and weight

The longevity of *O. laevigatus* females was significantly affected by the supplemental food provided (Figure 1.1A). The longevity of *O. laevigatus* females fed on pollen was not significantly different from that of individuals fed on *E. kuehniella* ( $F_{3, 38} = 21.91$ ;  $P < 0.001$ ), whereas individuals provided with *Artemia* sp. dry cysts or with no food had significantly lower longevity.

Weekly fecundity on cucumber plant was significantly affected by the food supplied to *O. laevigatus* females (Figure 1.1B;  $F_{3, 39} = 13.81$ ;  $P < 0.001$ ). Females fed on *E. kuehniella* eggs or dry *Artemia* sp. cysts laid significantly more eggs than females receiving no food other than the cucumber plant. *Ephestia kuehniella* eggs were also significantly better than pollen in terms of fecundity. *Orius laevigatus* females gained significantly more weight when fed on *E. kuehniella* eggs than when fed on pollen or had no supplemental food available except for a piece of green bean pod (control) (Figure 1.1C;  $F_{3, 71} = 6.00$ ;  $P = 0.001$ ). These two treatments resulted in a weight loss. Females fed on dry *Artemia* sp. cysts had an intermediate weight gain.

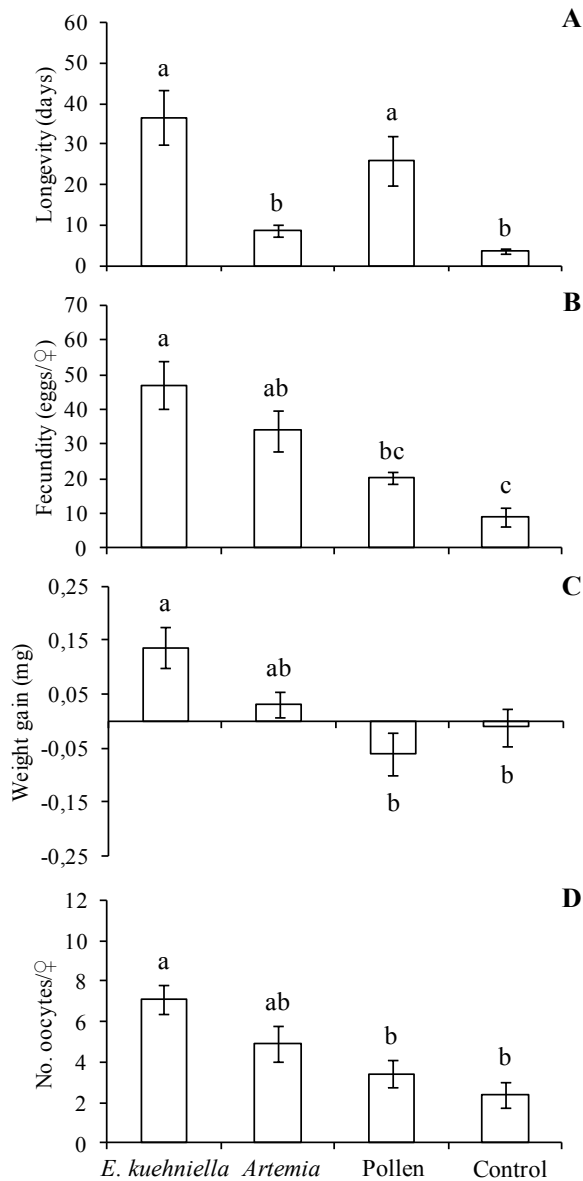
Supplemental food provided to the *O. laevigatus* females during 3 days had significant effect on the number of chorionated oocytes they had in their abdomen (Figure 1.1D;  $F_{3, 71} = 7.83$ ;  $P = 0.001$ ). Females fed on *E. kuehniella* eggs had significantly more chorionated oocytes than those fed on pollen or control ones. When dry *Artemia* sp. cysts were used as supplemental food, *O. laevigatus* females had an intermediate number of chorionated oocytes.



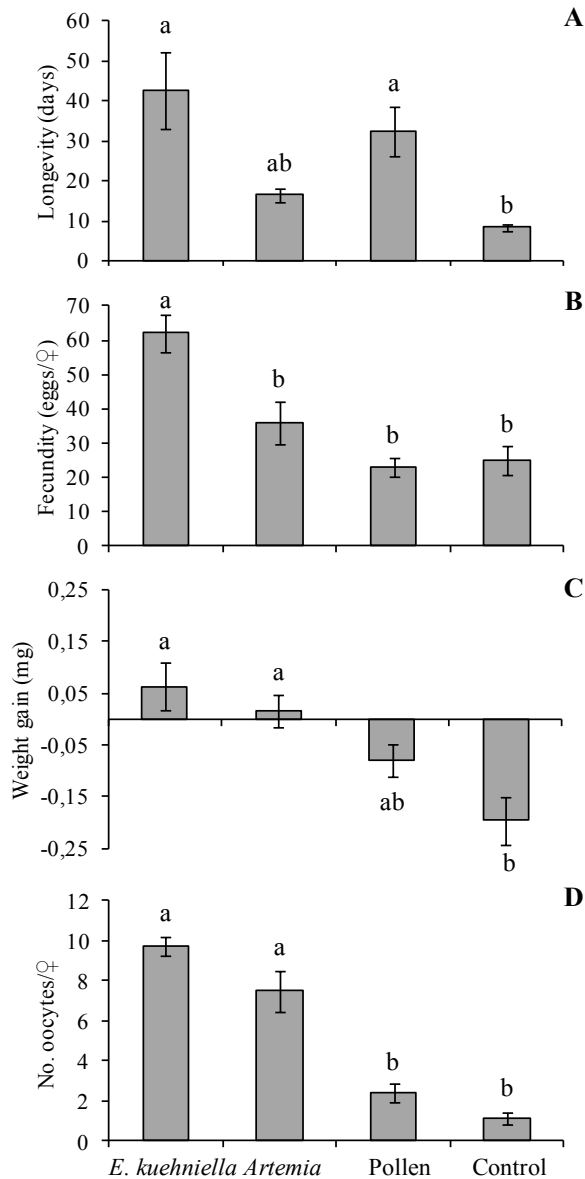
The longevity of *O. majusculus* females fed on *E. kuehniella* eggs or pollen was significantly higher than that of females receiving no food but only water (Figure 1.2A;  $F_{3, 37} = 7.93$ ;  $P = 0.004$ ), whereas individuals provided with *Artemia* sp. dry cysts had an intermediate longevity.

The fecundity of *O. majusculus* females on cucumber plant was significantly affected by the food supply (Figure 1.2B). Females fed on *E. kuehniella* eggs laid significantly more eggs than females receiving dry *Artemia* sp. cysts, pollen or no supplemental food other than the cucumber plant ( $F_{3, 39} = 13.61$ ;  $P < 0.001$ ). Feeding *O. majusculus* females with different supplemental foods during 3 days also resulted in differences in weight gain (Figure 1.2C). Females fed on *E. kuehniella* or on dry *Artemia* sp. cysts eggs were heavier than females that received no supplemental food (control) ( $F_{3, 71} = 8.60$ ;  $P < 0.001$ ). Similarly, *O. laevigatus* female control individuals and those fed on pollen lost weight within 3 days of the experiment.

The number of chorionated oocytes in the abdomen of *O. majusculus* females that were fed during 3 days with *E. kuehniella* eggs or dry *Artemia* sp. cysts than was significantly higher than in those receiving pollen as food or in control females receiving only water and a piece of a green bean pod (Figure 1.2D;  $F_{3, 71} = 41.38$ ;  $P < 0.001$ ).



**Figure 1.1.** Mean ( $\pm$  SE) longevity (A), weekly fecundity (B), weight gain (C), and number of chorionated oocytes (D) of *O. laevigatus* females fed on different supplemental foods (see text for number of replicas and details). Control insects had always water available. They had also access to a small cucumber plant to evaluate fecundity (graph B) and to a piece of green bean pod to evaluate the weight gain (graph C) and the number of oocytes/female (graph D). Bars with the same letter do not differ significantly (Tukey's test,  $P < 0.05$ ). Number of replicas were for longevity and fertility  $n = 10$  (except longevity *E. kuehniella* = 9); and for oocyte and weight  $n = 18$ .



**Figure 1.2.** Mean ( $\pm$  SE) longevity (A), weekly fecundity (B), weight gain (C), and number of chorionated oocytes (D) of *O. majusculus* females fed on different supplemental foods (see text for number of replicas details). Control insects had always water available. They had also access to a small cucumber plant to evaluate fecundity (graph B) and to a piece of green bean pod to evaluate the weight gain (graph C) and the number of oocytes/female (graph D). Bars with the same letter do not differ significantly (Tukey's test,  $P < 0.05$ ). Number of replicas were for longevity and fertility  $n = 10$  (except longevity *E. kuehniella* = 9); and for oocyte and weight  $n = 18$ .

### 3.2 Effect of supplemental food provision frequency on female longevity

When we analyzed the effect of food supply frequency on *O. laevigatus* female longevity (Table 1.1), we realized that no significant effect was detected for *E. kuehniella* eggs and dry *Artemia* sp. cysts. However, female longevity was significantly longer when individuals were supplied with new dry bee pollen three times a week compared to a single provision at the start of the experiment. When food was provided only once, longevity was significantly longer for females fed on *E. kuehniella* eggs but no significant difference in longevity was found for females fed on dry *Artemia* sp. cysts and pollen ( $F_{2,28} = 7.98$ ;  $P = 0.002$ ).

In contrast, no significant effect of food supply frequency to *O. majusculus* females was found for any of the tested supplemental foods (Table 1.2). Furthermore, no significant differences were found in the longevity of *O. majusculus* females fed with any of the 3 supplemental foods provided only at the beginning of the trial ( $F_{2,29} = 1.63$ ;  $P = 0.214$ ).

**Table 1.1.** Effect of the frequency of food supply on the longevity of *O. laevigatus* measured as the ratio of longevity of females in each treatment and control females (receiving water only). Number of replicates were  $N = 10$ , except for \* ( $N = 9$ ).

Supplemental food	Food supply frequency		Statistics		
	3 times/week	Only once	<i>t</i>	df	<i>P</i>
<i>E. kuehniella</i>	9.65 ± 1.76*	6.18 ± 0.94 a	1.79	17	0.092
<i>Artemia</i> cysts	2.29 ± 0.39	2.37 ± 0.67* b	-0.10	17	0.918
Pollen	6.82 ± 1.61	2.82 ± 0.55 b	2.51	18	0.022

Means within a column followed by different letters do not differ significantly (Tukey's test,  $P < 0.05$ ). Two-tailed *t* test ( $P < 0.05$ ) was calculated to indicate the differences between the two food supply frequencies (3 times/week or only once).

**Table 1.2.** Effect of the frequency of food supply on the longevity of *O. majusculus* measured as the ratio of longevity of females in each treatment and control females (receiving water only). Number of replicates were N = 10, except for \* (N = 8).

Supplemental food	Food supply frequency		Statistics		
	3 times/week	Only once	<i>t</i>	df	<i>P</i>
<i>E. kuehniella</i>	5.09 ± 1.15*	2.73 ± 0.40	-1.49	16	0.156
<i>Artemia</i> cysts	1.96 ± 0.22	1.93 ± 0.31	-0.09	18	0.926
Pollen	3.87 ± 0.75	2.05 ± 0.29	-1.84	18	0.082

Means within a column followed by different letters do not differ significantly (Tukey's test,  $P < 0.05$ ). Two-tailed *t* test ( $P < 0.05$ ) was calculated to indicate the differences between the two food supply frequencies (3 times/week or only once).

#### 4 Discussion

Successful establishment of natural enemies in a crop relies mostly on the ability of the released organisms to multiply (Eilenberg et al. 2001) and, consequently, the fecundity and longevity of the parental generation is critical. Food availability is decisive in enhancing longevity and, especially, the reproduction of released adults. In this respect, (Arijs and De Clercq 2004; Bonte and De Clercq 2008) showed that the nourishment of adults has a greater impact on the reproductive parameters of *O. laevigatus* than the diet provided to the nymphs.

Our results showed that *O. laevigatus* and *O. majusculus* could live and reproduce when water and plant tissues but not other foods are available. However, under those circumstances survival and fecundity values were low, more so for *O. laevigatus* than for *O. majusculus* (longevity of 3.8 days vs. 8.4, and weekly fecundity of 9.2 vs. 24.9, respectively). According to the results obtained in the present study, the addition of *E. kuehniella* eggs as a supplemental food three times a week resulted in the highest numerical values of survival, fecundity, number of

chorionated oocytes and weight gain for both *O. laevigatus* and *O. majusculus* females. The high quality of *E. kuehniella* eggs as factitious prey for different *Orius* species has been reported in numerous papers and, in some of them, it has been demonstrated that predators perform even better when fed on this factitious prey than when fed on natural prey (Cocuzza et al. 1997a; Kakimoto et al. 2005; Bonte and De Clercq 2008; Sobhy et al. 2010). Unlike *E. kuehniella* eggs, neither of the other two foods that we tested had an effect on both survival and reproduction.

Supplying dry bee pollen three times a week to *O. majusculus* and *O. laevigatus* females enhanced their longevity to a similar level as when fed on *E. kuehniella* eggs; consequently, it may be useful for extending the lifespan of released individuals on a crop in case of prey shortage. However, it was not an appropriate supplemental food to enhance reproduction of these two predator species, since the number of eggs laid and number of chorionated oocytes were similar to values in control females without supplemental food. Our results agree with those of other authors. Cocuzza et al. (1997a) showed a positive effect of bee pollen on adult longevity for *O. laevigatus* but not for *O. albidipennis*. Bonte et al. (2012) and Cocuzza et al. (1997a) have shown that the fecundity of *O. laevigatus*, *O. albidipennis*, *O. thripoborus* and *O. naivashae* was lower when females were fed on bee pollen than when fed on *E. kuehniella* eggs.

Dry *Artemia* sp. cysts supplied three times a week did not enhance the longevity of females of either *Orius* species compared to the insects that did not receive supplemental food and had only water and a piece of green bean pod available. In contrast, this supplemental food did have an effect on reproduction. It enhanced the fecundity of *O. laevigatus* and oocyte maturation and weight in *O. majusculus*. The results obtained regarding longevity do not fully agree with those reported by other authors. Arijs and De Clercq (2001) and Bonte and De Clercq

(2008) reported the longevity of *O. laevigatus* adults fed daily both as adults and nymphs on hydrated decapsulated cysts of *A. franciscana* was similar to the longevity of those fed on *E. kuehniella* eggs. The observed differences might be because, in our study, adults fed with dry *Artemia* sp. cysts were reared as nymphs on *E. kuehniella* eggs, whereas in the above-mentioned studies both adults and nymphs were fed with *A. franciscana* cysts. Another reason might be the different form of the *Artemia* sp. cysts (dry vs. hydrated and decapsulated), or differences in the nutritional composition of cysts from different origins (Léger et al. 1986). Several studies in the literature have reported *Artemia* sp. cysts to be a suitable food for *O. laevigatus* reproduction. Arijs and De Clercq (2001) and Bonte and De Clercq (2008) demonstrated that *Artemia* sp. cysts supplied hydrated and decapsulated on a daily basis have the same effect on its fecundity and oocyte number as *E. kuehniella* eggs.

Overall, feeding on *Artemia* sp. cysts produced a similar effect on the reproduction of both *Orius* species compared to feeding on *E. kuehniella* eggs, whereas pollen was a good alternative to lepidopteran eggs when considering longevity but not in enhancing reproduction. These differences might be related to biochemical differences among the foods used in our experiments. According to De Clercq et al. (2005), the main nutrient in *Artemia* sp. cysts and *E. kuehniella* eggs is protein (53% vs. 37% dry matter, respectively). In addition, moth eggs contain about twice as much fat as *Artemia* sp. cysts (28% vs. 15% dry matter), but a similar amount of carbohydrates (10% to 11% dry matter). In contrast, bee pollen contains mainly carbohydrates (70–84%), less than 50% protein and only 3% lipids (Nogueira et al. 2012). Since proteins and lipids are the most important nutrients for reproduction (Ferkovich and Shapiro 2004; Barry and Wilder 2012), whereas carbohydrates are crucial for survival and dispersal (Pumariño et al. 2012), differences in nutrient composition might explain the better reproductive

performance of predators fed on *Artemia* sp. cysts and the longer lifespans of predators fed on pollen.

Although it is relatively easy to feed predators when they are released, either adding food onto seedlings before transplant or at the release points, providing food after crop establishment and when predators have started to disperse might be fairly complex and inefficient. Because of this, an important aspect is whether or not providing the supplemental food regularly is essential to enhance predator establishment. Our study indicated that the enhancement of *O. laevigatus* and *O. majusculus* longevity obtained by providing *E. kuehniella* eggs or dry *Artemia* sp. cysts only once was similar to that obtained when each food was provided regularly (three times week). However, it was much more favorable for *O. laevigatus* longevity to provide dry bee pollen three times a week rather than only once, but not in the case of *O. majusculus*. If multiple provisions of supplemental food are not possible, adding dry *Artemia* sp. cysts to the crop might still be sufficient to enhance reproduction and survival to some extent. With this frequency of nourishment, and contrary to what happened when food was supplied three times per week, pollen was not more advantageous than dry *Artemia* sp. cysts in terms of longevity enhancement. The reason for this might be better conservation of the dry *Artemia* sp. cysts spread onto the plant, since they develop less mold (authors personal observation) and can be used as food for a longer period due to the reversibility of the hydration process (Morris 1971). In addition, dry *Artemia* sp. cysts are easier to handle (Castañé et al. 2006b) than when hydrated and decapsulated. More studies are necessary to determine an intermediate frequency of food supply that maximizes profits while reducing costs.

In summary, dry *Artemia* sp. cysts and commercial dry bee pollen might be an alternative to *E. kuehniella* eggs to enhance predator establishment in crops if these supplemental foods are provided regularly. *Artemia* sp. cysts enhanced



reproduction and pollen enhance longevity in both predatory species. It is likely that providing pollen and dry *Artemia* sp. cysts together could offer a source of nutrients that would improve both the survival and reproduction of insects on crops when prey is not available. If this frequency of nourishment is not feasible, and food can be only provided once when predators are released, adding dry *Artemia* sp. cysts to the crop might be sufficient to enhance reproduction and survival to some extent. Moreover, the addition of bee pollen to the crop might increase thrips populations (Hulshof et al. 2003). Van Rijn and Tanigoshi (1999) showed that adding pollen in greenhouses caused the population of predatory mites to increase more rapidly than that of thrips. Therefore, it will be necessary to determine the effect of *E. kuehniella* eggs, *Artemia* sp. cysts and pollen on pests such as *F. occidentalis*, which is an opportunistic predator (Wilson et al. 1996).

# 2

## The effect of supplemental foods in establishment of predatory Heteroptera in vegetable crops.



Ninfa de *N. tenuis*

### 1 Introduction

The polyphagous predators *Macrolophus pygmaeus* Rambur and *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Hemiptera: Miridae), are important biological control agents of major pest in vegetable crops, such as of whiteflies, thrips, Lepidoptera and other, (Riudavets and Castañé 1998; Arnó et al. 2003; Urbaneja et al. 2009; Arnó et al. 2010b; Urbaneja et al. 2012). They are released in inoculative programs but also used in conservation biocontrol strategies that take advantage of spontaneous crop colonization (Castañé et al. 1999; van Lenteren and Martin 1999; Carnero et al. 2000; Gabarra et al. 2004; Arnó et al. 2010b). Both species are zoophytophagous; that is to say, their immature and adult forms can feed on prey and on plant. Phytophagous habits of some predatory Heteroptera include tissue-plant feeding (Alomar and Wiedenmann 1996; Coll and Ruberson 1998; Eubanks and Styrsky 2005; Perdakis and Alomar 2011). This feeding is a water and nutrient resource, including carbohydrates, for predators (Gillespie and McGregor 2000). Although plant food is nutritionally poor for predators due to its relative lack of protein (Yong 2003), *M. pygmaeus* can complete nymphal development and reproduce at low levels when only feed on plant leaves and stems (Vandekerkhove et al. 2006; Lykouressis et al. 2008).

The success of biological control programs is related to the early establishment of natural enemies in the crop during a period in which there is usually little or no prey present. This early establishment can be enhanced by the addition of supplemental foods. These foods are intended to provide predators with nutrients that they cannot obtain from plants and to improve its individual fitness. As a consequence, predator density in the crop increase, thus enhancing pest control (Wade et al. 2008a). *Macrolophus pygmaeus* and *N. tenuis* may take several weeks until establish in the crop, to compensate for this delay, during this time is recommended to provide the predators with eggs of *Ephestia kuehniella* Zeller

(Lepidoptera: Pyralidae) (Lenfant et al. 2000), because they are considered a high quality food, used in commercial mass rearing. The efficacy of *E. kuehniella* eggs as “factitious prey” for many polyphagous predatory insects has been demonstrated in numerous studies and in some of them it has been even shown that these predators perform better than when fed on natural prey (Riddick 2009). However, the use of *E. kuehniella* eggs as supplemental food is expensive and this limits greatly its use (Arijs and De Clercq 2001). Several studies have been carried out to find an alternative food to *E. kuehniella* eggs. *Artemia* sp. cysts has been shown to be a good alternative food for rearing *M. pygmaeus* and its consumption allows preimaginal development and reproduction of the predator (Castañé et al. 2006b; Vandekerkhove et al. 2009). Pollen would be another possible alternative food to improve the fitness of *M. pygmaeus* and *N. tenuis*. Although pollinivory research has focused almost exclusively on anthocorids, several studies have shown that pollen can improve some biological parameters of *M. pygmaeus* (Perdikis and Lykouressis 2000; Maleki et al. 2006; Vandekerkhove and De Clercq 2010).

The objective of the present study was to evaluate the effect of three supplemental foods, *E. kuehniella* eggs, dry *Artemia* sp. cysts, and dry commercial bee pollen on longevity, fertility, chorionated oocytes load, and weight gain of *M. pygmaeus* and *N. tenuis*. We have also analysed how food supply frequency affected predator longevity.

## 2 Materials and Methods

Cucumber plants (cv. Makerter F1, Fitó<sup>®</sup>) were grown from seeds and kept free of herbivores in an insect-proof cage until the first true leaf expanded (approximately two weeks).

*Macrolophus pygmaeus* and *N. tenuis* individuals were obtained from laboratory colonies reared on tobacco plants with *E. kuehniella* eggs as prey as

described in Agustí & Gabarra (2009). Rearings were initiated using individuals collected on tomato crops near Barcelona (Spain).

Three supplemental foods were tested: 1) *E. kuehniella* eggs, provided by Biotop<sup>®</sup> (Vallbone, France) and kept in the freezer at -20 °C until use; 2) finely ground pellets of dry commercial multifloral bee pollen (Mielar S.A, Barcelona, Spain); and 3) dry cysts of *Artemia* sp. with a high unsaturated fatty acid content, from Asiatic lakes, provided by INVE Animal Health S.A. (Dendermonde, Belgium). Foods were always supplied *ad libitum* glued onto 1cm<sup>2</sup> area of a Post-it<sup>®</sup> and renewed three times a week, unless another frequency is indicated (see section 2.2).

All experiments were conducted in climate chambers at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 20\%$  RH and under 16:8 h (light: dark) photoperiod.

### **2.1 Effect of a supplemental foods on female longevity and reproduction**

Experiment 1. To evaluate predator longevity, pairs of less than 72 h old females were isolated in ventilated plastic cages (9 cm diameter, 11 cm high) with a water dispenser and a piece of crumpled paper to provide hiding places and avoiding cannibalism. In each cage one of the tested supplemental foods was supplied. Six to 10 females of *M. pygmaeus* and *N. tenuis* were fed with each supplemental food and females in cages with water but without supplemental food were used as controls. Survival was monitored on a daily basis until predators died.

Experiment 2. To measure the effect on fertility, 7 – 14 day old females that have already passed their preoviposition period were used. Each female was isolated for seven days in a ventilated plastic cage (11.5 cm diameter, 21 cm high) with a cucumber plant as oviposition substrate and one of the supplemental foods. After removing the female, plant was incubated in the climatic chamber until the nymph emergence. Egg hatching was considered ended when no nymphs emerged

during three consecutive days. A total of 10 females were evaluated for each food source. Cages with plants but without supplemental food were used as controls.

Experiment 3. Seven to nine days old females were individually weighted on a Sartorius Analytic A200s precision balance (precision 0.001 g) (Sartorius, Goettingen, Germany) and afterwards isolated during three days in plastic ventilated cages (7.5 cm diameter, 4.7 cm high) with a water dispenser, a piece of green bean pod with both ends sealed with hot paraffin to prevent desiccation, and one of the supplemental tested foods. After that period of time, females were weighed again and dissected by removing and cutting their abdomen on the left side in Ringer's solution. The ovaries were observed under a stereomicroscope and the number of chorionated oocytes was recorded following the classification by Ma and Ramaswamy, (1987). Females in cages with water and the green bean pod but without supplemental food were used as controls. Eighteen females were measured for each treatment.

### **2.2 Effect of food supply frequency on female longevity**

The above mentioned experiment 1 was repeated with no food replacement three times a week but with food being only provided once at the beginning of the experiment without any additional change.

### **2.3 Data analysis**

A one-way ANOVA was used to determine differences in longevity, fecundity, number of chorionated oocytes and weight gain of females among treatments; means were separated with Tukey's test ( $P < 0.05$ ). To evaluate the effect of food supply frequency on female longevity the ratio of longevity of females fed to that of control females (receiving water only) was calculated.

Differences in the longevity ratio between the two food supply frequencies tested were analyzed using a two-tailed t test ( $P < 0.05$ ). In all analysis, data were transformed by SQRT ( $x + 0.5$ ) or log ( $x+1$ ) when necessary to homogenize variances. All data were statistically analyzed using SAS Enterprise Guide 4 (SAS Institute, 2006–2008).

### 3 Results

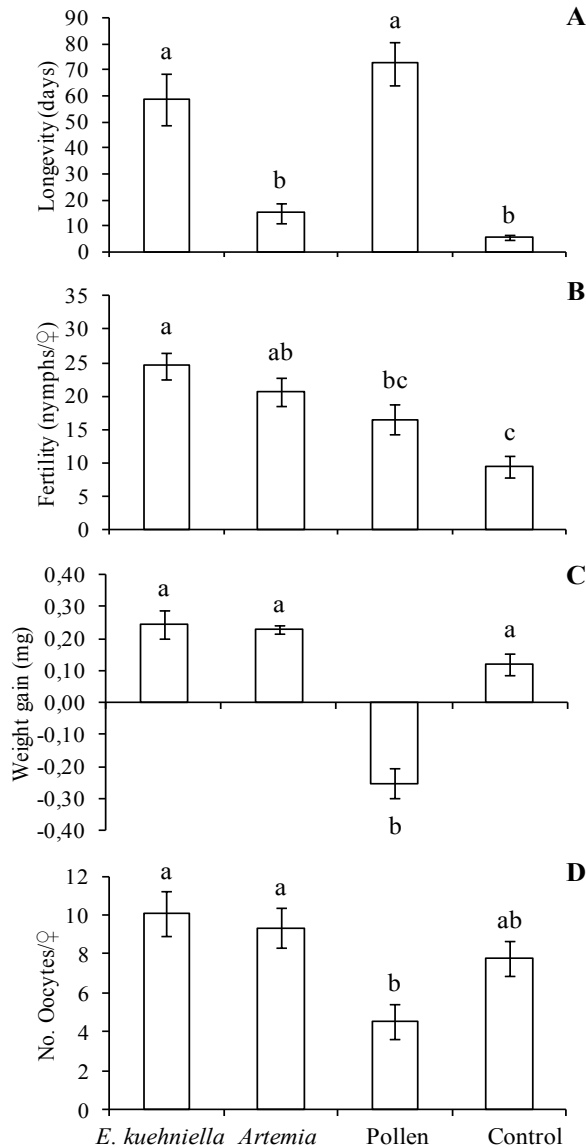
#### 3.1 Effect of a supplemental foods on female longevity and reproduction

Longevity of *M. pygmaeus* females was significantly affected by supplemental food (Figure 2.1A). Provision of *E. kuehniella* eggs and dry bee pollen resulted in a significantly longer lifespan than provision of dry *Artemia* sp. cysts or no food other than water ( $F_{3, 35} = 37.14$ ;  $P < 0.001$ ). *Macrolophus pygmaeus* fertility on cucumber plant was also significantly affected by the food supplied to females (Figure 2.1B;  $F_{3, 39} = 9.89$ ;  $P < 0.001$ ). The offspring of females fed on *E. kuehniella* eggs was significantly greater than those fed on dry bee pollen and on control females. Females fed on dry *Artemia* sp. cysts had an intermediate fertility value. *Macrolophus pygmaeus* females gained significantly similar weight when fed on *E. kuehniella* eggs, on dry *Artemia* sp. cysts, and on green bean pod (control) (Figure 2.1C;  $F_{3, 71} = 26.92$ ;  $P < 0.001$ ). Conversely, females fed on pollen lost weight. Supplemental food provided to the *M. pygmaeus* females during three days had a significant effect on the number of chorionated oocytes they had in their abdomen (Figure 2.1D;  $F_{3, 71} = 6.10$ ;  $P = 0.001$ ). Females fed on *E. kuehniella* eggs and dry *Artemia* sp. cysts had significantly more chorionated oocytes than those fed on pollen, whereas control females with no food other than a piece of green bean pod had an intermediate chorionated oocyte load.

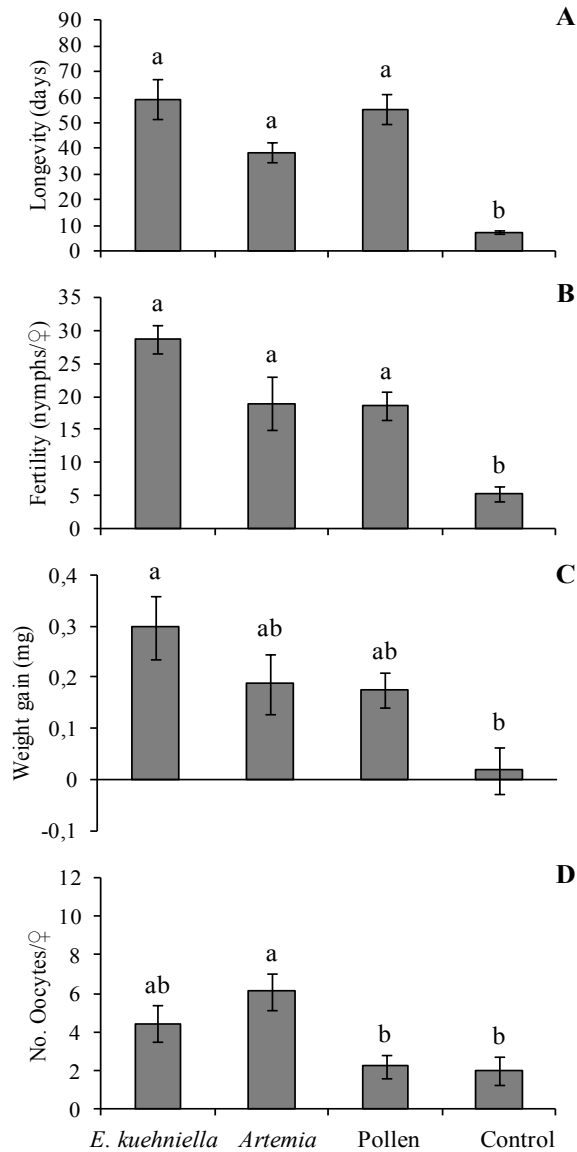
Longevity and fertility of *N. tenuis* females fed on supplemental food were significantly higher than those females receiving no food but only water

(Longevity: Figure 2.2A;  $F_{3, 34} = 77.5$ ;  $P < 0.001$ ; Fertility: Figure 2.2B;  $F_{3, 39} = 16.74$ ;  $P < 0.001$ ). There were no significant differences between the three supplemental foods tested. Feeding *N. tenuis* females with different supplemental foods during three days resulted in different weight gain (Figure 2.2C;  $F_{3, 71} = 4.64$ ;  $P = 0.005$ ). Females fed on *E. kuehniella* eggs gain more weight than control females that received no food. When females fed on dry *Artemia* sp. cysts or pollen had an intermediate weight gain. Number of chorionated oocytes was significantly higher in the abdomen of *N. tenuis* females that were fed during 3 days with dry *Artemia* sp. cysts than in those of females fed on pollen or in control females receiving only a piece of green bean pod (Figure 2.2D;  $F_{3, 71} = 5.74$ ;  $P = 0.001$ ). Females fed on *E. kuehniella* eggs had an intermediate number of chorionated oocytes.





**Figure 2.1.** Mean ( $\pm$ SE) longevity (A), weekly fertility (B), weight gain (C) and number of chorionated oocytes (D) of *M. pygmaeus* females fed on different supplemental foods (see text for number of replicas and details). Control insects always had water available. They had also access to a small cucumber plant to evaluate fertility (graph B) and to a piece of green bean pod to evaluate the weight gain (graph C) and the number of oocytes/female (graph D). Bars with the same letter do not differ significantly (Tukey's test,  $P < 0.05$ ). Number of replicas were for longevity and fertility  $n = 10$  (except longevity *E. kuehniella*  $n = 6$ , and pollen  $n = 9$ ); and for oocytes and weight  $n = 18$ .



**Figure 2.2.** Mean ( $\pm$ SE) longevity (A), weekly fertility (B), weight gain (C) and number of chorionated oocytes (D) of *N. tenuis* females fed on different supplemental foods (see text for number of replicas and details). Control insects had always water available. They had also access to a small cucumber plant to evaluate fertility (graph B) and to a piece of green bean pod to evaluate the weight gain (graph C) and the number of oocytes/female (graph D). Bars with the same letter do not differ significantly (Tukey's test,  $P < 0.05$ ). Number of replicas were for longevity and fertility  $n = 10$  (except longevity *E. kuehniella*  $n = 7$ ), and for oocytes and weight  $n = 18$ .

### 3.2 Effect of food supply frequency on female longevity

When we analyzed the effect of food supply frequency on *M. pygmaeus* female longevity ratio (Table 2.1), we realized that it was significantly greater for individuals receiving three times a week new *E. kuehniella* eggs and new dry bee pollen than for those receiving food only once at the beginning of the experiment. In contrast, the ratio was not significantly different when supplied food was dry *Artemia* sp. cysts. When food was provided three times a week, longevity ratio was significantly higher when fed on *E. kuehniella* and pollen than when fed on dry *Artemia* sp. cysts ( $F_{2, 25} = 19.24$ ;  $P < 0.0001$ ), but when food was provided only once no significant differences were found (Table 2.1;  $F_{2, 29} = 1.17$ ;  $P = 0.327$ ).

On the other hand, the food supply frequency had also some effect in *N. tenuis* longevity (Table 2.2). Longevity ratios were, in all the cases, significantly greater when food was supplied three times a week. When food was provided only once, higher longevity ratios were obtained for females fed on *E. kuehniella* eggs than for those fed on the other two foods ( $F_{2, 29} = 12.22$ ;  $P < 0.0001$ ), but no significant differences were found among dry *Artemia* sp. cysts and dry bee pollen. No significant differences were found in the longevity ratio of *N. tenuis* females fed with any of the three supplemental foods provided three times a week ( $F_{2, 24} = 3.55$ ;  $P = 0.046$ ).

**Table 2.1.** Effect of the frequency of food supply on the longevity *M. pygmaeus* measured as the ratio of longevity of females in each treatment and control females (receiving water only). Number of replicas were n = 10, except for <sup>1</sup> (n = 7) and <sup>2</sup> (n = 9).

Supplemental food	Longevity		Statics		
	3 times / week	Only once	<i>t</i>	df	<i>P</i>
<i>E. kuehniella</i>	10.12 ± 1.69 <sup>1</sup> a	3.93 ± 1.28	2.97	15	0.009
<i>Artemia</i> cysts	2.62 ± 0.64 b	1.91 ± 0.40	0.93	18	0.364
Pollen	12.51 ± 1.42 <sup>2</sup> a	3.88 ± 0.86	5.34	17	<0.001

Means within a column followed by different letters do not differ significantly (Tukey's test,  $P < 0.05$ ). Two-tailed t test ( $P < 0.05$ ) was calculated to indicate the differences between the two food supply frequencies (3 times/week or only once).

**Table2.2.** Effect of the frequency of food supply on the longevity of *N. tenuis* measured as the ratio of longevity of females in each treatment and control females (receiving water only). Number of replicas were n = 10, except for <sup>1</sup> (n = 9) and <sup>2</sup> (n = 6).

Supplemental food	Longevity		Statics		
	3 times / week	Only once	<i>t</i>	df	<i>P</i>
<i>E. kuehniella</i>	7.89 ± 1.04 <sup>2</sup>	4.41 ± 0.17 a	4.26	14	0.001
<i>Artemia</i> cysts	5.14 ± 0.51 <sup>1</sup>	2.81 ± 0.44 b	3.38	17	0.004
Pollen	7.40 ± 0.79	2.55 ± 0.17 b	6.01	18	<0.001

Means within a column followed by different letters do not differ significantly (Tukey's test,  $P < 0.05$ ). Two-tailed t test ( $P < 0.05$ ) was calculated to indicate the differences between the two food supply frequencies (3 times/week or only once).

#### 4 Discussion

*Macrolophus pygmaeus* and *N. tenuis* are widely used in augmentative biological control programs in the Mediterranean Basin where natural populations are abundant (Goula and Alomar 1994; Alomar et al. 2002; Sanchez et al. 2003;

Castañé et al. 2004). One of the main drawbacks for their effective use is their slow establishment in the crop, especially, when prey is scarce (Lenfant et al. 2000; Castañé et al. 2006a). Our results showed that females of both species are able to live during a short period of time with water alone and to reproduce on plant when prey is not available. Other authors have demonstrated that *M. pygmaeus* females may survive and reproduce in the absence of prey but feeding only on plant (Perdikis and Lykouressis 2004; Portillo et al. 2012). However, our results and those by Castañé et al. (2006b), Vandekerkhove et al. (2009) and Portillo et al. (2012), for *M. pygmaeus*, showed that when *E. kuehniella* eggs were regularly provided to both, *M. pygmaeus* and *N. tenuis* females, survival and reproduction of predator greatly increases. This suggests that plant material is nutritionally poor for these predators.

*Artemia* sp. cysts supplied three times a week increased the reproduction of *M. pygmaeus*; both fertility and chorionated oocyte load, but had no positive effect on its longevity. Other authors have reported that reproductive parameters of *M. pygmaeus* reared from first instar to adults with *Artemia* sp. cysts were similar to those reared on *E. kuehniella* eggs (Castañé et al., 2006b; Vandekerkhove et al., 2009). In contrast, commercial bee pollen improved the longevity of *M. pygmaeus* to similar levels than *E. kuehniella* eggs but had no effect on predator reproduction. Although *M. pygmaeus* is not considered a facultative pollen feeder, as other predators such as *Orius* spp., several studies have demonstrated that pollen has value as a food source for this predator. It supports nymphal development and clearly supplements a suboptimal diet of few *E. kuehniella* eggs (Perdikis and Lykouressis 2000; Vandekerkhove and De Clercq 2010). In addition, Portillo et al. (2012) reported that cattail pollen doubles the longevity of *M. pygmaeus* in broad bean plants. These differences between the effect of dry *Artemia* sp. cysts and dry bee pollen on *M. pygmaeus* biology are probably linked to their gross nutrient

composition. According to De Clercq et al. (2005), *Artemia* sp. cysts contain mainly protein and fat (53% and 28% of the dry matter, respectively) and much less carbohydrates (10%). In contrast, bee pollen contains mainly carbohydrates (70–84%), less than 50% protein and only 3% lipids (Nogueira et al. 2012). Since proteins and lipids are the most important nutrients for reproduction (Ferkovich and Shapiro 2004; Barry and Wilder 2012), whereas carbohydrates are crucial for survival and dispersal (Pumariño et al. 2012), differences in nutrient composition might explain the better reproductive performance of *M. pygmaeus* fed on *Artemia* sp. cysts and the longer lifespan of predators fed on pollen. However, our results also point out that carbohydrates cannot be solely responsible for the survival differences between predators fed on dry *Artemia* sp. cysts and *E. kuehniella* eggs, because carbohydrate content in both supplemental foods are very similar. Thus, other nutrients differently present in *Artemia* sp. cysts and in *E. kuehniella* eggs must have a strong influence in *M. pygmaeus* survival.

Unlike to what was observed for *M. pygmaeus*, dry *Artemia* sp. cysts and commercial bee pollen had a positive effect on both *N. tenuis* survival and reproduction when supplied three times a week. They improved longevity, weekly fertility and weight gain of this predator up to similar levels than *E. kuehniella* eggs. Surprisingly, a food with low carbohydrate content as *Artemia* sp. cyst increases *N. tenuis* female longevity compared to control females that had access to water but not to plant tissue. Also, bee pollen that is high in carbohydrates but low in protein and fat enhanced reproduction. A similar trend was reported by Urbaneja-Bernat et al. (2012) who demonstrated that the addition of sucrose to a diet of *E. kuehniella* eggs increased fertility of *N. tenuis* females and reduced the number of *E. kuehniella* eggs consumed. Although several authors have suggested that plants are a suboptimal food source for *N. tenuis*, which is exploited more when arthropod prey become scarce (Urbaneja et al. 2005; Sánchez and Lacasa

2008; Sánchez et al. 2009), our results and those of Urbaneja-Bernat et al. (2012) suggest that this predator is well adapted to use carbohydrates, such as those in the phloem sap, to support reproduction. In addition, Arnó et al. (2010a) and Moreno-Ripoll et al. (2012) demonstrated that *N. tenuis* increased its feeding on plant when there is a shortage of prey, probably to obtain nutrients that they cannot obtain from animal prey.

Although it is feasible to feed predators at the time they are released in the nursery facilities or in the crop, it might be fairly complex and inefficient to feed them after they start to disperse. Because of this, an important question to elucidate is how imperative is to provide supplemental foods regularly. Our study indicated that providing any of the tested foods three times a week resulted in higher longevities than when food was supplied only once, except for *M. pygmaeus* fed on dry *Artemia* sp. cysts. If foods can be only supplied once, pollen would be a good alternative to *E. kuehniella* eggs to feed *M. pygmaeus* since longevity with both foods will be almost fourfold the longevity with water alone. In the case of *N. tenuis*, *E. kuehniella* eggs are clearly the best food that can be supplied even if it is done only at the time of release. Dry *Artemia* sp. cysts and pollen are a similar but worst alternative to this food in terms of longevity. However, dry *Artemia* sp. cysts spread onto the plant develop less mould than *E. kuehniella* eggs or pollen (authors personal observation), they probably can be used as food for a longer period due the reversibility of the hydration process (Morris 1971).

In summary, in our work we found two supplemental foods, dry *Artemia* sp. cysts and commercial bee pollen, which may be an alternative of *E. kuehniella* eggs to enhance establishment of predatory mirid bugs in the crop when pest populations are scarce. The addition of either dry *Artemia* sp. cysts or dry bee pollen may be useful to enhance *N. tenuis* reproduction and longevity if food can be provided regularly. However, since dry *Artemia* sp. cysts almost triples survival of control

insects without supplemental food and lasted longer than pollen, it may be the better alternative to *E. kuehniella* eggs when food can only be supplied once. On the other hand, dry cysts of *Artemia* sp. supplied regularly enhanced *M. pygmaeus* reproduction and pollen enhanced predator longevity. The effect of pollen on longevity remains higher than that of dry *Artemia* sp. cysts when food is provided only at the release time. Since none of these two foods alone will be enough to improve both reproduction and survival of this predatory bug, one alternative would be to supply both foods together to better establish *M. pygmaeus* in the crop. A possible drawback of using supplemental food in the crop is that it may also benefit the pest. Thrips, for example, were nutritionally favored by the addition of pollen on cucumber increasing fecundity and shortening development time (Hulshof et al. 2003). Further studies are needed under field conditions to determine the effect of these supplemental foods in both predators and pest. It will be also necessary to assess the optimal frequency of food supply in terms of cost-benefit.



# 3

**Efecto de la adición de alimento suplementario sobre la dispersión de los depredadores polífagos. Eficacia de *Orius majusculus* en el control de trips en cultivo de pepino de invernadero**



*O. majusculus* depredando larva de *F. occidentalis*

### 1 Introducción

Las principales plagas del cultivo de pepino en invernadero son la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) y el trips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) (Ramakers y O’Niell 1999; Calvo y Belda 2008). La primera, además de provocar importantes daños directos, como son el debilitamiento de la planta y la producción de melaza, produce graves daños indirectos al ser vector de varios virus en este cultivo (Calvo y Belda 2008). Por otro lado, *F. occidentalis* puede causar daños directos asociados a su alimentación y/o puesta en los frutos, provocando cicatrices, manchas plateadas, malformaciones y pérdidas de peso en frutos, que se traducen en pérdidas económicas (Rosenheim et al. 1990; Welter et al. 1990; Shipp et al. 2000).

Cuando se limitan los tratamientos insecticidas de amplio espectro este cultivo puede hospedar importantes poblaciones de enemigos naturales, entre las que destacan los depredadores antocóridos *Orius laevigatus* Fieber, *Orius majusculus* Reuter (Hemiptera: Anthocoridae) y el mírido *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hemiptera: Miridae) (Riudavets y Castañé 1998). Hasta hace poco, *M. pygmaeus* era identificado como *M. caliginosus* Wagner (= *M. melanotoma* (Costa)) y todavía es nombrado como *M. caliginosus* por los productores comerciales (Martínez-Cascales et al. 2006; Castañé et al. 2013). Las tres especies de depredadores son polípagas y se alimentan de los diferentes estados de desarrollo de *B. tabaci* y de *F. occidentalis* (Riudavets y Castañé 1998; Castañé et al. 1999; Arnó et al. 2010). *Orius laevigatus* y *M. pygmaeus* se crían comercialmente y se liberan en invernaderos comerciales para el control de trips y moscas blancas respectivamente (van Lenteren y Tommasini, 2003). Aunque actualmente *O. majusculus* no se produce comercialmente, sus poblaciones naturales pueden llegar a ser muy elevadas en cultivo de pepino de invernadero en el área mediterránea y

por tanto, podría ser un buen agente de control de esta plaga (Riudavets and Castañé 1998).

Uno de los inconvenientes del uso de depredadores en control biológico, es su lento establecimiento y desarrollo de las poblaciones en el cultivo. Por lo general y según la especie, pueden tardar varias semanas hasta que las poblaciones de los depredadores se desarrollan en unos niveles suficientemente elevados para controlar las plagas (Cocuzza et al. 1997a; Lenfant et al. 2000; Castañé et al. 2006a). Además, al inicio del cultivo, la disponibilidad de presa suele ser muy escasa, por lo que la aportación de alimento puede ser determinante para la instalación de los depredadores (Lenfant et al. 2000; Gabarra et al. 2004). Una de las prácticas que se realiza para mejorar esta instalación, es el suministro de alimentos suplementarios de origen vegetal y/o otros alimentos alternativos artificiales, como soluciones azucaradas o presas alternativas (van Rijn et al. 2002; Wade et al. 2008b; Put et al. 2012). En estudios previos se ha demostrado que los alimentos suplementarios tienen el potencial de mejorar la eficiencia de los enemigos naturales, y por tanto, de apoyar el control biológico de plagas (McMurtry y Scriven 1966; Hagen 1986; Van Rijn et al. 2002; Wäckers et al. 2005). El alimento seleccionado para aplicar en campo debería facilitar la inmigración de los enemigos naturales hacia las áreas infestadas de plaga, disuadir la emigración desde las zonas infestadas y mejorar la instalación del enemigo natural incrementando su fecundidad y supervivencia (Wade et al. 2008b). Una práctica habitual es el suministro de huevos de *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), ya que tienen un elevado valor nutricional y como se ha demostrado en los capítulos 1 y 2 de esta Tesis, mejora la longevidad y fecundidad de los depredadores en plantas de pepino. Así mismo, una aplicación uniforme de huevos de *E. kuehniella* en el cultivo del tomate logra una mejor dispersión e instalación del depredador *M. pygmaeus* (Put et al. 2012). Pero la utilización de

estos huevos supone un elevado coste de producción. Existen diferentes alimentos suplementarios que pueden utilizarse como sustitutos a los huevos de *E. kuehniella* y que pueden mejorar la reproducción y la supervivencia de los depredadores. Los cistos de *Artemia* sp. (Braquiopoda: Artemiidae) y el polen comercial de abeja, pueden incrementar la longevidad y la fecundidad tanto de *O. laevigatus* y *O. majusculus*, así como de *M. pygmaeus* y *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Hemiptera: Miridae) en pepino, y pueden ser una buena alternativa a los huevos de *E. kuehniella* (Capítulos 1 y 2 de esta Tesis). Otros autores han demostrado también que la adición de polen puede mejorar el control de *F. occidentalis* y *B. tabaci* con ácaros fitoseidos (van Rijn et al. 2002; Nomikou et al. 2010).

La dispersión y colonización del cultivo por parte de los depredadores también juega un papel importante en el éxito del control biológico. La colonización temprana de los cultivos por los depredadores se ha demostrado que es un elemento clave en su capacidad para suprimir las poblaciones plaga (Settle et al. 1996; Ives y Settle 1997; Landis y Werf 1997; Bianchi et al. 2009). En este punto, juegan un papel importante los compuestos volátiles que emiten las plantas a modo de defensa cuando son atacadas por los herbívoros y que son atractivos para los enemigos naturales (Pallini et al. 1997). Se ha demostrado que el éxito de la búsqueda y encuentro de la presa por el enemigo natural está asociado a la capacidad de este último, en reconocer los volátiles que emiten las plantas infestadas por las presas (Tumlinson et al. 1993; Dicke 1994). Uno de los posibles inconvenientes de la adición de alimentos suplementarios puede ser que los depredadores no abandonen la planta que contiene el alimento y por lo tanto que no se dispersen al cultivo, lo que sería contraproducente para el control de la plaga. Aunque se ha comprobado que este efecto realmente depende de la cantidad y calidad de alimento alternativo añadido (van Rijn et al. 2002).

La práctica habitual para el control de trips, en Europa y en la zona Mediterránea, es la inoculación de ácaros fitoseidos y de *O. laevigatus* (Chambers et al. 1993; Shipp et al. 2004; Messelink et al. 2006; Calvo y Belda 2008). Una ventaja de la utilización de *O. majusculus* frente a los ácaros fitoseidos, es que estos son más dependientes del polen que el antocórido. Esta cuestión es especialmente relevante si se tiene en cuenta que la mayoría de las variedades comerciales de pepino que se cultivan actualmente son ginoicos, es decir, solo producen flores femeninas, y por lo tanto no disponen de polen (Ramakers y O’Niell, 1999). Por otro lado, la utilización de *O. majusculus* también puede ser más favorable que la de *O. laevigatus* porque aunque las ninfas y los adultos de ambas especies de *Orius* consumen un número similar de larvas de *F. occidentalis* (Riudavets y Castañé, 1998), *O. laevigatus* se localiza más en las flores, mientras que *O. majusculus* se mantiene más en las hojas (Ramakers y O’Niell 1999). Este comportamiento puede ser importante dado que las larvas de *F. occidentalis* se encuentran mayoritariamente en las hojas (Chambers et al., 1993; Ramakers y O’Niell, 1999; Shipp et al., 2004).

Los objetivos de este capítulo son dos, en primer lugar, determinar el efecto que podría tener la utilización de un alimento suplementario, en este caso cistos de *Artemia* sp., sobre la dispersión de los depredadores *O. laevigatus*, *O. majusculus* y *M. pygmaeus* cuando se liberan en un cultivo infestado o en uno no infestado por insectos fitófagos. El segundo objetivo es determinar la eficacia de la inoculación de *O. majusculus* y de la adición de alimentos suplementarios sobre el control del trips *F. occidentalis* en un cultivo de pepino de invernadero.

## 2 Material y Métodos

### 2.1 Insectos

*Macrolophus pygmaeus*, *Orius majusculus* y *O. laevigatus* se obtuvieron de la cría que el laboratorio de entomología del IRTA Cabrils (Barcelona) mantiene desde 1996, 2005 y 2002 respectivamente. Todas ellas se iniciaron con individuos recolectados en los cultivos de El Maresme (Barcelona) y se renuevan con introducciones de individuos de campo cada año. La cría de *M. pygmaeus* se mantiene en planta de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en cámaras climáticas bajo condiciones controladas ( $25\pm 2$  °C,  $70\pm 20\%$  RH y 16:8 (L:O)), como presa se les ofrece huevos de *E. kuehniella* (Agustí y Gabarra, 2009a, 2009b). Las crías de *Orius* spp. se mantienen en botes ventilados de vidrio (9,5 cm Ø, 13 cm de altura) en cámaras climáticas bajo las mismas condiciones controladas que se han mencionado anteriormente. Se les ofrece judía verde como substrato de ovoposición y fuente de humedad y como alimento se les suministra huevos de *E. kuehniella*. En los botes se coloca papel de celulosa para proporcionar escondites a los *Orius* spp. y reducir, así, el canibalismo.

La cría de *F. occidentalis* se inició en el 2008 con adultos que fueron recolectados en flores de geranio en El Maresme (Barcelona). Se mantiene en botes de cristal (aprox. 8,5 cm Ø, 13 cm de altura) con ventilación superior (Ø 6 cm) cubierta con malla “anti-trips” y se les ofrece judía verde como alimento, fuente de agua y substrato de ovoposición. Para evitar la condensación de agua dentro del bote también se añade papel absorbente. La cría de *B. tabaci* se inició en 2002 con individuos recogidos en El Maresme en cultivos hortícolas y se mantiene en jaulas ventiladas sobre planta de col (*Brassica oleracea* L.). Ambas crías se mantienen en cámaras climáticas bajo las mismas condiciones anteriormente citadas.

### 2.2 Material vegetal y dietas

Las plantas de pepino (var. Markerter y Estrada, Fitó<sup>®</sup>) se cultivaron a partir de semillas y se mantuvieron libres de herbívoros en jaulas a prueba de insectos, dentro de invernaderos del IRTA Cabrils, hasta que tenían la primera hoja verdadera formada (aproximadamente dos semanas). Para obtener plantas de pepino infestadas con *F. occidentalis*, entre 3 y 4 días antes del experimento, las plantas se introdujeron en una jaula y se añadieron aproximadamente 20 larvas de trips por planta. Para obtener plantas infestadas de *B. tabaci*, en la jaula de la cría de la mosca blanca se introdujeron las plantas de pepino durante dos horas aproximadamente para que *B. tabaci* realizara la puesta, posteriormente se retiraron y se colocaron en otra jaula, durante 24 horas hasta el inicio del ensayo.

Como alimentos suplementarios se utilizaron cistos secos de *Artemia* sp. “AF” (a partir de ahora *Artemia* sp.), que provienen de lagos asiáticos y que contienen una elevada cantidad de ácidos grasos insaturados (HUFAs) suministrados por INVE Animal Health S.A (Bélgica), y polen comercial seco de abeja (Mielar S.A).

### 2.3 Efecto del alimento suplementario en la dispersión de los depredadores

Los ensayos se realizaron en una cámara climática con condiciones controladas de temperatura y humedad ( $25 \pm 2$  °C,  $70 \pm 20\%$  RH y 16:8 (L:O) de fotoperiodo). En cuatro jaulas de metacrilato (57x58x48 cm) con ventilación lateral y superior, se colocaron 7 plantas de pepino, de las cuales, 6 ocupaban los vértices de un hexágono equilátero de 48 cm de diámetro. La séptima planta se colocó en el centro de este hexágono, de modo que había la misma distancia entre todas las plantas (24 cm). Se realizaron 4 tratamientos: (1) en la planta del centro se añadió *Artemia* sp. y las plantas circundantes estaban infestadas con trips (ensayos con

*Orius* spp.) o con mosca blanca (ensayos con *M. pygmaeus*); (2) en la planta central no se añadió alimento y las plantas circundantes no estaban infestadas; (3) en la planta central se añadió *Artemia* sp. y las plantas circundantes no estaban infestadas y (4) en la planta central no se añadió alimento y las circundantes estaban infestadas de trips o mosca blanca según el depredador evaluado. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento.

En cada una de las jaulas se liberaron cuidadosamente veinte hembras de depredador de edad conocida (1 – 7 días) en la planta central del hexágono. Cada hora, durante un periodo total de 6 horas, se miraban las plantas circundantes para determinar la presencia de depredadores. La frecuencia de las revisiones se fijó teniendo en cuenta los estudios preliminares de Venzon et al., (1999) que observaron que el tiempo mínimo de permanencia de *O. laevigatus* en planta limpia de pepino era de más de una hora. En cada revisión, se retiraron todos los depredadores que se encontraban en las plantas circundantes para asegurar que los primeros depredadores atraídos por dichas plantas, no podían repeler o atraer a los que todavía no se habían dispersado (Janssen et al. 1997, 1998). Pasadas las 6 horas se hacía un recuento final de los depredadores presentes en cada una de las plantas (circundantes y central).

### **2.4 Efecto de *O. majusculus* y de los alimentos suplementarios sobre el control de *F. occidentalis***

Este ensayo se llevó a cabo en un invernadero de plástico (430 m<sup>2</sup>) que contenía 12 compartimentos (6,40 x 4,50 m) recubiertos con malla fina de plástico anti-mosca blanca (10 x 20 hilos) que evita el movimiento de los insectos entre compartimentos. En cada compartimento se colocaron cuatro sacos de sustrato de fibra de coco (2 sacos por fila) y dos plantas por saco, con un total de ocho plantas por compartimento. Se utilizó una variedad de pepino holandés (var. Estrada)



porque los frutos de estas variedades son muy susceptibles a *F. occidentalis*. Las plantas se trasplantaron en los compartimentos el 5-06-2009 y se tutoraron y se fertirrigaron durante el cultivo, según las prácticas habituales en la zona. La temperatura y la humedad relativa se monitorizaron usando un registrador de datos digital (Hobo, Onset Computer Corporation, Massachusetts), colocado a 2,15 m sobre el nivel del suelo en el medio del invernadero.

Se llevaron a cabo cuatro tratamientos: 1) *F. occidentalis* + *O. majusculus*; 2) *F. occidentalis* + *O. majusculus* + *Artemia* sp.; 3) *F. occidentalis* + *O. majusculus* + *Artemia* sp. + polen; 4) un tratamiento control solo con *F. occidentalis*. Se realizó un diseño de bloques completamente al azar, con estos cuatro tratamientos repetidos tres veces. Diecisiete días después del trasplante se introdujeron 22 larvas de *F. occidentalis* en cada planta y al día siguiente, se introdujo una pareja (macho y hembra) de *O. majusculus* en cada planta. En los tratamientos en los que se añadió alimento suplementario, este se distribuyó directamente sobre las hojas inferiores de las plantas, una única vez, cuando se liberaron los depredadores.

A partir de la semana posterior a la introducción de *O. majusculus*, se hizo un recuento semanal durante cinco semanas sobre cuatro plantas al azar de cada uno de los compartimentos; los recuentos se realizaron siempre por la mañana. De cada una de las plantas observadas se escogía una hoja de la parte alta de la planta, una de la parte de en medio y otra de la parte baja y de cada una de ellas se contaba el número de larvas y adultos de *F. occidentalis* y el número de ninfas y adultos de *O. majusculus*. Del 24 de julio al 6 de agosto se cosecharon los frutos en 4 ocasiones, anotándose el número total de frutos por jaula, el peso de los frutos y el número de frutos que presentaban el manchas plateadas producidas por la alimentación de *F. occidentalis* sobre el fruto.

### 2.5 Análisis estadístico.

En el ensayo de dispersión y colonización, para cada especie de depredador, se analizó el número de depredadores que permanecía en el punto de liberación al final del experimento mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores (adición o no de alimento suplementario e infestación o no de las plantas circundantes). Así mismo, también mediante ANOVA de los mismos dos factores, se analizó el número acumulado de depredadores en las plantas circundantes en cada recuento separadamente.

En el segundo ensayo, el número de *F. occidentalis* (adultos y larvas) y de *O. majusculus* (adultos y ninfas) por planta se obtuvo como la media de los valores de las tres hojas evaluadas. Con el valor medio por jaula de ambos insectos se calculó, según el método descrito por Ruppel (1983), el número de insectos-día en las distintas fechas de muestreo. En el caso de los frutos se calculó el valor acumulado de peso, número total de frutos y número de frutos con manchas plateadas por jaula. Para determinar las diferencias entre tratamientos en los frutos y durante los diferentes recuentos en el número acumulado de insectos-día se realizó un ANOVA de dos factores (tratamiento y bloques). En todos los ensayos, las diferencias significativas entre las medias se identificaron con el test de Tukey ( $P < 0.05$ ). Para homogeneizar las varianzas, los datos fueron transformados mediante raíz ( $x+0,5$ ) o log ( $x+1$ ), siempre que fue necesario. Los datos fueron estadísticamente procesados utilizando el programa Enterprise Guide 4.2. (SAS Institute, 2006-2008)

## 3 Resultados

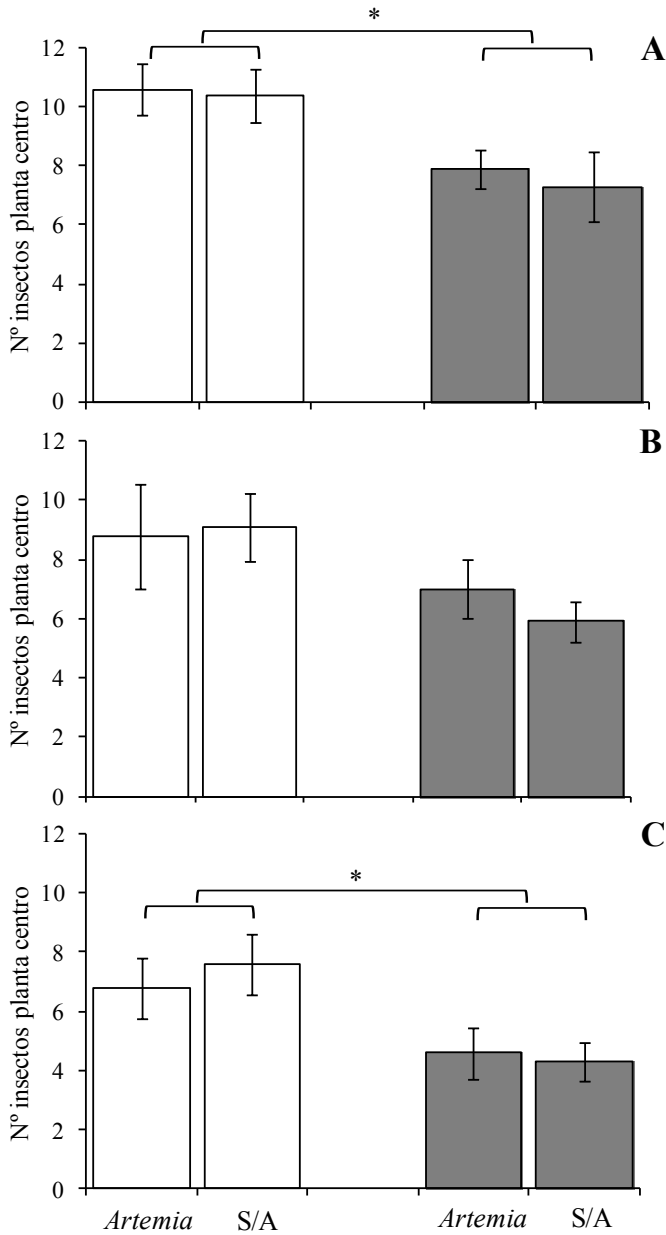
### 3.1 Efecto del alimento suplementario en la dispersión de los depredadores

Al analizar el efecto que podía tener la presencia de un alimento suplementario en el punto de liberación sobre la dispersión de *O. majusculus*, *O.*

*laevigatus* y *M. pygmaeus*, se observó que la presencia de cistos de *Artemia* sp. no influyó en el número de depredadores que se quedaron en la planta donde fueron liberados (*O. laevigatus*:  $F_{1,39} = 0,19$ ;  $P = 0,669$ ; Figura 3.1A; *O. majusculus*:  $F_{1,39} = 0,03$ ;  $P = 0,855$ ; Figura 3.1B; *M. pygmaeus*:  $F_{1,39} = 0,08$ ;  $P = 0,783$ ; Figura 3.1C). En cambio, la presencia de presa en las plantas circundantes sí influyó de manera significativa al número de *O. laevigatus* y *M. pygmaeus* que se quedaron en el punto de liberación (*O. laevigatus*:  $F_{1,39} = 9,77$ ;  $P = 0,004$ ; Figura 3.1A; *M. pygmaeus*:  $F_{1,39} = 9,31$ ;  $P = 0,004$ ; Figura 3.1C), siendo menor cuando las plantas circundantes estaban infestadas. Por el contrario, la presencia de presa no tuvo ningún efecto en el número de *O. majusculus* que se quedaron en la planta donde fueron liberados ( $F_{1,39} = 2,32$ ;  $P = 0,136$ ; Figura 3.1B), no observándose diferencias significativas entre el número de depredadores que se quedaron en el punto de liberación cuando había presa en las plantas circundantes y cuando no había presa.

Cuando estudiamos el efecto de la presencia del alimento suplementario en la planta central en el proceso de colonización de las plantas circundantes, observamos que los depredadores se dispersaron hacia las plantas infestadas de forma similar tanto si había cistos de *Artemia* sp. en el punto de liberación como si no (Tabla 3.1). En cambio, la presencia de *F. occidentalis* y *B. tabaci* en las plantas circundantes, sí tuvo un efecto positivo en la colonización y los depredadores se dispersaron más rápidamente en los tratamientos con plantas infestadas que en los de plantas no infestadas (Tabla 3.1). En las Figuras 3.2A y 3.2B se observa que el número de *O. laevigatus* y *O. majusculus* en las plantas circundantes es mayor si estas están infestadas que si no lo están a partir de una hora después de haberse liberado los depredadores. Esta diferencia se mantuvo durante las seis horas de duración del experimento. En el caso de *M. pygmaeus*, también se observó un efecto positivo de la presencia de *B. tabaci* en las plantas circundantes sobre la

colonización de las mismas, a partir de cuatro horas después que estos depredadores fueron liberados (Figura 3.2C).

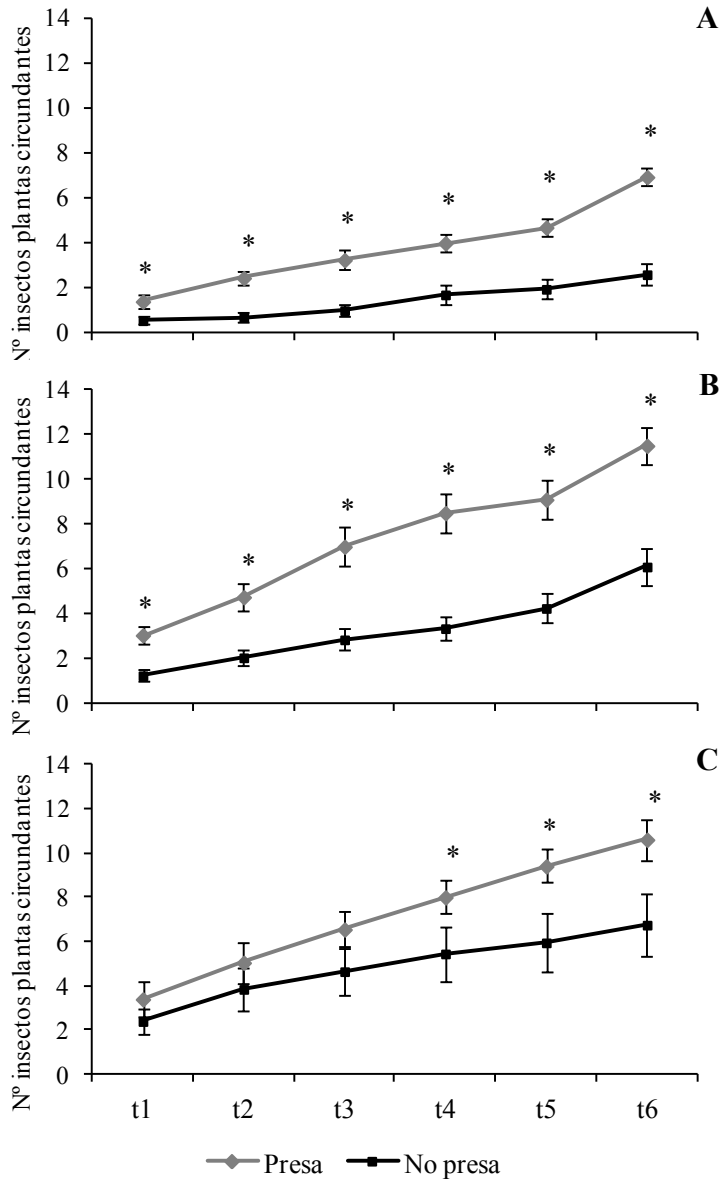


**Figura 3.1.** Número de individuos (media  $\pm$  es) de *O. laevigatus* (A), *O. majusculus* (B) y *M. pygmaeus* (C) que permanecían en la planta central donde fueron liberados en función de si en la planta central había *Artemia* sp. o no (S/A) y si las plantas circundantes estaban no infestadas (□) o infestadas (■) con trips o mosca blanca según el depredador (ver material y métodos para los detalles). La observación se realizó al cabo de 6 horas de liberar los depredadores. Las diferencias significativas para el factor presencia de presa en las plantas circundantes están indicadas con un asterisco (test de Tukey,  $P < 0,05$ ).

### Capítulo 3

**Tabla 3.1.** Resultados de los test de ANOVA de dos factores realizados para comparar el efecto de la presencia de alimento suplementario en la planta donde se liberaron los depredadores y la presencia de presa en las plantas circundantes, en la dispersión de *O. laevigatus*, *O. majusculus* y *M. pygmaeus*. Grados de libertad en cada uno de los análisis: 1, 39.

	<i>O. laevigatus</i>		<i>O. majusculus</i>		<i>M. pygmaeus</i>	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Alimento suplementario en planta central						
t1	0,55	0,464	0,50	0,485	0,17	0,679
t2	0,15	0,702	0,20	0,656	0,27	0,606
t3	0,09	0,771	0,07	0,799	0,01	0,919
t4	0,48	0,495	0,01	0,929	0,06	0,808
t5	0,07	0,791	0,02	0,886	0,00	0,962
t6	0,24	0,627	0,09	0,762	0,02	0,898
Presencia de presa en plantas circundantes						
t1	6,33	0,017	11,84	0,001	1,94	0,173
t2	20,30	< 0,001	13,80	< 0,001	1,56	0,220
t3	19,29	< 0,001	19,06	< 0,001	3,75	0,061
t4	15,74	< 0,001	27,84	< 0,001	6,25	0,017
t5	23,90	< 0,001	19,62	< 0,001	10,96	0,002
t6	49,45	< 0,001	24,43	< 0,001	10,91	0,002



**Figura 3.2.** Número acumulado (media  $\pm$  es) de *O. laevigatus* (A), *O. majusculus* (B) y *M. pygmaeus* (C) en las plantas circundantes, cada hora desde el momento de su liberación. Las diferencias significativas entre tratamientos están indicadas con un asterisco (test de Tukey,  $P < 0,05$ ).

### **3.2 Eficacia de *Orius majusculus* en el control de *Frankliniella occidentalis* en cultivo de pepino holandés bajo invernadero. Efecto de la adición de alimento suplementario en la instalación.**

El número de *F. occidentalis* sobre las plantas de pepino holandés, se redujo considerablemente y de manera significativa respecto al tratamiento control con la inoculación de *O. majusculus* solo o con la adición de los alimentos suplementarios (Tabla 3.2, Figura 3.3A). En el primer recuento, una semana después de la liberación de los depredadores, la población de trips se redujo de manera significativa en el tratamiento en que se liberó *O. majusculus* y se añadió cistos de *Artemia* sp. en el cultivo respecto a los otros tratamientos (Figura 3.3A). A partir del segundo recuento, en todos los tratamientos en los que se liberaron *O. majusculus*, las poblaciones de trips se redujeron de manera significativa y a partir del tercer recuento, las poblaciones disminuyeron significativamente más cuando los depredadores dispusieron de alimentos suplementarios. La reducción de la población de trips se mantuvo durante la duración del ensayo, aunque la última semana no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento *F. occidentalis* + *O. majusculus* y el tratamiento *F. occidentalis* + *O. majusculus* + *Artemia* sp, pero sí con el tratamiento en el que se añadió polen.

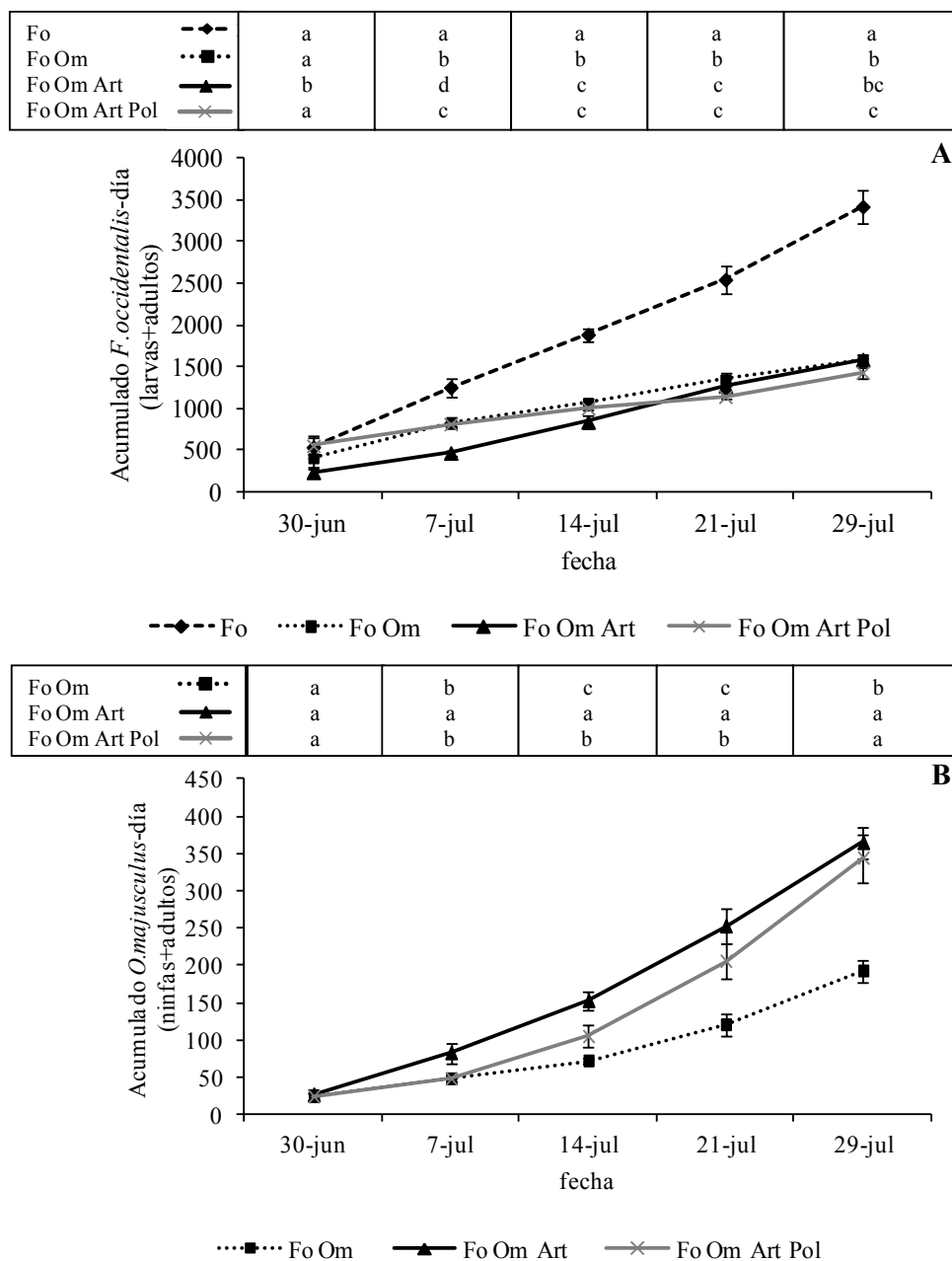
El depredador *O. majusculus* fue capaz de reproducirse e instalarse en el cultivo, ya que sus poblaciones se incrementaron en el tiempo, especialmente cuando se añadieron alimentos suplementarios (Figura 3.3B). Cuando consideramos la dinámica poblacional de los depredadores en términos de insectos-día acumulados, hubo diferencias significativas entre tratamientos a partir de la segunda semana de seguimiento (Tabla 3.2). Las poblaciones incrementaron significativamente más cuando se añadieron cistos de *Artemia* sp. que cuando los cistos se añadieron junto al polen, aunque en el último muestreo no se observaron diferencias entre estos dos tratamientos.



En cuanto al daño en los frutos de pepino asociados a la actividad de *F. occidentalis*, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Tabla 3.3). Tanto la producción de frutos (nº total y peso de los frutos) como la presencia de manchas fue similar en los cuatro tratamientos (Frutos totales:  $F_{3, 11} = 0,44$ ;  $P = 0,733$ ; Peso:  $F_{3, 11} = 0,92$ ;  $P = 0,486$ ; Manchas:  $F_{3, 11} = 4,02$ ;  $P = 0,07$ ). No obstante, se observó que el número medio de frutos con manchas plateadas, fue numéricamente muy superior en el tratamiento sin depredadores que en los tratamientos en el que se liberó *O. majusculus*. Encontrándose el número más bajo en el tratamiento en que se añadió además *Artemia* y polen.

**Tabla 3.2.** Resultados de los test de ANOVA de dos factores realizados para comparar el efecto de la presencia de alimento suplementario en la planta sobre el número acumulado de insectos-día de *F. occidentalis* y *O. majusculus*. Grados de libertad en cada uno de los análisis: *F. occidentalis* g.l. = 3, 11; *O. majusculus* g.l. = 3, 8.

Fecha recuento	<i>F. occidentalis</i>		<i>O. majusculus</i>	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
30/06/2009	9,63	0,010	1,00	0,444
07/07/2009	54,24	<0,001	13,60	0,016
14/07/2009	274,29	<0,001	33,53	0,003
21/07/2009	116,40	<0,001	124,04	<0,001
29/07/2009	253,52	<0,001	113,15	<0,001



**Figura 3.3.** Número acumulado insectos-día (media  $\pm$  ES) de *F. occidentalis* (larvas + adultos) (A) y de *O. majusculus* (adultos + ninfas) (B) observados en hojas por cada tratamiento para las cinco fechas de muestreo. Las letras minúsculas distintas en la parte superior de cada gráfico indican las diferencias significativas según el test de Tukey ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 3.3.** Número (media  $\pm$  ES) de frutos totales, peso total y frutos con manchas plateadas que se encontraron en cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Frutos totales	Peso total (g)	Frutos con manchas
Fo	28,3 $\pm$ 3,76	11,2 $\pm$ 1,70	13,3 $\pm$ 4,63
Fo Om	28,7 $\pm$ 1,20	10,6 $\pm$ 0,12	3,0 $\pm$ 1,53
Fo Om ART	27,7 $\pm$ 4,33	10,1 $\pm$ 1,70	4,7 $\pm$ 1,20
Fo Om ART POL	24,0 $\pm$ 0,58	8,4 $\pm$ 0,12	1,7 $\pm$ 0,88

#### 4 Discusión

Según los resultados de los capítulos anteriores, añadir alimentos suplementarios en el cultivo favorecería la instalación de los depredadores estudiados, mejorando su supervivencia y su reproducción. En los ensayos realizados en el presente capítulo, la adición de cistos de *Artemia* sp. como alimento suplementario en la planta donde fueron liberadas las hembras de *M. pygmaeus*, *O. majusculus* y *O. laevigatus*, no influyó en su permanencia sobre esta. Al cabo de las 6 horas que duró el experimento, menos del 50% de los depredadores todavía permanecía en la planta central. Esto indicaría que *Artemia* sp. no sería una presa suficientemente buena como para retener los depredadores ya que, según Nakashima y Hirose (1999), la calidad y la cantidad del alimento afecta el tiempo de residencia de las hembras en el área en que este se concentra. Así mismo, Montserrat et al., (2004) observaron que *Macrolophus caliginosus* y *O. majusculus* tienden a no abandonar el área de búsqueda cuando la densidad de presa es abundante. En cambio, la presencia del herbívoro en las plantas circundantes sí tuvo un efecto en su colonización por las tres especies de depredadores. Las plantas infestadas por *F. occidentalis* o *B. tabaci* fueron más atractivas para los tres depredadores que las plantas donde se liberaron, hubiera o no *Artemia* sp. en ellas. En las 6 horas que se prolongó el experimento, entre el 15-

35% insectos liberados, llegaron a las plantas circundantes no infestadas. En cambio, cuando las plantas circundantes estaban infestadas los valores fueron claramente superiores (entre 35-60% de los insectos liberados). Las dos especies de *Orius* fueron atraídas por las plantas infestadas con trips desde la primera hora de su liberación. En cambio, la atracción de *M. pygmaeus* hacia las plantas infestadas por *B. tabaci* no se mostró hasta pasadas cuatro horas desde la liberación. Esto podría explicarse por el hecho de que *M. pygmaeus* es una especie más energéticamente conservativa que *O. majusculus*, que es más activo a la hora de buscar la presa (Montserrat et al., 2004).

Otro aspecto que puede haber influido en la mayor rapidez de *Orius* spp. en colonizar las plantas infestadas con trips, que la de *M. pygmaeus* en colonizar las plantas infestadas por *B. tabaci*, es el distinto tipo de daño que estos fitófagos realizan en las plantas. Se sabe que la emisión de volátiles por la planta es relativamente específica del tipo de alimentación del insecto (Turlings et al. 1990). Los insectos que se alimentan de floema, como las ninfas de *B. tabaci*, no infligen un daño profundo en los tejidos vegetales ya que utilizan su estilete para acceder al tejido vascular y extraer el floema (Walling 2000). Los trips en cambio, dañan los tejidos epidérmicos y parenquimáticos del vegetal inyectando saliva al mismo tiempo que vacían los contenidos celulares (Lacasa et al. 2008) produciendo daños mecánicos mayores. Cuando el daño mecánico es mayor aumenta la cantidad de volátiles liberados por la planta, mientras que el ataque de un fitófago succionador produce un daño menor, y la cantidad de volátiles que libera la planta es menor (Rodríguez-Saona et al. 2002, 2003). Estos volátiles, asociados a la presencia de plaga o, a los daños que esta produce en la planta, son utilizados por las plantas como mecanismo de defensa para atraer a los enemigos naturales (Greany y Hagen 1981; Letourneau 1988; Turlings et al. 1990; Vet y Dicke 1992; Tumlinson 1993; Dicke 1999). Diferentes especies de *Orius* muestran una marcada preferencia por

los volátiles emitidos por plantas atacadas por herbívoros como trips y araña roja (Venzon et al. 1999; Karimy et al. 2006; Tatemoto y Shimoda 2008). Así mismo, también se ha descrito la atracción de *M. pygmaeus* por volátiles emitidos por plantas infestadas tanto por araña roja como por pulgones (Moayeri et al. 2006; Moayeri et al. 2007).

En resumen, la atracción que ejercieron las plantas infestadas por las plagas a los depredadores fue mayor que la que ejerció la presencia de alimento suplementario en la planta en la que fueron liberados. Por lo tanto, la adición de alimento suplementario no disminuiría la dispersión del depredador hacia el cultivo y podría aportar recursos nutritivos a los depredadores especialmente cuando el cultivo no estuviera infestado.

Por lo que respecta al ensayo en condiciones de semi-campo, comprobamos que en jaulas de exclusión, las poblaciones del trips *F. occidentalis* se redujeron cuando se liberó una pareja de *O. majusculus* por planta al inicio del cultivo. En ensayos de invernadero con *O. laevigatus* y *O. strigicollis* (Poppius), estos no fueron capaces de establecerse en el cultivo de pepino ni de controlar las poblaciones de trips (Chambers et al. 1993; Kim et al. 2004; Rajabpor et al. 2011), mientras que en nuestro trabajo *O. majusculus* incrementó su densidad de población y controló las poblaciones de *F. occidentalis* de manera efectiva. Por otro lado, la reducción de las poblaciones de trips fue mayor cuando se añadió alimento suplementario en el cultivo y las poblaciones del depredador también incrementaron de manera significativa. Añadir cistos de *Artemia* sp. solos o junto con polen tuvo un efecto positivo en la efectividad de *O. majusculus* para controlar la plaga, ya que las poblaciones de trips se redujeron de manera significativa respecto al tratamiento en el que se liberó *O. majusculus* sin alimento. En estudios previos, ya se comprobó el efecto que tiene la adición de polen sobre el control que

ejercen los depredadores sobre las plagas, sin tener ningún efecto positivo sobre estas (van Rijn et al. 2002; Nomikou et al. 2004).

La calidad de los frutos es un aspecto importante a tener en cuenta cuando se evalúan métodos de control de plagas, especialmente en cultivos de invernadero, debido al elevado capital invertido y los costes de producción involucrados. El cultivo de pepino holandés es especialmente sensible a los trips (Shipp et al. 2000), lo que hace que el umbral económico de daños para *F. occidentalis* esté en función, sobretudo, de su efecto en los frutos (Rosenheim et al. 1990). A pesar de que no se observaron diferencias entre tratamientos, con la inoculación de *O. majusculus* y la adición de alimento suplementario se observó un número muy bajo de frutos con manchas plateadas, asociadas a la alimentación de los trips sobre los frutos inmaduros (Shipp et al. 2000).

Tanto si hay presa en el cultivo, como si no la hay, la adición de polen y cistos de *Artemia* sp. podrían mejorar la instalación de los depredadores, como hemos comprobado en este capítulo y en los capítulos 1 y 2 de esta tesis. Put et al., (2012) también indican que la adición de huevos de *E. kuehniella* como alimento suplementario en el cultivo del tomate, en ausencia de presa, incrementó las poblaciones de *M. pygmaeus*. Por otro lado también hemos encontrado que la inoculación de una pareja de *O. majusculus* por planta, fue suficiente para controlar la plaga en las condiciones de nuestro ensayo. Sin embargo, nuestro ensayo es de corta duración, realizado en jaulas de exclusión, por tanto se tendría que estudiar cómo implementarlo en condiciones comerciales de cultivo de pepino.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la inoculación de *O. majusculus* para el control de trips en cultivo de pepino fue muy eficaz. La adición de alimento suplementario al inicio de la inoculación, y una única vez, mejoró la eficacia del depredador produciendo una mayor reducción de las poblaciones de presa. Como comprobamos en los capítulos 1 y 2, en el caso de

que la inoculación se realice cuando no hay plaga o esta sea muy escasa, la adición de *Artemia* y/o polen podría contribuir a mejorar la supervivencia y longevidad de estos depredadores en el cultivo. Además, muy posiblemente, estos alimentos suplementarios no supondrían un inconveniente para la colonización del cultivo. La implementación de estos resultados en campo requeriría de un estudio más detallado en condiciones reales de cultivo.

# 4

**Selección de plantas en flor para optimizar la conservación de parasitoides de *Tuta absoluta* (Lepidopera: Gelechiidae) y de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)**



Larva de *N. nr. artynes* sobre larva parasitada de *T. absoluta* (Foto M. Vilas)



### 1 Introducción

El cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) es uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia económica a nivel mundial. Es atacado por varias plagas polífagas y las estrategias de Manejo Integrado de Plagas (MIP) van encaminadas a minimizar los daños que estas producen en el cultivo. En los últimos años, la mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) ha sido considerada la plaga clave del cultivo del tomate especialmente por su capacidad para transmitir virus (Gabarra y Besri 1999; Avilla et al. 2004). Pero en 2006, se detectó por primera vez en España la presencia de la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) que se propagó rápidamente, causando importantes daños en los cultivos del tomate, tanto de Europa como de todo el litoral mediterráneo (Desneux et al. 2010; Desneux et al. 2011; Urbaneja et al. 2013) y se convirtió rápidamente en otra plaga clave para este cultivo. Para el manejo de estos fitófagos, tanto en cultivos de invernadero como al aire libre, se ha recurrido al MIP en el que el control biológico juega un papel muy importante (Gabarra et al. 2008). Las estrategias utilizadas son la inoculación estacional y sobre todo, la conservación y aumento de las poblaciones de los enemigos naturales autóctonos. En el control biológico por conservación el objetivo es incrementar las poblaciones y el impacto de los enemigos naturales facilitándoles refugios, huéspedes y presas alternativas y alimentos de origen vegetal, como néctar y polen, a partir, por ejemplo, de la creación de infraestructuras ecológicas con especies vegetales seleccionadas (Landis et al. 2000; Gurr et al. 2004). En el caso de *T. absoluta*, la estrategia se basa en la utilización de depredadores polífagos que consumen mayoritariamente huevos de *T. absoluta*, pero necesitan un periodo largo de tiempo para establecerse en el cultivo (Urbaneja et al. 2012). En el área mediterránea se han encontrado numerosas especies de parasitoides de larvas, pertenecientes mayoritariamente a las familias de Eulophidae, Braconidae e

Ichneumonidae, parasitando *T. absoluta*. Entre las más abundantes están *Necremnus* sp. nr. *artynes* Walker, *Stenomesus* sp. nr. *japonicus* Ashmead (Hymenoptera: Eulophidae) y *Bracon* sp. nr. *nigricans* (Hymenoptera: Braconidae) Szépligeti (Urbaneja et al. 2012; Zappalà et al. 2012; Ferracini et al. 2012; Biondi et al. 2013a; Zappalà et al. 2013; Gabarra et al. 2014). El incremento de las poblaciones naturales de estos parasitoides, podría complementar y hacer más efectivo el control biológico de *T. absoluta* en este cultivo. En el caso de la mosca blanca *B. tabaci*, se han identificado un amplio rango de depredadores y parasitoides y la conservación de algunos de ellos se utiliza con éxito en el control biológico de esta plaga, este es el caso de *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) (Gerling et al. 2001; Arnó et al. 2010b).

En general, los parasitoides juegan un papel importante en el control biológico de plagas agrícolas, gracias a su capacidad para regular las poblaciones de muchos fitófagos. Muchos de estos parasitoides alcanzan su máximo potencial biológico cuando disponen de una fuente adecuada de azúcares para alimentarse. En diversos estudios de laboratorio se ha demostrado los efectos positivos de una alimentación rica en azúcar en la longevidad y/o fecundidad de los parasitoides (Fadamiro y Heimpel 2001; Siekmann et al. 2001; Hausmann et al. 2005). En la naturaleza los parasitoides obtienen estos azúcares del néctar y el polen de las flores. Así, Telenga, (1958) y van Emden, (1963) observaron que los parasitoides eran más activos en hábitats con flores que en aquellos donde no había, y Wäckers, (1994) y Takasu y Lewis, (1995) demostraron que la carencia de azúcares reduce la eficiencia en la búsqueda de los huéspedes, en parte porque se reduce la actividad y en parte porque los parasitoides prefieren buscar alimento.

Sin embargo, actualmente los agroecosistemas agrícolas están dominados por monocultivos donde los recursos florales son escasos. Esta escasez de fuentes de alimentación puede afectar negativamente al control biológico y esto ha llevado a

un creciente interés por la reintroducción de recursos florales en los cultivos, como estrategia para proveer del alimento necesario, como néctar, a los enemigos naturales (Winkler et al. 2009a; Geneau et al. 2012). Al introducir dichos recursos florales se debe tener en cuenta una serie de factores, como por ejemplo, la abundancia y distribución de las flores, el valor nutricional de estas, el grado de atracción y la accesibilidad del néctar (Wäckers 2004), así como su posible efecto beneficioso sobre la proliferación de insectos plaga, proveyéndoles de alimento. Un aspecto importante es saber cómo afecta la presencia de recursos florales al conjunto del sistema plaga–enemigo natural, cuando ambos se alimentan de los mismos recursos. El efecto sobre este balance dependerá de la incidencia de los recursos florales sobre los parámetros biológicos de los insectos. A corto plazo, los herbívoros pueden verse beneficiados con la presencia de flores, pero a largo plazo, las poblaciones de parasitoides pueden crecer suficiente, para impedir el aumento de las poblaciones plaga y convertir, así, el recurso floral en un factor de mortalidad de la misma (Wäckers et al. 2007). Por otro lado, los estudios de control biológico por conservación que proporcionan recursos a los enemigos naturales, también deben tener en cuenta la posible influencia que estos recursos puedan tener en las poblaciones de herbívoros (Begum et al. 2006; Lavandero et al. 2006; Wäckers et al. 2007)

Por todo ello, el objetivo de este capítulo fue estudiar el efecto de los recursos florales de diferentes plantas tanto sobre la longevidad y la fecundidad de *N. nr. artynes*, *S. nr. japonicus* y *B. nr. nigricans*, parasitoides de *T. absoluta* y la longevidad de *E. mundus*, parasitoide de *B. tabaci*, como evaluar el efecto de las flores seleccionadas sobre ambas plagas.

## 2 Material y Métodos

### 2.1 Insectos

Los adultos de *N. nr. artynes*, *S. nr. japonicus*, *B. nr. nigricans* y *E. mundus* se obtuvieron de la cría que se mantiene en el laboratorio del IRTA Cabrils. Las crías de *N. nr. artynes*, *S. nr. japonicus* y *B. nr. nigricans* se iniciaron en 2011 con individuos recolectados en plantas de tomate infestadas con *T. absoluta* en la comarca de El Maresme (Barcelona). Las tres especies de parasitoides se criaron sobre *T. absoluta* en plantas de tomate. La cría del parasitoide *E. mundus* se inició en 2001 con individuos procedentes de diferentes cultivos de los invernaderos del centro IRTA Cabrils y se mantenían sobre plantas de algodón infestadas previamente de *B. tabaci*.

Todas las crías se mantuvieron en cámaras climáticas en condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperiodo ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ;  $70 \pm 20\%$  HR; 16:8 (L:O)).

### 2.2 Material vegetal

A partir de la bibliografía existente se seleccionaron plantas que se hubieran mostrado útiles para la conservación de parasitoides y que estuvieran presentes en el área del litoral mediterráneo (Bosch et al. 1997; Wäckers 2004; Vattala et al. 2006; Winkler et al. 2009b; Arnó et al. 2012; Geneau et al. 2012). Las siete especies seleccionadas fueron, de la familia Asteraceae: *Achillea millefolium* L., *Calendula officinalis* L. y *Tagetes patula* L.; de la familia Brassicaceae: *Lobularia maritima* L. y *Sinapis alba* L., de la familia Polygonaceae: *Fagopyrum esculentum* Moench y de la familia Leguminoseae: *Ononis natrix* L. Las flores de estas especies utilizadas en los experimentos, se obtuvieron de plantas cultivadas en invernadero. Las plantas de tomate (*L. esculentum* var. Marmande) fueron

cultivadas desde semilla; se sembraron en bandejas con sustrato de multiplicación y se mantuvieron en un invernadero hasta su utilización.

### **2.3 Efecto de la presencia de flores sobre los parámetros biológicos de los parasitoides**

#### **2.3.1 Longevidad y supervivencia**

Para *S. nr. japonicus*, *N. nr. arynes* y *B. nr. nigricans* se utilizó una unidad experimental que consistía en un recipiente ventilado cenitalmente de plástico transparente (11 cm altura x 9 cm Ø), con un pequeño agujero en la base donde se insertaba el tallo con una flor o con la inflorescencia. Cada tallo de la inflorescencia contenía varios brotes para asegurar el suministro de néctar (entre 25 y 40 flores abiertas). Este recipiente se colocaba encima de otro más pequeño (10 cm de altura x 7,7 cm Ø) con agua. El tallo era suficientemente largo para que pudiera pasar por el agujero y estar sumergido en el agua. El agujero alrededor del tallo se tapaba con masilla para evitar la fuga del parasitoide. Los recursos florales ensayados fueron las inflorescencias de *L. maritima*, *F. esculentum*, *A. millefolium*, *S. alba* y *O. natrix* y una sola flor de *T. patula* y *C. officinalis*. Se incluyeron también en el experimento dos tratamientos sin recurso floral: miel y agua. La miel milflores se suministró impregnada en una tira de papel de filtro (12 x 2 cm<sup>2</sup>) y el agua mediante un tubo de plástico (7,5 cm alto y 1,2 cm Ø) tapado con algodón. Tanto las flores como la miel y el agua se cambiaban dos veces por semana.

Para *E. mundus* y dado su pequeño tamaño, mide menos de 1 mm, se utilizó una unidad experimental más pequeña, formada por un tubo de plástico transparente (9 cm alto x 2,3 cm Ø), ventilado cenitalmente (1,5 cm Ø). El tallo de la inflorescencia se introducía en un tubo Eppendorf<sup>®</sup> lleno de agua que se sellaba con para-film y se situaba en el interior del tubo. Los tratamientos evaluados fueron, inflorescencias de *F. esculentum*, *L. maritima*, *A. millefolium* y *S. alba*

además de la miel y el agua (controles). El tallo de la inflorescencia contenía las flores suficientes para asegurar el suministro de néctar (entre 5 y 15 flores abiertas). El agua se suministró en un tubo Eppendorf<sup>®</sup> con un trozo de algodón y la miel impregnada en una tira de papel de filtro similar a como se hizo con los parasitoides de *T. absoluta*.

En cada unidad experimental se individualizó un insecto. Se realizaron observaciones diarias, hasta un máximo de 15 días, anotándose si los parasitoides estaban vivos o muertos. En total se evaluaron 15 individuos por sexo, para cada uno de los tratamientos.

### **2.3.2 Fecundidad**

Para los tres parasitoides de *T. absoluta* se utilizó la misma unidad experimental y los mismos tratamientos descritos en el apartado anterior. En cada unidad experimental se introdujeron durante 48 horas dos hembras, que habían estado en presencia de machos, de 3 – 4 días de edad. Pasado este tiempo, las hembras que habían sobrevivido se almacenaban a -20°C hasta el momento de su disección. Para diseccionarlas se colocaron en un portaobjetos y con la ayuda de un bisturí se separó el tórax del abdomen y este, se pegó dorsalmente sobre cinta adhesiva de doble cara adherida al portaobjetos. Se cortó transversalmente el extremo anal del abdomen y éste se cubrió totalmente con una gota de solución salina de Ringer. Con la ayuda de una aguja entomológica se cortó el tegumento del abdomen por el lateral y se abrió. A continuación se contaron el número de oocitos corionados bajo la lupa binocular. Se diseccionaron un total de 15 hembras para cada alimento.

### 2.4 Efecto de la presencia de flores sobre la supervivencia de las plagas

En el caso de las hembras y los machos de *T. absoluta* se utilizó la misma unidad experimental y la misma metodología que para sus parasitoides. Los tratamientos evaluados en este caso fueron las 7 plantas en flor, miel, agua con miel (solución del 10%) y agua (control). También en el caso de los machos y las hembras de *B. tabaci* se utilizó la misma metodología que para *E. mundus*. Los alimentos evaluados en este caso fueron flores de *L. maritima*, miel, agua (control) y hoja de tomate, debido a que los adultos de esta mosca blanca se alimentan directamente sobre la hoja mediante su estilete. Se evaluaron un total de 15 individuos por sexo de *T. absoluta* y entre 9 y 22 machos y hembras de *B. tabaci* por tratamiento.

### 2.5 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa R. Tanto la longevidad de los parasitoides como de las plagas diana, así como la fecundidad de los parasitoides se compararon usando un modelo lineal generalizado (GLM), basado en una distribución gamma a partir de la función de enlace de identidad para la longevidad, y basado en una distribución de Poisson a partir de la función de enlace de log para la fecundidad. Cuando se encontraron diferencias significativas en los análisis GLM, las medias se compararon usando el test de Tukey.

### 3 Resultados

#### 3.1 Efecto de la presencia de flores sobre los parámetros biológicos de los parasitoides

##### 3.1.1 Longevidad y supervivencia

Las hembras y los machos de *S. nr. japonicus* que se alimentaron de miel, *L. maritima*, *F. esculentum* y *A. millefolium* vivieron significativamente más días que aquellos a las que solo se les suministró agua (Hembras:  $F_{8, 134} = 5,10$ ;  $P < 0,001$ ; Machos:  $F_{8, 134} = 7,06$ ;  $P < 0,001$ ; Figura 4.1). En los machos, la longevidad obtenida con *L. maritima* fue significativamente superior a la obtenida con la provisión de miel. La longevidad obtenida en los tratamientos con *C. officinalis*, *S. alba*, *T. patula* y *O. natrix* fue significativamente inferior a la que se obtuvo cuando los parasitoides dispusieron solo de agua para alimentarse, tanto para los machos como para las hembras de *S. nr. japonicus*. A los 15 días, solo quedaban hembras de *S. nr. japonicus* vivas en los tratamientos con *L. maritima*, miel, *C. officinalis* y *A. millefolium* (46,7%, 33,3%, 20% y 13,3% respectivamente). En cambio, había machos vivos a los 15 días en 6 de los 9 tratamientos. El valor más alto fue el de *L. maritima* (40%) y el más bajo el de *S. alba* y *T. patula* (6,7% en los dos casos) (Figura 4.1).

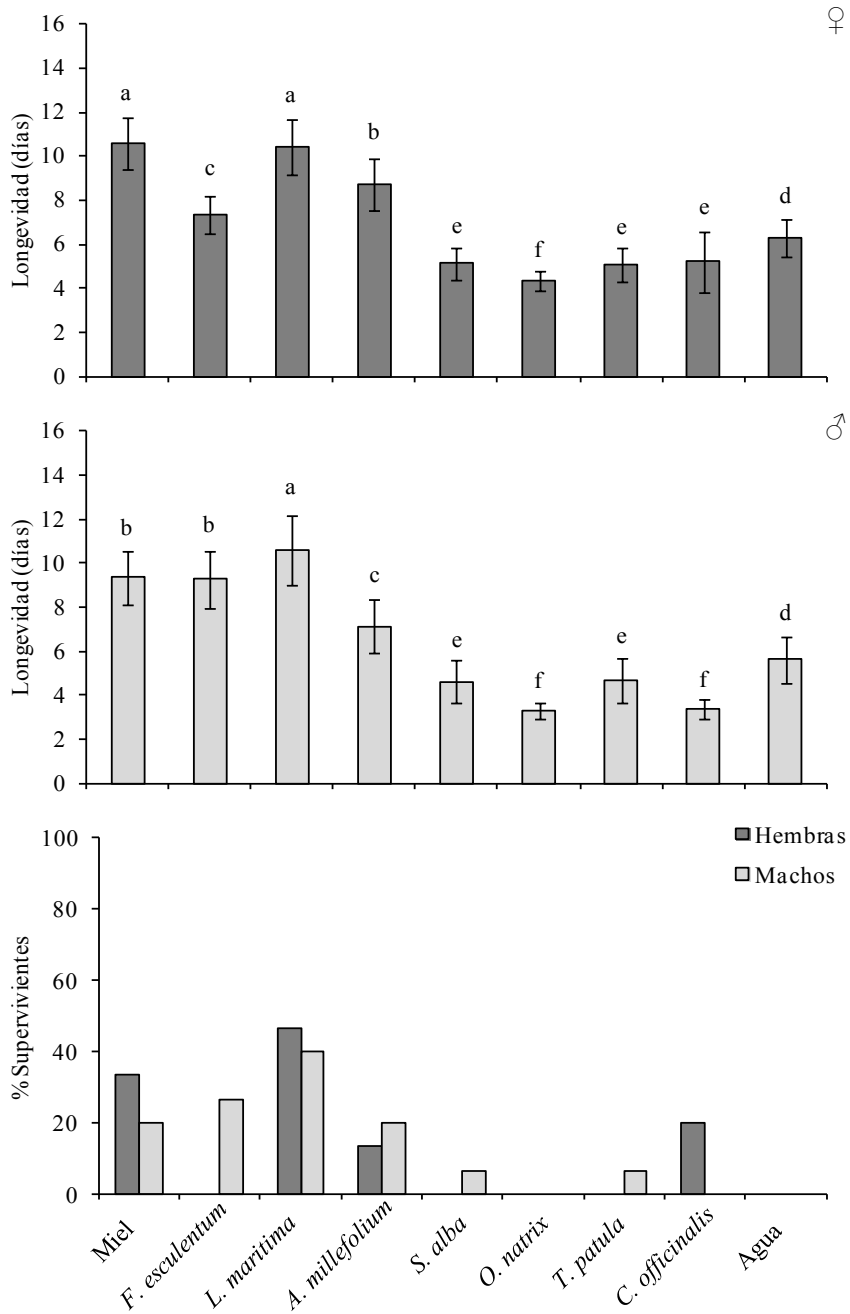
En el caso de *N. nr. artynes*, la longevidad también se vio afectada por el alimento ofrecido. Cinco tratamientos (miel, *L. maritima*, *F. esculentum*, *A. millefolium* y *S. alba*) mejoraron significativamente la longevidad de las hembras de este parasitoide respecto al control con agua (Figura 4.2;  $F_{8, 134} = 12,02$ ;  $P < 0,001$ ). En el caso de *L. maritima*, la longevidad del parasitoide fue significativamente superior al obtenido con la provisión de miel. Las mismas plantas, excepto *S. alba*, también mejoraron significativamente la longevidad de los machos (Figura 4.2;  $F_{8, 134} = 11,58$ ;  $P < 0,001$ ). A los 15 días de iniciado el experimento el 60% de las hembras que se alimentaron de *L. maritima* seguían vivas, mientras que el porcentaje de hembras vivas en el tratamiento con miel fue



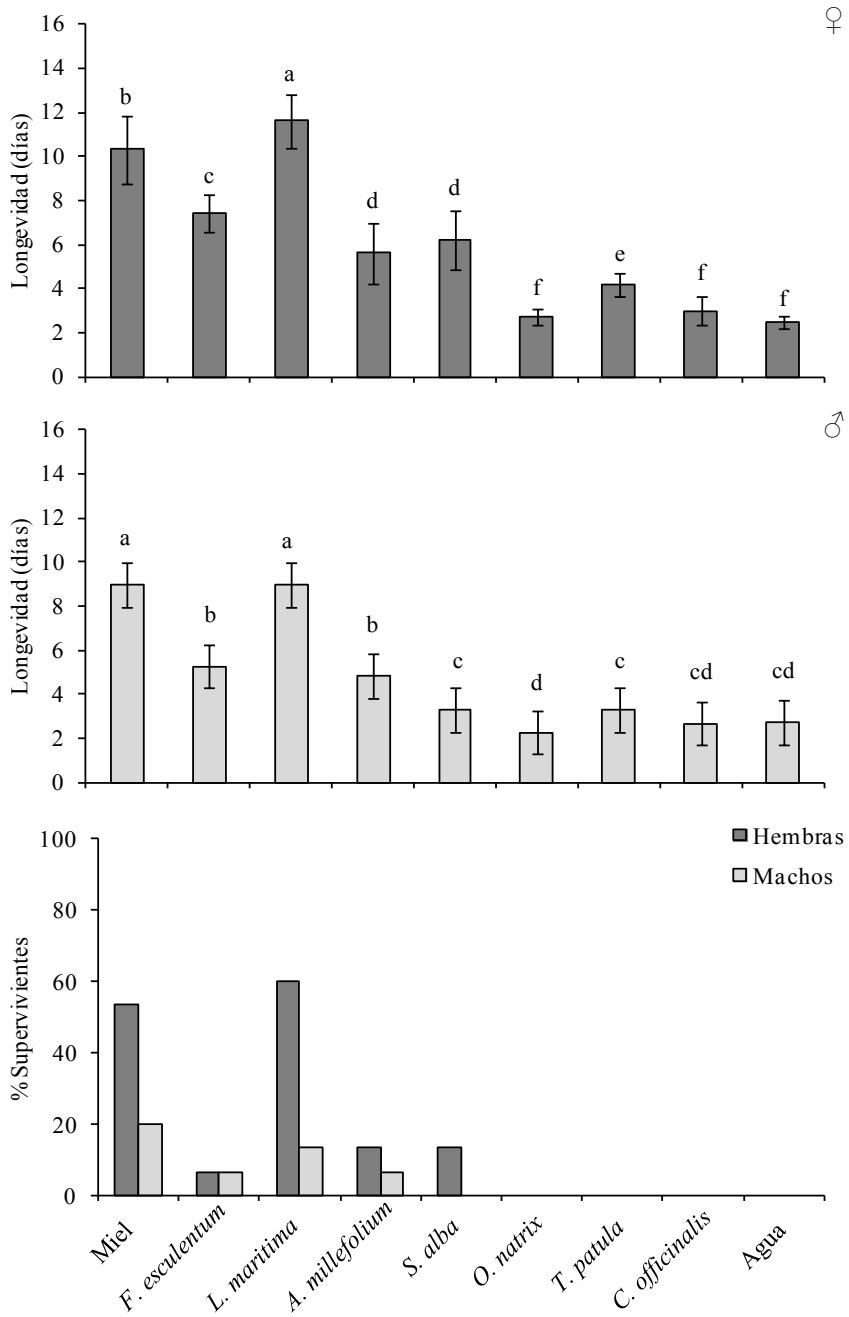
de 53,3%. En general, el porcentaje de supervivencia de los machos de *N. nr. artynes* fue más bajo que el de las hembras (Figura 4.2).

De todos los tratamientos ensayados con *B. nr. nigricans*, únicamente *O. natrix* no mejoró significativamente la longevidad de las hembras, mientras que con todas las otras flores y con la miel la longevidad fue significativamente mayor que el control (agua) (Figura 4.3;  $F_{8, 134} = 9,60$ ;  $P < 0,001$ ). Cuando a las hembras de este parasitoide se le ofrecieron flores de *F. esculentum* se obtuvo un valor de la longevidad similar al que se obtuvo cuando se ofreció miel, mientras que en el caso de los machos la longevidad obtenida con *F. esculentum* fue significativamente superior a la obtenida con la miel. Por otro lado, las flores que mejoraron significativamente la longevidad de los machos de *B. nr. nigricans* fueron *F. esculentum*, *L. maritima*, *A. millefolium* y *O. natrix* (Figura 4.3;  $F_{8, 134} = 19,57$ ;  $P < 0,001$ ). El 93% y el 80% de las hembras de *B. nr. nigricans* seguían vivas a los 15 días cuando se alimentaron de *F. esculentum* y miel respectivamente (Figura 4.3).

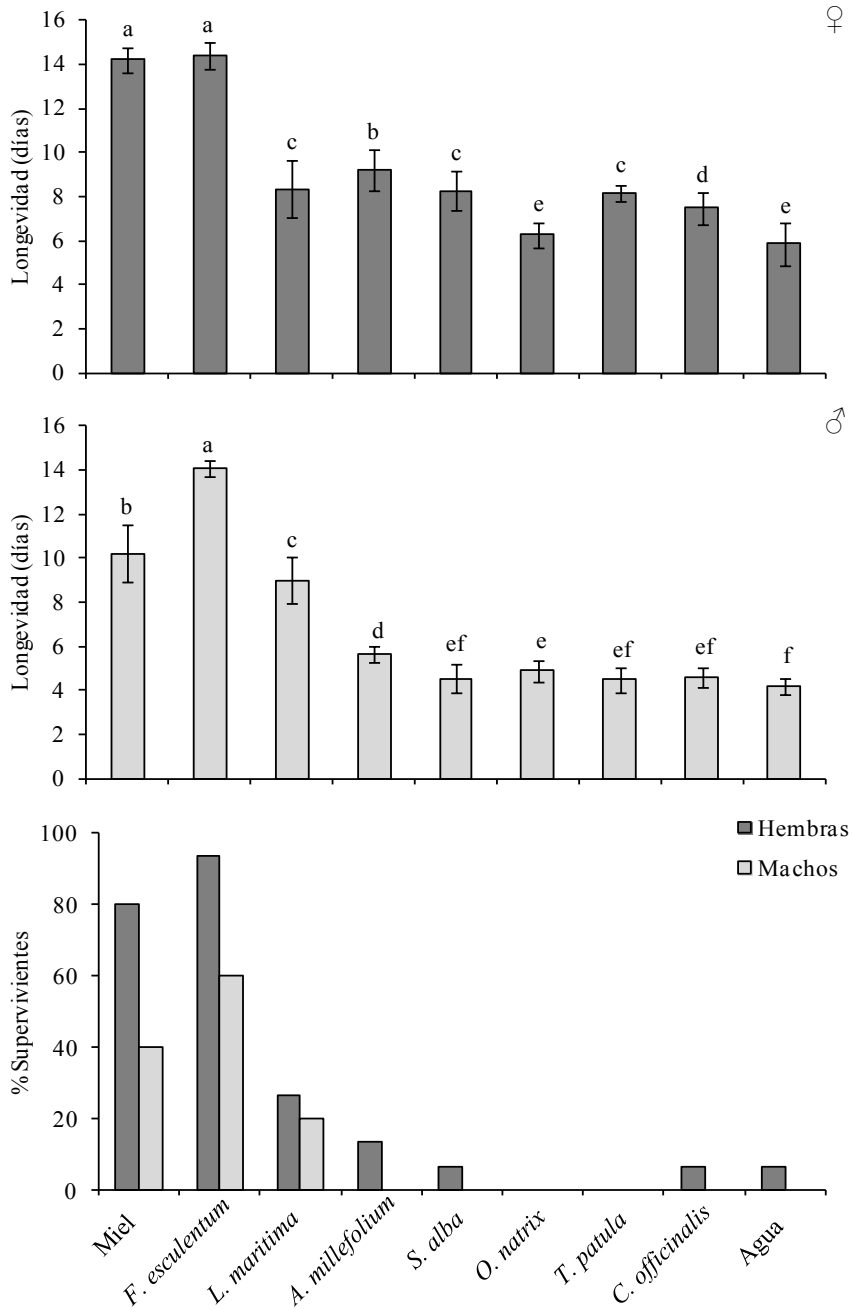
La longevidad de las hembras y de los machos de *E. mundus*, fue significativamente más elevada cuando se alimentaron de *F. esculentum*, *L. maritima* y miel, que cuando los insectos solo dispusieron de agua (Hembras:  $F_{5, 89} = 12,10$ ;  $p < 0,001$ ; Machos:  $F_{5, 89} = 23,46$ ;  $P < 0,001$ ; Figura 4.4). La supervivencia máxima de las hembras de *E. mundus* fue de 12 días (solo un individuo alimentado con *F. esculentum* y otro con *L. maritima* y 2 individuos alimentados con miel sobrevivieron 12 días. A los 7 días, sobrevivieron entre el 20% y el 50% de los adultos que se habían alimentado de estos tres alimentos (Figura 4.4) y ninguno de los insectos de los tratamientos con *A. millefolium*, *S. alba* y agua.



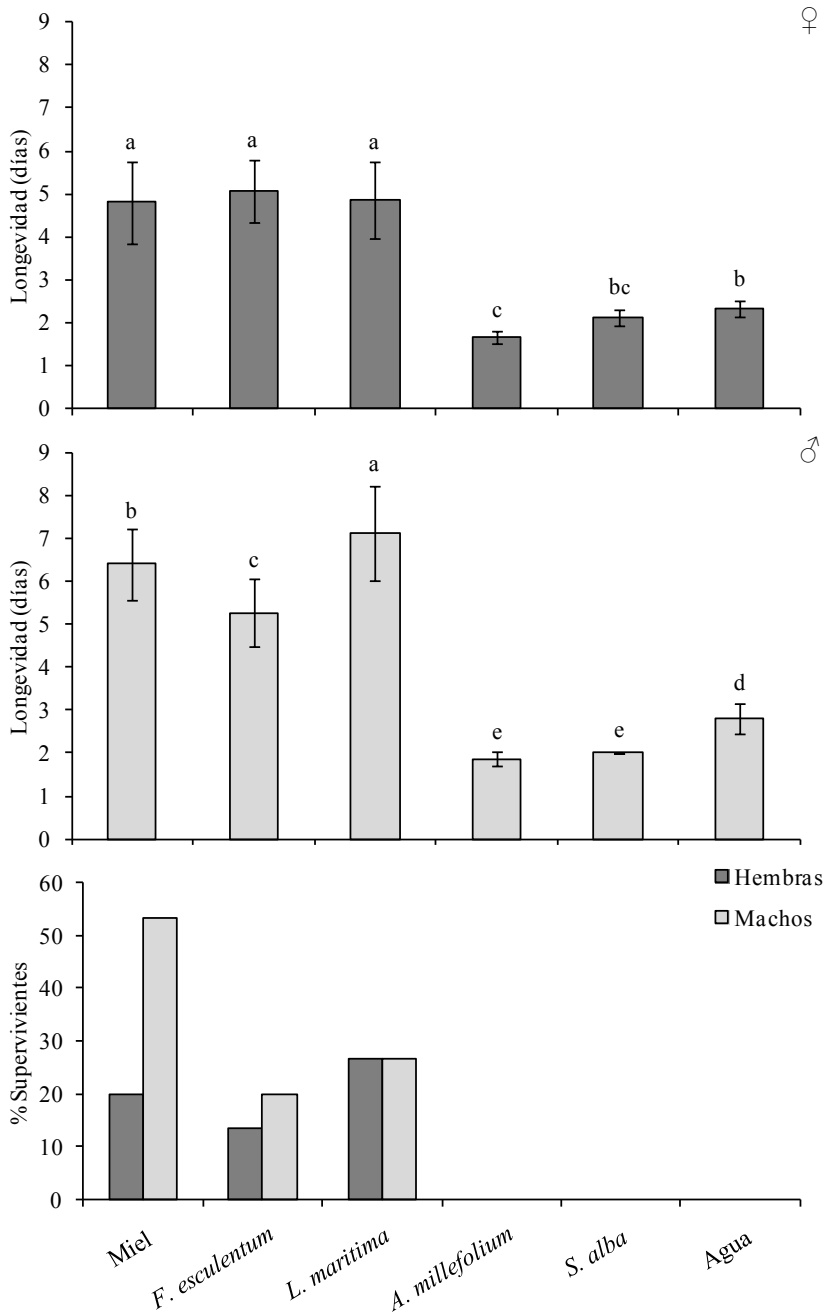
**Figura 4.1.** Longevidad (media  $\pm$  es) de las hembras y los machos de *S. nr. japonicus* y porcentaje de supervivientes a los 15 días. Barras con letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$  test de Tukey).



**Figura 4.2.** Longevidad (media  $\pm$  es) de las hembras y los machos de *N. nr artynes* y porcentaje de supervivientes a los 15 días. Barras con letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$  test de Tukey).



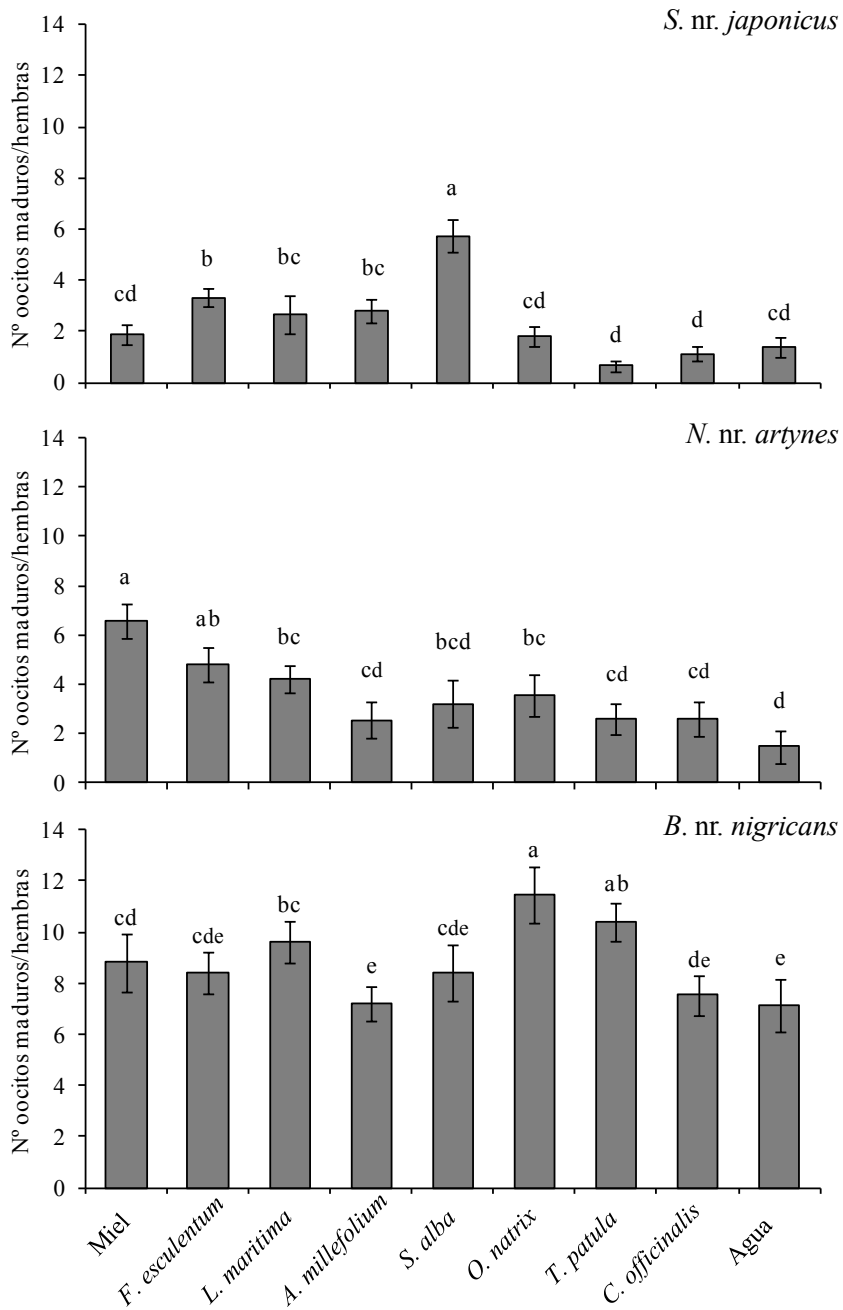
**Figura 4.3.** Longevidad (media  $\pm$  es) de las hembras y los machos de *B. nr. nigricans* y porcentaje de supervivientes a los 15 días. Barras con letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$  test de Tukey).



**Figura 4.4.** Longevidad (media ± es) de las hembras y los machos de *E. mundus* y porcentaje de supervivientes a los 7 días. Barras con letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$  test de Tukey).

### 3.1.2 Fecundidad

Las hembras de las tres especies de parasitoides de *T. absoluta* incrementaron el número de oocitos corionados al alimentarse durante dos días de algunas de las flores evaluadas. Las hembras de *S. nr. japonicus* tenían significativamente más oocitos corionados en los tratamientos con *S. alba* y *F. esculentum*, que en los controles con agua y con miel y que con cualquiera de las flores de las otras especies (Figura 4.5;  $F_{8, 134} = 13,33$ ;  $P < 0,001$ ). La miel, *F. esculentum*. *L. maritima* y *O. natrix* incrementaron significativamente el número de oocitos de *N. nr artynes* respecto a las hembras que se alimentaron de agua (Figura 4.5;  $F_{8, 134} = 9,37$ ;  $P < 0,001$ ). Por último, las hembras de *B. nr. nigricans* que tenían un mayor número de oocitos corionados en su abdomen, fueron las del tratamiento con *O. natrix*. La disponibilidad de *T. patula*, *L. maritima* o miel también incrementó significativamente la carga de oocitos maduros de las hembras respecto a las de las hembras que únicamente recibieron agua (Figura 4.5;  $F_{8, 134} = 3,67$ ;  $P < 0,001$ ). *Calendula officinalis* fue la única especie vegetal que no tuvo ningún efecto en la carga de oocitos de estos tres parasitoides.



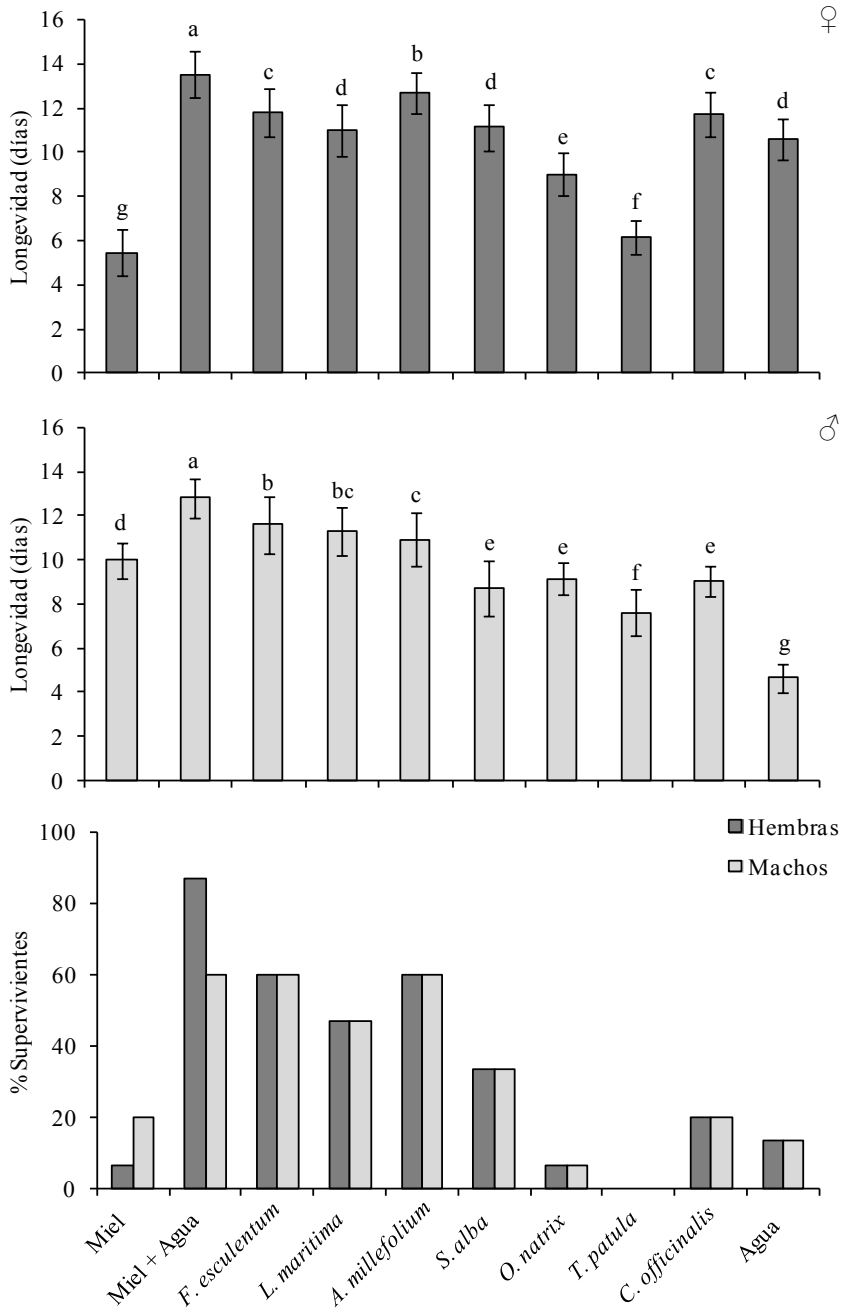
**Figura 4.5.** Número de oocitos maduros (media ± es) de *S. nr. japonicus*, *N. nr. artynes* y *B. nr. nigricans*. Barras con letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$  Test de Tukey).

### 3.2 Supervivencia de las plagas

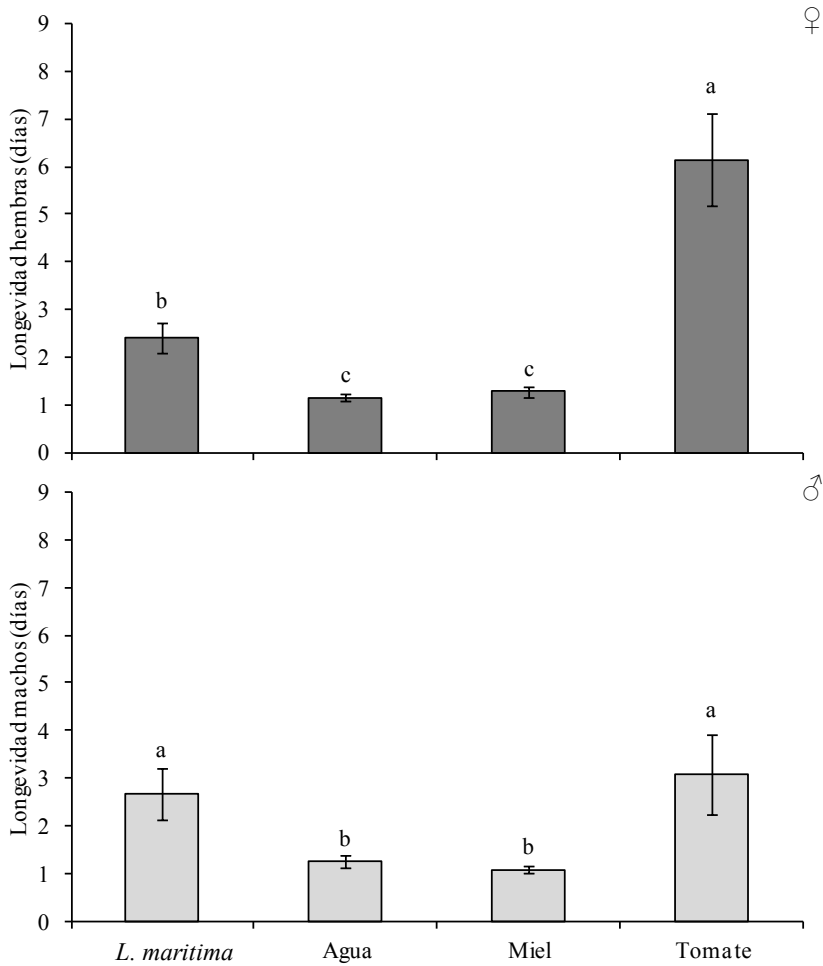
La longevidad de *T. absoluta* difirió de manera significativa entre tratamientos (Hembras:  $F_{9, 149} = 6,93$ ;  $P < 0,001$ ; Machos:  $F_{9, 149} = 6,53$ ;  $P < 0,001$ ; Figura 4.6). Para ambos sexos el valor significativamente mayor se alcanzó cuando los individuos se alimentaron de la solución de agua y miel. Las flores de *A. millefolium*, *F. esculentum* o de *C. officinalis* también mejoraron de manera significativa la longevidad de las hembras de *T. absoluta*. En cambio, todos los tratamientos ensayados incrementaron la longevidad de los machos respecto a la del control con agua. Excepto en el tratamiento con *T. patula* en que ningún individuo sobrevivió 15 días, en los demás tratamientos siempre existieron individuos supervivientes al final del experimento. Tanto para las hembras como para los machos, los porcentajes mayores se registraron en los tratamientos con agua con miel, *F. esculentum*, *L. maritima*, *A. millefolium* o miel (Figura 4.6).

La longevidad de las hembras y de los machos de *B. tabaci* estuvo significativamente influida por el tratamiento aplicado (Figura 4.7; Hembras:  $F_{3, 69} = 57,16$ ;  $P < 0,001$ ; Machos:  $F_{3, 46} = 6,93$ ;  $P < 0,001$ ). En ambos sexos el valor numéricamente mayor se obtuvo en el tratamiento con hoja de tomate y las longevidades menores se obtuvieron en los tratamientos sin planta, sin embargo, cuando se les suministró planta de tomate fue cuando se observó la mayor longevidad media de la plaga. La supervivencia máxima de *B. tabaci* sobre *L. maritima* fue de 4 días y de 2 días cuando se alimentaron de agua o de miel, mientras que un 7% de las hembras que se alimentaron de tomate seguían vivas a los 15 días.





**Figura 4.6.** Longevidad (media  $\pm$  es) de las hembras y los machos de *T. absoluta* y porcentaje de supervivientes a los 15 días. Barras con letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$  test de Tukey).



**Figura 4.7.** Longevidad (media  $\pm$  es) de hembras y machos de *B. tabaci*. Barras con letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$  Tukey).

#### 4 Discusión

Los resultados obtenidos muestran que la disponibilidad de flores influyó fuertemente en la longevidad y en número de oocitos de los parasitoides de *T. absoluta*, *S. nr. japonicus*, *N. nr. arynes* y *B. nr. nigricans* y del parasitoide de la mosca blanca *B. tabaci*, *E. mundus*, pero con notables variaciones entre flores y

entre especies de parasitoides. Esta variabilidad depende de una amplia gama de factores, que incluyen generalmente la accesibilidad y el atractivo de las flores y la idoneidad nutricional del néctar (Wäckers 2004, 2005). Otro posible factor que puede haber influido en los resultados del presente trabajo podría ser la longevidad total de los himenópteros estudiados, muy diferente entre las distintas especies. La longevidad media de *N. nr. artynes* es de entre 12 y 16 días (Balzan y Wäckers 2013; Calvo et al. 2013; Chailleux et al. 2014) y la de *E. mundus* entre 8 y 17 días (Urbaneja et al. 2006; Malo 2009) ambos valores, más cercanos a los 15 días de duración del experimento del presente trabajo. En cambio, la longevidad media de *S. nr japonicus* y de *B. nr. nigricans* es mucho más larga, 62 y 41 días respectivamente (Biondi et al. 2013b; Chailleux et al. 2014).

De las 7 plantas, *F. esculentum* y *L. maritima* fueron las únicas especies que produjeron un incremento significativo de la longevidad de las hembras y los machos de los cuatro parasitoides, respecto a los individuos que recibieron solo agua. El incremento que producen estas flores sobre la longevidad de las hembras es variable (entre 1,4 y 4,6 veces la longevidad con solo agua). Los incrementos de la longevidad asociados a las flores de *F. esculentum* y *L. maritima* obtenidos en este trabajo, concuerdan con los que han encontrado Balzan y Wäckers, (2013) en *N. nr. artynes* y con numerosos estudios realizados con otras especies de parasitoides (Johanowicz y Mitchell 2000; Berndt y Wratten 2005; Begum et al. 2006; Vattala et al. 2006; Irvin et al. 2007; Winkler et al. 2009a; Nafziger Jr. y Fadamiro 2011; Hopkinson et al. 2013). La disponibilidad de flores de *A. millefolium* y de *S. alba* produjo un efecto notable sobre la longevidad de las hembras de los tres parasitoides de *T. absoluta* (entre 1,4 y 2,5 veces comparado con los individuos que sólo recibieron agua), aunque en el caso de *S. alba* y *S. nr. japonicus* el efecto no fue significativo. En cambio, las flores de estas dos especies vegetales no produjeron ningún efecto en la longevidad de las hembras de *E.*

*mundus*. El efecto que puede tener el consumo de néctar de *A. millefolium* y *S. alba* sobre la longevidad de los parasitoides no ha sido anteriormente determinado. Sin embargo, en estudios de campo se han encontrado asociados a *A. millefolium*, una elevada densidad y diversidad de himenópteros parasitoides (Dib et al. 2012) y un incremento significativo del parasitismo natural de coleópteros en áreas próximas a márgenes formados por *S. alba* (Manojlovic et al. 2000). Estos datos sugieren que los himenópteros parasitoides son capaces de aprovechar de alguna forma los recursos alimentarios que estas flores ofrecen.

La nula contribución de las flores de *A. millefolium* y *S. alba* a la longevidad de *E. mundus* puede estar ligado a la relación entre el tamaño del insecto, la arquitectura de la flor y la posición de los nectarios en la misma. Por ejemplo los nectarios de *A. millefolium* se consideran que están escondidos en la flor, mientras que los de *L. maritima* están parcialmente escondidos (Patt et al. 1997), esto podría hacerlos menos accesibles para los parasitoides más pequeños como sería el caso de *E. mundus*. En este sentido, Vattala et al. (2006) indica que la mostaza blanca tienen una corola muy profunda en comparación a las flores de *F. esculentum* y *L. maritima*, lo que también podría explicar la poca accesibilidad de este néctar. Además, el néctar de *S. alba* está compuesto sobre todo por azúcares monosacáridos y su consumo podría tener mayores inconvenientes fisiológicos para el parasitoide que el consumo de néctar más rico en disacáridos, como es el caso del néctar de *F. esculentum* (Vattala et al. 2006).

La presencia de flores de *T. patula* y *C. officinalis* tuvo un efecto positivo únicamente sobre la longevidad de las hembras de *B. nr. nigricans*. Rahat et al. (2005) señalan que *T. patula*, es una de las flores con mayor efecto sobre el parasitoide *Trissolcus basalis* (Wollaston) (Hymenoptera: Scelionidae). De hecho las observaciones realizadas por Jervis et al. (1993) indican que los braconidos pueden explotar las flores con corolas estrechas y tubulares como las que forman

los capítulos de las asteráceas, familia a la que pertenecen tanto *C. officinalis* como *T. patula*, en la base de las cuales están los nectarios (Patt et al. 1997).

Seis de las 7 plantas en flor que hemos evaluado aportaron recursos que permitieron a alguno de los parasitoides de *T. absoluta* incrementar la producción de oocitos maduros, indicando que en estas especies la provisión de azúcares puede mejorar la reproducción del parasitoide. Sin embargo, el efecto de las flores sobre la producción de oocitos maduros en las distintas especies de parasitoides fue más variable que el efecto de las mismas flores sobre la longevidad. *Fagopyrum esculentum* incrementó el número de oocitos de las dos especies de eulófidos, mientras que *L. maritima* mejoró la fecundidad de *N. nr. artynes* y *B. nr. nigricans*, respecto al tratamiento control (disponibilidad de solo agua). *Achillea millefolium* no tuvo ningún efecto sobre la reproducción y *S. alba* tuvo únicamente efecto sobre *S. nr. japonicus*. Este efecto positivo de *L. maritima* y de *F. esculentum* sobre la reproducción de los parasitoides concuerda con los resultados obtenidos anteriormente en otras especies de parasitoides (Lavandero et al. 2006; Irvin et al. 2006; Araj et al. 2008; Witting-Bissinger et al. 2008; Winkler et al. 2009a; Geneau et al. 2012). Las hembras de *S. nr. japonicus*, *N. nr. artynes* y *B. nr. nigricans* son sinovigénicas y por lo tanto necesitan alimentarse para producir huevos. Habitualmente la ovogénesis se asocia a una alimentación rica en proteínas y en el caso de muchos parasitoides con la alimentación sobre el huésped (“host-feeding”). De hecho, tanto estos dos eulófidos como el bracónido son capaces de alimentarse de las larvas de *T. absoluta*, de las que pueden obtener los nutrientes necesarios para la formación de los huevos (Balzan y Wäckers 2013; Biondi et al. 2013b; Chailleux et al. 2014). Según Balzan y Wäckers, (2013) la carga de huevos de las hembras de *N. nr. artynes* fue similar entre hembras alimentadas con una solución de azúcar y las hembras jóvenes no alimentadas, lo que, según los autores, indicaría que los recursos no asociados al consumo del huésped no contribuyen en la

fecundidad de este parasitoide. Sin embargo, en los resultados del presente trabajo la carga de oocitos de *N. nr. artynes* se ve incrementada cuando el parasitoide tiene acceso a algunas flores y también a la miel, igual que sucede con *B. nr. nigricans*. Posiblemente las diferencias entre los presentes resultados y los de Balzan y Wäckers (2013) con *N. nr. artynes* puedan explicarse por la composición más compleja de azúcares y otros nutrientes de la miel y del néctar de algunas flores que también pueden contener aminoácidos, lo que facilitaría la reproducción de los parasitoides (van Lenteren et al. 1987; Wäckers 2001; Winkler et al. 2006; Alvarez-Suarez et al. 2009). Por otro lado, algunos parasitoides son capaces de producir huevos alimentándose exclusivamente de fuentes de azúcares, lo que indica que en algunas especies los azúcares también pueden ser un recurso específico para la reproducción (Rivero y Casas, 1999). Este puede ser también el caso de *S. alba*, que produjo un fuerte incremento de la abundancia de oocitos maduros únicamente a las hembras de *S. nr. japonicus*, y de *T. patula*, que incrementó significativamente la carga de oocitos maduros a las hembras de *B. nr. nigricans*. El efecto positivo del néctar de *T. patula* y *S. alba* sobre la reproducción de los parasitoides no está descrito, aunque Paterno Silveira et al. (2009) y Manojlovic et al., (2000) encontraron un incremento significativo de la actividad de parasitoides en zonas próximas a márgenes formados por otra especie de *Tagetes* y *S. alba*, lo cual podría asociarse a la presencia de flores de estas plantas.

La disponibilidad de *O. natrix* incrementó notablemente la abundancia de oocitos maduros en *N. nr. artynes* y en *B. nr. nigricans*, en cambio, no tuvo ningún efecto sobre la longevidad de los parasitoides estudiados. Las papilionáceas tienen una corola muy restrictiva para los himenópteros, lo que indicaría que los parasitoides podrían haber consumido otros recursos de la planta distintos del néctar. *Ononis natrix* tiene abundantes tricomas glandulares cuyos exudados recubren la planta (Wollenweber y Dorr, 2003) que en algunos casos pueden ser

utilizados como nutrientes por los parasitoides. Por ejemplo, Olson y Nechols, (1995) encontraron que los exudados producidos por los tricomas producían monosacáridos y algunas proteínas que incrementaban la longevidad y la fecundidad del parasitoide *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead) (Hymenoptera: Scelionidae).

Las flores próximas a los campos que pueden tener un efecto sobre los parasitoides también pueden tener un efecto sobre las plagas, tal y como se ha descrito en la introducción de este capítulo. En nuestro estudio, los machos de *T. absoluta* fueron capaces de aprovechar el néctar floral de las 7 plantas estudiadas para incrementar su longevidad, llegando a duplicarla al consumir néctar de *F. esculentum* o de *L. maritima*. Las hembras de *T. absoluta* son poliándricas (Lee et al. 2014), por lo tanto, los machos posiblemente son muy dependientes de la obtención de alimento que les permita acoplarse frecuentemente. En cambio, las hembras solo incrementaron su longevidad cuando dispusieron de flores de *A. millefolium*, *F. esculentum* o *C. officinalis*, siendo el incremento máximo del 20%. Estos resultados coinciden con los que encontraron Balzan y Wäckers, (2013) cuando estudiaron el efecto de *F. esculentum* sobre la longevidad total de *T. absoluta*, aunque el incremento relativo asociado al recurso alimenticio que encontraron fue mayor. Probablemente esta diferencia sea debida a que nosotros evaluamos la supervivencia durante los primeros 15 días de vida de los adultos de la polilla y su longevidad puede llegar a ser más larga. Para las hembras de *T. absoluta* el agua fue un elemento determinante dado que su longevidad fue mucho menor cuando dispusieron solo de miel que cuando dispusieron de agua con miel (Figura 6). La capacidad de aprovechar los recursos florales para incrementar su longevidad ha sido también observada en los adultos de la polilla *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) que es plaga de diversas solanáceas (Baggen y Gurr, 1998). La longevidad de las hembras y los machos de *B. tabaci*

que disponían de flores de *L. maritima* fue el doble que la de estos insectos cuando solo dispusieron de agua. En cambio, cuando dispusieron de hoja de tomate, la longevidad se multiplicó por 5,4 y 2,4 respectivamente para hembras y machos. Esto indica que el efecto positivo que puede tener el recurso floral sobre la plaga sería muy bajo.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la presencia del néctar de algunas flores mejora la longevidad y fecundidad de las tres especies de parasitoides de *T. absoluta* estudiados y la longevidad de *E. mundus*. La mayor parte de las plantas que suministran recursos a estos parasitoides incrementando su longevidad no coincidieron con las que incrementaron la carga de oocitos en el abdomen de las hembras. Tampoco observamos que ninguna de las plantas estudiadas fuera beneficiosa para todas las especies de parasitoides. Ante estos datos, y si el objetivo que se persigue es conservar los parasitoides existentes en una zona, sería necesario disponer en las inmediaciones del cultivo de más de una planta. La instalación de márgenes de plantas en flor formados por diversas especies de plantas que puedan suministrar estos recursos puede mejorar la eficacia de los parasitoides e incrementar la eficacia del control biológico en cultivo de tomate. Actualmente los agroecosistemas agrícolas están dominados a menudo por monocultivos donde los recursos florales son escasos y por tanto, pobres en néctar y polen. En este caso, *F. esculentum*, *L. maritima*, *A. millefolium*, *S. alba* y *O. natrix* podrían ser unas buenas candidatas a formar parte de estos márgenes floridos. De hecho, la vida útil de los parasitoides con acceso a una combinación de más de un alimento puede ser mayor que cuando los alimentos se suministran individualmente (Wade et al. 2005). Estos estudios de laboratorio deberían ser completados con estudios de campo que permitan evaluar los beneficios que pueden aportar estos márgenes floridos sobre la eficacia del control biológico.



### Discusión general

En esta Tesis se ha estudiado el efecto que tiene el alimento suplementario, tanto de origen vegetal como de origen animal, en algunos de los depredadores y parasitoides más importantes para el control biológico en cultivos hortícolas.

En los capítulos 1 y 2, estudiamos el efecto que producían dos alimentos suplementarios, los cistos de *Artemia* sp. y el polen comercial de abeja, sobre la reproducción y supervivencia de los depredadores polívoros *O. laevigatus*, *O. majusculus*, *M. pygmaeus* y *N. tenuis*, como alternativa a los huevos de *E. kuehniella*, considerados un alimento óptimo para la cría de depredadores por su elevada calidad nutricional. Suministrar de manera periódica cistos de *Artemia* sp. mejoró la reproducción de las dos especies de *Orius* sp. y de *M. pygmaeus*, mientras que el aporte de polen mejoró su longevidad, pero ninguno de los dos alimentos fue capaz de mejorar ambos parámetros. Sin embargo, sí mejoraron tanto la longevidad, como la reproducción de *N. tenuis*. Cuando el alimento suplementario no puede suministrarse periódicamente en el cultivo, la adición de cistos de *Artemia* sp. mejoró la supervivencia de las dos especies de *Orius* y de *N. tenuis*. En cambio, sería necesario suministrar *Artemia* sp. y polen, de manera conjunta, para aumentar la longevidad de *M. pygmaeus*.

El componente nutricional principal de los huevos de *E. kuehniella* y de *Artemia* sp. son las proteínas que, junto a los lípidos, son los compuestos más importantes en la reproducción de los insectos (Barry and Wilder 2012). Esto explicaría el mayor efecto que hemos observado de los alimentos de origen animal sobre la reproducción en las cuatro especies de depredadores estudiados. Mientras que el polen de abeja contiene principalmente carbohidratos, que son esenciales para la supervivencia y dispersión (Lundgren 2009), y aportan la energía suficiente para volar y colonizar las plantas.

La adición de cistos de *Artemia* sp., en las plantas de pepino en el momento de la liberación de los depredadores *O. majusculus*, *O. laevigatus* y *M. pygmaeus* no influyó en su dispersión, pero sí influyó la presencia de presa en las plantas circundantes (capítulo 3). Tanto *O. majusculus* y *O. laevigatus*, como *M. pygmaeus* se sintieron atraídos por las plantas infestadas por *F. occidentalis* y *B. tabaci* respectivamente, abandonando la planta donde habían sido liberados para dispersarse hacia las plantas infestadas. Estos resultados indicarían que la dispersión de estos depredadores está muy influenciada por los compuestos volátiles que producen las plantas como mecanismo de defensa, cuando son atacadas por herbívoros. Se sabe que estos compuestos juegan un papel importante en la dispersión de los enemigos naturales (Tumlinson et al. 1993; Dicke 1994). Esta atracción sería más fuerte, que la tendencia de los depredadores a quedarse cerca de las zonas con elevada densidad de alimento suplementario.

A pesar de que la práctica más extendida para el control de trips en el cultivo de pepino en Europa y la zona Mediterránea, es el uso de ácaros fitoseidos (Chambers et al. 1993; Shipp et al. 2004; Messelink et al. 2006; Calvo y Belda 2008), en el capítulo 3 de esta Tesis encontramos que el depredador *O. majusculus* podría ser un buen candidato para el control del trips en pepino de invernadero, ya que redujo de manera significativa las poblaciones de trips y consecuentemente, el daño producido en frutos por la plaga. Además, el suministro de alimentos suplementarios incrementó la abundancia de depredadores y mejoró la eficiencia de control de trips. En este capítulo, hemos confirmado que una única aplicación de alimento, en el momento de la inoculación del depredador *O. majusculus* fue suficiente para incrementar la población del depredador. Además también hemos comprobado el efecto positivo que puede tener, tanto en la instalación del depredador como en su eficacia de control, el suministrar de manera conjunta polen y cistos de *Artemia* sp.

Los alimentos suplementarios de origen vegetal también pueden suministrarse mediante plantas en flor que pueden aportar néctar (floral y extra floral) y polen. Estos alimentos pueden satisfacer las necesidades metabólicas y reproductivas de los enemigos naturales y por lo tanto mejorar su instalación en los cultivos (Quicke 1997). En el capítulo 4 de esta Tesis hemos encontrado que la disponibilidad de néctar de algunas plantas, influye de manera positiva en la longevidad y/o en la reproducción de los parasitoides de la polilla del tomate *T. absoluta*, *N. nr. artynes*, *S. nr. japonicus* y *B. nr. nigricans* y en la longevidad del parasitoide de *B. tabaci*, *E. mundus*, incrementando así su potencial biótico. De las especies vegetales analizadas, *L. maritima* y *F. esculentum* fueron las que mayor efecto tuvieron sobre la longevidad de los parasitoides estudiados. También *A. millefolium* y en menor medida *S. alba*, tuvieron un efecto positivo en la longevidad. Que unas especies tengan un efecto sobre la longevidad y otras no puede deberse a diversas causas, como la arquitectura de la flor, la posición de los nectarios o la composición del néctar (Patt et al. 1997; Vattala et al. 2006). La carga de oocitos maduros de las tres especies de parasitoides de *T. absoluta* también se vio afectada de manera positiva por la presencia de néctar. A parte de las especies anteriores citadas, *O. natrix* y *T. patula* también incrementaron la producción de oocitos de los parasitoides, confirmando que el néctar también juega un papel importante en la reproducción, aunque su efecto fue más variable que sobre la longevidad. En los parasitoides, el incremento de la reproducción está normalmente más asociado a la alimentación sobre el hospedero que sobre fuentes ricas en azúcares, aunque como hemos comprobado en este capítulo los azúcares también juegan un papel importante en la reproducción de los parasitoides.

No solo los parasitoides, sino también las plagas pueden beneficiarse de la presencia de flores. Es el caso de *T. absoluta*, especialmente los machos, que incrementaron su longevidad con el néctar de algunas de las especies florales

estudiadas, aunque esto puede estar más relacionado al hecho de que los machos de *T. absoluta* necesitan energía para poder acoplarse frecuentemente y esta energía la obtienen del néctar. Aunque el néctar beneficia a la plaga, hemos comprobado que el beneficio que pueden obtener los parasitoides es mayor, ya que al mejorar su longevidad y su reproducción también se está incrementando su tasa de parasitismo, por lo que el beneficio que obtienen los parasitoides sería mayor que el que pueden obtener los herbívoros. Sería interesante que estos estudios de laboratorio, pudieran completarse con estudios de campo que permitieran, en condiciones más próximas al cultivo, determinar los efectos beneficiosos que pueden aportar estos márgenes floridos sobre el control biológico.

En esta Tesis hemos comprobado que la adición de alimentos suplementarios puede mejorar sustancialmente el potencial biótico de cuatro especies de depredadores polífagos. Además hemos encontrado dos posibles alternativas más económicas que los huevos de *E. kuehniella* y que mejoran los parámetros biológicos en unos niveles similares a los de los huevos del lepidóptero. Tanto los cistos de *Artemia* sp. como el polen comercial de abeja son un buen alimento para aplicar en campo como alternativa a los huevos de *E. kuehniella*. En cuanto a la aplicación y puesta a punto de los programas de control biológico, el uso de *Artemia* sp. y polen comercial supondría un ahorro económico de aproximadamente de 740 y 890 €/Kg respectivamente, respecto al uso de huevos de *E. kuehniella*. Además estos alimentos no es necesario mantenerlos congelados hasta su utilización, a diferencia de los huevos de *E. kuehniella*, por lo que también supondría un ahorro en su mantenimiento. Así mismo, hemos determinado que la presencia de los cistos de *Artemia* sp. en el cultivo no condiciona la dispersión de los depredadores hacia las plantas infestadas. Además en condiciones de semi-campo, hemos determinado la eficacia de *O. majusculus* en el control de trips y como la adición de *Artemia* sp. y polen en el cultivo una única vez al liberar los

depredadores, pueden mejorar la eficacia de control de *O. majusculus* y su instalación en el cultivo.

Por otro lado, hemos determinado, en condiciones de laboratorio, los beneficios que pueden obtener cuatro especies de parasitoides, asociados al néctar floral de algunas especies vegetales, lo que facilitaría la puesta a punto de un margen florido que favorecería el control biológico por conservación y/o inoculación en cultivos hortícolas. La instalación en los cultivos de márgenes formados por las especies *F. esculentum*, *L. maritima*, *A. millefolium*, *S. alba*, *O. natrix* y *T. patula* proporcionarían a los parasitoides recursos que les permiten incrementar su potencial biótico. Todas las plantas anteriormente citadas se pueden cultivar o están disponibles comercialmente a precios no excesivamente elevados. Teniendo en cuenta los periodos de floración y su duración, la propuesta sería formar márgenes con una combinación de varias de estas especies. Tanto *F. esculentum* como *L. maritima* muestran un buen comportamiento para su incorporación en programas de manejo integrado de plagas. *Fagopyrum esculentum* germina con facilidad y florece en un corto periodo de tiempo. *Lobularia maritima*, prácticamente está florida todo el año. Con una combinación de estas dos plantas nos aseguraríamos la creación de márgenes floridos durante prácticamente todo el año. *Achillea millefolium* y *T. patula* también están disponibles comercialmente por lo que se podrían comprar ya en flor y trasplantar en los márgenes sin la necesidad esperar a que florezcan, optimizando tiempo y recursos.

### Conclusiones

- i. Los cistos de *Artemia* sp. son un buen alimento suplementario para mejorar la reproducción de los depredadores polífagos *Orius majusculus*, *Orius laevigatus*, *Macrolophus pygmaeus* y *Nesidiocoris tenuis* (Capítulo 1 y 2).
- ii. El polen comercial de abeja es un buen alimento suplementario para mejorar la supervivencia de las cuatro especies de depredadores polífagos estudiados (Capítulo 1 y 2).
- iii. Cuando solo es posible suministrar el alimento una única vez, cuando los depredadores son liberados en el cultivo, los cistos de *Artemia* sp. son la mejor alternativa a la utilización de huevos de *Ephestia kuehniella* para incrementar la longevidad de las dos especies de *Orius* y de las dos especies de míridos. (Capítulo 1 y 2).
- iv. La disponibilidad de cistos de *Artemia* sp. no retiene a los depredadores *O. laevigatus*, *O. majusculus* y *M. pygmaeus* en el punto de liberación y la dispersión en el cultivo está condicionada por la presencia de presa en las plantas circundantes (Capítulo 3).
- v. La adición de alimentos suplementarios ayuda a mejorar la instalación del depredador en el cultivo e incrementa la eficacia de *O. majusculus* en el control de *F. occidentalis* (Capítulo 3).
- vi. El néctar puede mejorar la longevidad de *Tuta absoluta*, especialmente la de los machos, por lo que algunas de las especies vegetales estudiadas pueden

- tener un cierto efecto negativo, al favorecer la proliferación de la plaga (Capítulo 4).
- vii. El néctar de *Fagopyrum esculentum* y *Lobularia maritima* tiene un efecto beneficioso sobre la longevidad de los parasitoides de *Tuta absoluta*, *Stenomesus* sp. nr. *japonicus*, *Necremnus* sp. nr. *artynes* y *Bracon* sp. nr. *nigricans* y del parasitoide de *Bemisia tabaci*, *Eretmocerus mundus*. En cuanto a su potencial reproductivo, *F. esculentum* es beneficiosa para *S.* nr. *japonicus* y *N.* nr. *artynes* y *L. maritima* lo es para *N.* nr. *artynes* y *B.* nr. *nigricans*. *Achillea millefolium* incrementa la supervivencia de los tres parasitoides de *T. absoluta* (Capítulo 4).
- viii. Ninguna especie de planta en flor estudiada es beneficiosa para todas las especies de parasitoides, por lo que es necesaria la instalación de márgenes formados por diversas especies vegetales para mejorar la eficacia de los parasitoides en el control biológico por conservación (Capítulo 4).

### Bibliografía

- Agustí N., Gabarra R. (2009a) Effect of adult age and insect density of *Dicyphus tamaninii* Wagner (Heteroptera: Miridae) on progeny. *Journal of Pest Science* 82:241–246.
- Agustí N., Gabarra R. (2009b) Development of a mass rearing protocol of the polyphagous predator *Dicyphus tamaninii* Wagner (Hemiptera: Miridae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 35:205–218.
- Albajes R., Alomar O. (1999) Current and potential use of polyphagous predators. In: Albajes R., Lenteren J.C. van, Gullino M.L., Elad Y. (eds) *Integrated Pest Diseases Management in Greenhouse Crops*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 265–275.
- Albajes R., Gullino M.L., van Lenteren J.C., Elad Y. (1999) *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*. Kluwer Academic Publishers., Dordrecht, The Netherlands.
- Alomar O., Albajes R. (2003) Habitat management for conservation of the native predator *Macrolophus caliginosus*. *Bulletin OILB/SROP* 26:7–11.
- Alomar O., Albajes R. (2005) Control Biológico de Plagas: Biodiversidad Funcional y Gestión del Agroecosistema. *Biojournal.net* 1–10.
- Alomar O., Goula M., Albajes R. (2002) Colonisation of tomato fields by predatory mirid bugs (Hemiptera: Heteroptera) in northern Spain. *Agriculture Ecosystems & Environment* 89:105–115.
- Alomar O., Wiedenmann R.N. (1996) *Zoophytophagous Heteroptera: implications for life history and integrated pest management*. Thomas Say Publications in Entomology. Entomological Society of America., Lanham, Maryland.
- Alvarado P., Baltà O., Alomar O. (1997) Efficiency of four heteroptera as predators of *Aphis gossypii* and *Macrosiphum euphorbiae* (Hom.: Aphididae). *Entomophaga* 42:215–226.
- Alvarez-Suarez J.M., Tulipani S., Romandini S., Bertoli E., Battino M. (2009) Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* 3:15–23.
- Araj S.E., Wratten S., Lister A., Buckley H. (2008) Floral diversity, parasitoids and hyperparasitoids – A laboratory approach. *Basic and Applied Ecology* 9:588–597.



## Bibliografia

---

- Arijs Y., De Clercq P. (2001) Rearing *Orius laevigatus* on cysts of the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Biological Control* 21:79–83.
- Arijs Y., De Clercq P. (2004) Liver-based artificial diets for the production of *Orius laevigatus*. *BioControl* 49:505–516.
- Arnó J., Alonso E., Gabarra R. (2003) Role of the parasitoid *Diglyphus isaea* (Walker) and the predator *Macrolophus caliginosus* Wagner in the control of leafminers. *Bulletin OILB/SROP* 26:79–84.
- Arnó J., Castañé C., Riudavets J., Gabarra R. (2010a) Risk of damage to tomato crops by the generalist zoophytophagous predator *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae). *Bulletin of entomological research* 100:105–115.
- Arnó J., Gabarra R., Alomar O. (2012) Hymenoptera abundance on candidate plants for conservation biological control. *IOBC/WPRS Bulletin* 75:13–16.
- Arnó J., Gabarra R., Tong-Xian L., Alvin M.S., Gerling D. (2010b) Natural enemies of *Bemisia tabaci*: Predators and parasitoids. In: Stansly P.A., Naranjo S.E. (eds) *Bemisia: bionomics and management of a global pest*. Springer, New York etc., pp 385–421.
- Arnó J., Roig J., Riudavets J. (2008) Evaluation of *Orius majusculus* and *O. laevigatus* as predators of *Bemisia tabaci* and estimation of their prey preference. *Biological Control* 44:1–6.
- Avilla J., Albajes R., Alomar O., Castañé C., Gabarra R. (2004) Biological control of whiteflies on vegetable crops. *Biocontrol in Protected Culture* 171–184.
- Baggen L.R., Gurr G.M. (1998) The influence of food on *Copidosoma koehleri* (Hymenoptera : Encyrtidae), and the use of flowering plants as a habitat management tool to enhance biological control of potato moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera : Gelechiidae). *Biological Control* 11:9–17.
- Balzan M. V., Wäckers F.L. (2013) Flowers to selectively enhance the fitness of a host-feeding parasitoid: Adult feeding by *Tuta absoluta* and its parasitoid *Necremnus artynes*. *Biological Control* 67:21–31.
- Barbosa P. (1998) Conservation biological control. Academic Press., San Diego, CA.
- Barry K.L., Wilder S.M. (2012) Macronutrient intake affects reproduction of a predatory insect. *Oikos* 1058–1064.

## Bibliografía

---

- Begum M., Gurr G.M., Wratten S.D., Hedberg P.R., Nicol H.I. (2006) Using selective food plants to maximize biological control of vineyard pests. *Journal of Applied Ecology* 43:547–554.
- Berndt L.A., Wratten S.D. (2005) Effects of alyssum flowers on the longevity, fecundity, and sex ratio of the leafroller parasitoid *Dolichogenidea tasmanica*. *Biological Control* 32:65–69.
- Bianchi F.J.J.A., Schellhorn N.A., van der Werf W. (2009) Predicting the time to colonization of the parasitoid *Diadegma semiclausum*: The importance of the shape of spatial dispersal kernels for biological control. *Biological Control* 50:267–274.
- Biondi A., Chailloux A., Lambion J., Han P., Zappalà L., Desneux N. (2013a) Indigenous natural enemies attacking *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Southern France. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 23:117–121.
- Biondi A., Desneux N., Amiens-Desneux E., Siscaro G., Zappalà L. (2013b) Biology and Developmental Strategies of the Palaearctic Parasitoid *Bracon nigricans* (Hymenoptera: Braconidae) on the Neotropical Moth *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Economic Entomology* 106:1638–1647.
- Bonte J., Vangansbeke D., Maes S., Bonte M., Conlong D., De Clercq P. (2012) Moisture source and diet affect development and reproduction of *Orius thripoborus* and *Orius naivashae*, two predatory anthocorids from southern Africa. *Journal of Insect Science* 12:1.
- Bonte M., De Clercq P. (2008) Developmental and reproductive fitness of *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) reared on factitious and artificial diets. *Journal of economic entomology* 101:1127–1133.
- Bosch J., Retana J., Cerdá X. (1997) Flowering phenology, floral traits and pollinator composition in a herbaceous Mediterranean plant community. *Oecologia* 109:583–591.
- Calvo F.J., Bolekmans K., Belda J.E. (2010) Control of *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in cucumber by *Amblyseius swirskii*. *BioControl* 56:185–192.
- Calvo F.J., Soriano J.D., Bolckmans K., Belda J.E. (2013) Host instar suitability and life-history parameters under different temperature regimes of *Necremnus artynes* on *Tuta absoluta*. *Biocontrol Science and Technology* 23:803–815.
- Calvo J., Belda J.E. (2008) Cucurbitáceas bajo abrigo. In: Jacas J., Urbaneja A. (eds) *Control Biológico de Plagas Agrícolas*. Phytoma España, Valencia, pp 423–434.

## Bibliografia

---

- Calvo J., Blockmans K., Stansly P.A., Urbaneja A. (2009) Predation by *Nesidiocoris tenuis* on *Bemisia tabaci* and injury to tomato. *Biocontrol* 54:237–246.
- Carnero A., Díaz S., Amador S., Hernández M., Hernández E. (2000) Impact of *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Hemiptera: Miridae) on whitefly populations in protected tomato crops. *Bulletin OILB SROP (France)* 23:259.
- Carvalho L.M., Bueno V.H.P., Castañé C. (2011) Olfactory response towards its prey *Frankliniella occidentalis* of wild and laboratory-reared *Orius insidiosus* and *Orius laevigatus*. *Journal of Applied Entomology* 135:177–183.
- Castañé C., Agustí N., Arnó J., Gabarra R., Riudavets J., Comas J., Alomar Ó. (2013) Taxonomic identification of *Macrolophus pygmaeus* and *Macrolophus melanotoma* based on morphometry and molecular markers. *Bulletin of entomological research* 103:204–15.
- Castañé C., Alomar O., Goula M., Gabarra R. (2004) Colonization of tomato greenhouses by the predatory mirid bugs *Macrolophus caliginosus* and *Dicyphus tamaninii*. *Biological Control* 30:591–597.
- Castañé C., Alomar O., Riudavets J. (2000) *Dicyphus tamaninii* in the biological control of cucumber pests. *Bulletin OILB/SROP* 23:253–256.
- Castañé C., Alomar O., Riudavets J., Gemeno C. (2006a) Reproductive traits of the generalist predator *Macrolophus caliginosus*. *IOBC/WPRS Bulletin* 29:229–234.
- Castañé C., Arnó J., Gabarra R., Alomar O. (2011) Plant damage to vegetable crops by zoophytophagous mirid predators. *Biological Control* 59:22–29.
- Castañé C., Quero R., Riudavets J. (2006b) The brine shrimp *Artemia* sp as alternative prey for rearing the predatory bug *Macrolophus caliginosus*. *Biological Control* 38:405–412.
- Castañé C., Riudavets J., Yano E. (1999) Biological control of thrips. In: Albajes R., Gullino M.L., van Lenteren J.C. (eds) *Integrated pest and disease management in greenhouse crops*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 244–253.
- Chailleux A., Desneux N., Arnó J., Gabarra R. (2014) Biology of two key Palaearctic larval ectoparasitoids when parasitizing the invasive pest *Tuta absoluta*. *Journal of Pest Science* 1–8.

## Bibliografia

---

- Chambers R.J., Long S., Helyer N.L. (1993) Effectiveness of *Orius laevigatus* (Hem.: Anthocoridae) for the control of *Frankliniella occidentalis* on cucumber and pepper in the Uk. *Biocontrol Science and Technology* 3:295–307.
- De Clercq P., Arijs Y., van Meir T., van Stappen G., Sorgeloos P., Dewettinck K., Rey M., Grenier S., Febvay G. (2005) Nutritional value of brine shrimp cysts as a factitious food for *Orius laevigatus* (Heteroptera: Anthocoridae). *Biocontrol Science and Technology* 15:467–479.
- Cocuzza G.E., De Clercq P., Lizzio S., Van de Veire M., Tirry L., Degheele D., Vacante V. (1997a) Life tables and predation activity of *Orius laevigatus* and *O. albidipennis* at three constant temperatures. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 85:189–198.
- Cocuzza G.E., De Clercq P., van de Veire M., DeCock A., Degheele D., Vacante V. (1997b) Reproduction of *Orius laevigatus* and *Orius albidipennis* on pollen and *Ephestia kuehniella* eggs. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 82:101–104.
- Coll M., Guershon M. (2002) Omnivory in terrestrial arthropods: Mixing plant and prey diets. *Annual Review of Entomology* 47:267–297.
- Coll M., Ruberson J.R. (1998) Predatory Heteroptera: their ecology and use in biological control. 233.
- Crum D.A., Weiser L.A., Stamp N.E. (1998) Effects of prey scarcity and plant material as a dietary supplement on an insect predator. *Oikos* 81:549.
- DeBach P. (1964) Biological control of insect pests and weeds. Chapman & Hall Ltd., London.
- Delphia C., Mescher M., De Moraes C. (2007) Induction of plant volatiles by herbivores with different feeding habits and the effects of induced defenses on host-plant selection by thrips. *Journal of chemical ecology* 33:997–1012.
- Desneux N., Luna M.G., Guillemaud T., Urbaneja A. (2011) The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *Journal of Pest Science* 84:403–408.
- Desneux N., Wajnberg E., Wyckhuys K., Burgio G., Arpaia S., Narvaez-Vasquez C.A., González-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.

## Bibliografia

---

- Dib H., Libourel G., Warlop F. (2012) Entomological and functional role of floral strips in an organic apple orchard: Hymenopteran parasitoids as a case study. *Journal of Insect Conservation* 16:315–318.
- Dicke M. (1994) Local and systemic production of volatile herbivore-induced terpenoids: their role in plant-carnivore mutualism. *Journal of Plant Physiology* 143:465–472.
- Dicke M. (1999) Evolution of induced indirect defence of plants. In: Tollrian R., Harvell C.D. (eds) *The Ecology and Evolution of Inducible Defences*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, pp 62–88.
- Dicke M., Hilker M. (2003) Induced plant defences: from molecular biology to evolutionary ecology. *Basic and Applied Ecology* 4:3–14.
- Dicke M., Sabelis M.W., Takabayashi J., Bruin J., Posthumus M.A. (1990) Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: Prospects for application in pest control. *Journal of chemical ecology* 16:3091–118.
- Eilenberg J., Hajek A., Lomer C. (2001) Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46:387–400. doi: 10.1023/A:1014193329979
- Ellner S., McCauley E., Kendall B. (2001) Habitat structure and population persistence in an experimental community. *Nature* 412:538–543.
- van Emden H.F. (1963) Observations on the effect of flowers on the activity of parasitic Hymenoptera. *EntomolMonMag* 98:265–270.
- Eubanks M.D., Styrsky J.D. (2005) Effects of plant feeding on the performance of omnivorous “predators”. In: Wäckers F.L., van Rijn P.C.J., Bruin J. (eds) *Plant-Provided Food for Carnivorous Insects*. Cambridge University Press., New York, U.S.A., pp 148–177.
- Fadamiro H.Y., Heimpel G.E. (2001) Effects of partial sugar deprivation on lifespan and carbohydrate mobilization in the parasitoid *Macrocentrus grandii* (Hymenoptera: Braconidae). *Annals of the Entomological Society of America* 94:909–916.
- Ferkovich S.M., Shapiro J.P. (2004) Comparison of prey-derived and non-insect supplements on egg-laying of *Orius insidiosus* maintained on artificial diet as adults. *Biological Control* 31:57–64.
- Ferracini C., Ingegno B.L., Navone P., Ferrari E., Mosti M., Tavella L., Alma A. (2012) Adaptation of indigenous larval parasitoids to *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Italy. *Journal of Economic Entomology* 105:1311–1319.

## Bibliografia

---

- Fischer S., Linder C., Freuler J. (1992) Biology and utilization of *Orius majusculus* Reuter (Heteroptera, Anthocoridae) for the control of the thrips *Frankliniella occidentalis* Perg. and *Thrips tabaci* Lind., in greenhouses. *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture* 24:119–127.
- Gabarra R., Alomar O., Castañé C., Goula M., Albajes R. (2004) Movement of greenhouse whitefly and its predators between in- and outside of Mediterranean greenhouses. *Agriculture Ecosystems & Environment* 102:341–348.
- Gabarra R., Arnó J., Lara L., Verdú M.J., Ribes A., Beitia F., Urbaneja A., Téllez M. del M., Mollá O., Riudavets J. (2014) Native parasitoids associated with *Tuta absoluta* in the tomato production areas of the Spanish Mediterranean Coast. *BioControl* 59:45–54.
- Gabarra R., Arnó J., Riudavets J. (2008) Tomate. In: Jacas J., Urbaneja A. (eds) *Phytoma España, Valencia*, pp 410–422.
- Gabarra R., Besri M. (1999) Tomatoes. In: Albajes R., Gullino M.L., van Lenteren J.C., Elad Y. (eds) *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 420–434.
- Gabarra R., Castañé C., Albajes R. (1995) The mirid bug *Dicyphus tamaninii* as a greenhouse whitefly and western flower thrips predator on cucumber. *Biocontrol Science and Technology* 5:475–488.
- Gardiner M.M., Fiedler A.K., Costamagna A.C., Landis D.A. (2008) Integrating conservation biological control into IPM systems. In: Radcliffe E.B., Hutchinson W.D., Cancelado R.E. (eds) *Integrated Pest Management*. Cambridge University, pp 151–162.
- Geneau C.E., Wäckers F.L., Luka H., Daniel C., Balmer O. (2012) Selective flowers to enhance biological control of cabbage pests by parasitoids. *Basic and Applied Ecology* 13:85–93.
- Gerling D., Alomar O., Arno J. (2001) Biological control of *Bemisia tabaci* using predators and parasitoids. *Crop Protection* 20:779–799.
- Gerling D., Quicke D.L.J., Orion T. (1998) Oviposition mechanisms in the whitefly parasitoids *Encarsia transvena* and *Eretmocerus mundus*. *BioControl* 43:289–297.
- Gillespie D.R. (1989) Biological Control of Thrips [Thysanoptera, Thripidae] on Greenhouse Cucumber by *Amblyseius cucumeris*. *Entomophaga* 34:185–192.

## Bibliografía

---

- Gillespie D.R., Mcgregor R.R. (2000) The functions of plant feeding in the omnivorous predator *Dicyphus hesperus*: water places limits on predation. *Ecological Entomology* 25:380–386.
- Goula M., Alomar O. (1994) Míridos (Heteroptera: Miridae) de interés en el control integrado de plagas en el tomate. Guía para su identificación. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 20:131–143.
- Greany P., Hagen K. (1981) Prey selection. In: Nordlund D.A., Jones R.L., Lewis W.J. (eds) *Semiochemicals: Their Role in Pest Control*. Wiley, New York, USA, pp 121–135.
- Gurr G.M., Wratten S.D. (1999) “Integrated biological control”: a proposal for enhancing success in biological control. *International Journal of Pest Management* 45:81–84.
- Gurr G.M., Wratten S.D., Altieri M.A. (2004) *Ecological engineering for pest management: advances in habitat manipulation for arthropods*. 232.
- Hagen K.S. (1986) Ecosystem analysis: plant cultivars (HPR), entomophagous species and food supplements. In: Boetherl D.J., Eikanbarry R.D. (eds) *Interaction of plant resistance and parasitoids and predators of insects*. Chichester: Ellis Horwood Limited, Wiley, New York, USA, pp 151–197.
- Hanski I., Gilpin M. (1997) *Metapopulation biology: ecology, genetics, and evolution*. Academic Press., San Diego EE.UU.
- Hausmann C., Wäckers F.L., Dorn S. (2005) Sugar convertibility in the parasitoid *Cotesia glomerata* (Hymenoptera: Braconidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 60:223–229.
- Heinz K.M., Driesche R.G. van., Parella M.P. (2004) *Biocontrol in protected culture*. Ball Publishing., Batavia.
- Holland M.D., Hastings A. (2008) Strong effect of dispersal network structure on ecological dynamics. *Nature* 456:792–4.
- Hopkinson J.E., Zalucki M.P., Murray D.A.H. (2013) Honeydew as a source of nutrition for *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae): effect of adult diet on lifespan and egg load. *Australian Journal of Entomology* 52:14–19.
- Hulshof J., Ketoja E., Vanninen I. (2003) Life history characteristics of *Frankliniella occidentalis* on cucumber leaves with and without supplemental food. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 108:19–32.

## Bibliografia

---

- Irvin N.A., Hoddle M.S., Castle S.J. (2007) The effect of resource provisioning and sugar composition of foods on longevity of three *Gonatocerus* spp., egg parasitoids of *Homalodisca vitripennis*. *Biological Control* 40:69–79.
- Irvin N.A., Scarratt S.L., Wratten S.D., Frampton C.M., Chapman R.B., Tylianakis J.M. (2006) The effects of floral understoreys on parasitism of leafrollers (Lepidoptera: Tortricidae) on apples in New Zealand. *Agricultural and Forest Entomology* 8:25–34.
- Ives A.R., Settle W.H. (1997) Metapopulation Dynamics and Pest Control in Agricultural Systems. *The American Naturalist* 149:220.
- Janssen A., Bruin J., Jacobs G., Schraag R., Sabelis M.W. (1997) Predators use volatiles to avoid prey patches with conspecifics. *Journal of Animal Ecology* 66:223–232.
- Janssen A., Pallini A., Venzon M., Sabelis M.W. (1998) Behaviour and indirect interactions in food webs of plant-inhabiting arthropods. *Experimental and Applied Acarology* 22:497–521.
- Jervis M.A., Kidd N.A.C., Fitton M.G., Huddleston T., Dawah H.A. (1993) Flower-Visiting by Hymenopteran Parasitoids. *Journal of Natural History* 27:67–105.
- Jervis M.A., Lee J.C., Heimpel G.E. (2004) Use of behavioural and life-history studies to understand the effects of habitat manipulation. In: Gurr G.M., Wratten S.D., Altieri M.A. (eds) *Ecological Engineering for Pest Management: Advances in Habitat Manipulation for Arthropods*. CSIRO Publishing, Australia, pp 65–100.
- Johanowicz D.L., Mitchell E.R. (2000) Effects of sweet alyssum flowers on the longevity of the parasitoid wasps *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae) and *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Florida Entomologist* 41–47.
- Jonsson M., Wratten S.D., Landis D.A., Gurr G.M. (2008) Recent advances in conservation biological control of arthropods by arthropods. *Biological Control* 45:172–175.
- Kakimoto K., Urano S., Noda T., Matuo K., Sakamaki Y., Tsuda K., Kusigemati K. (2005) Comparison of the reproductive potential of three *Orius* species, *O. strigicollis*, *O. sauteri*, and *O. minutus* (Heteroptera: Anthocoridae), using eggs of the Mediterranean flour moth as a food source. *Applied Entomology and Zoology* 40:247–255.
- Karimy A., Ashouri A., Kharazi Pakdel A., Goldansaz S.H., Kosari A.A., Moayeri H.R.S. (2006) Olfactory response of the predatory bug, *Orius albidipennis* to volatile blends



## Bibliografía

---

- of strawberry and cucumber infested by spider mite. *Communications in agricultural and applied biological sciences*. pp 399–402.
- Kim D.I., Park J.D., Kim S.G., Kim S.S., Paik C.H. (2004) Biological Control of *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae) with *Orius strigicollis* (Hemiptera: Anthocoridae) on cucumber in plastic houses in the southern region of Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 7:311–315.
- Lacasa A., Sánchez J.A., Lacasa M.C. (2008) Control Biológico de trips. In: Jacas J., Urbaneja A. (eds) *Control Biológico de Plagas Agrícolas*. Phytoma España, Valencia, pp 179–198.
- Landis D.A., Werf W. (1997) Early-season predation impacts the establishment of aphids and spread of beet yellows virus in sugar beet. *Entomophaga* 42:499–516.
- Landis D.A., Wratten S.D., Gurr G.M. (2000) Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annual Review of Entomology* 45:175–201.
- Lavandero B.I., Wratten S.D., Didham R.K., Gurr G.M. (2006) Increasing floral diversity for selective enhancement of biological control agents: A double-edged sword? *Basic and Applied Ecology* 7:236–243.
- Lee M.S., Albajes R., Eizaguirre M. (2014) Mating behaviour of female *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): polyandry increases reproductive output. *Journal of Pest Science*.
- Léger P., Bengston D.A., Simpson K.L., Sorgeloos P. (1986) The use and nutritional value of *Artemia* as a food source. In: Barnes M. (ed) *Oceanography and marine biology: An annual review*. Aberdeen University Press., Aberdeen, pp 521–623.
- Lenfant C., Ridray G., Schoen L. (2000) Biopropagation of *Macrolophus caliginosus* Wagner for a quicker establishment in Southern tomato greenhouses. *Bulletin OILB/SROP* 23:247–251.
- van Lenteren J.C. (2011) The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl* 57:1–20.
- van Lenteren J.C., Manzaroli G. (1999) Evaluation and use of predators and parasitoids for biological control of pests in greenhouses. In: Albajes R., Lodovica Gullino M., van Lenteren J.C., Elad Y. (eds) *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 183–201.

## Bibliografia

---

- van Lenteren J.C., Martin N.A. (1999) Biological control of whiteflies. In: Albajes R., Gullino M.L., van Lenteren J.C., Elad Y. (eds) Integrated pest and disease management in greenhouse crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 216–545.
- van Lenteren J.C., Tommasini M.G. (2003) Mass production, storage, shipment and release of natural enemies. In: Vanlenteren J.C. (ed) Quality control and production of biological control agents: Theory and testing procedures. Oxford Univ. Press., New York, pp 181–189.
- van Lenteren J.C., Vianen A., Gast H.F., Kortenhoff A. (1987) The parasite-host relationship between *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae) and *Trialetrodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae). Journal of Applied Entomology 103:69–84.
- Letourneau D.K. (1988) Conceptual framework of three-trophic-level interactions. In: Barbosa P., Letourneau D.K. (eds) Novel aspects of insect-plant interactions. Wiley, New York, pp 1–9.
- Lundgren J.G. (2009) Relationships of natural enemies and non-prey foods. (Vol. 7) Springer.
- Lykouressis D., Giatropoulos A., Perdikis D., Favas C. (2008) Assessing the suitability of noncultivated plants and associated insect prey as food sources for the omnivorous predator *Macrolophus pygmaeus* (Hemiptera: Miridae). Biological Control 44:142–148.
- Ma W.K., Ramaswamy S.B. (1987) Histological changes during ovarian maturation in the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Debeauvois, palisot) (Hemiptera, Miridae). International journal of insect morphology & embryology 16:309–322.
- MAGRAMA (2011) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). <http://www.magrama.gob.es/es/>. Accessed 6 Feb 2014
- Maleki F., Ashouri A., Mohaghegh J., Bandani A.R. (2006) Effect of some diets on *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hemiptera: Miridae) fitness under laboratory conditions. Commun Agric Appl Biol Sci 71:393–397.
- Malo S. (2009) Control biològic de Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae): Eretmocerus mundus (Hymenoptera: Aphelinidae), *Macrolophus pygmaeus* (Heteroptera: Miridae) i la seva interacció. Tesis Doctoral, Universitat de Lleida.

## Bibliografía

---

- Manojlovic B., Zabel A., Kostic M., Stankovic S. (2000) Effect of nutrition of parasites with nectar of melliferous plants on parasitism of the elm bark beetles (Col., Scolytidae). *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie* 124:155–161.
- Martínez-Cascales J.I., Cenis J.L., Cassis G., Sánchez J.A. (2006) Species identity of *Macrolophus melanotoma* (Costa 1853) and *Macrolophus pygmaeus* (Rambur 1839) (Insecta: Heteroptera: Miridae) based on morphological and molecular data and bionomic implications. *Insect Systematics & Evolution* 37:385–404.
- McMurtry J.A., Scriven G.T. (1966) Studies on predator-prey interactions between *Amblyseius hibisci* and *Oligonychus punicae* (Acarina - Phytoseiidae Tetranychidae) under greenhouse conditions. *Annals of the Entomological Society of America* 59:793–800.
- Mensah R.K., Singleton A. (2003) Optimum timing and placement of a supplementary food spray Envirofeast® for the establishment of predatory insects of *Helicoverpa* spp. in cotton systems in Australia. *International Journal of Pest Management* 49:163–168.
- Messelink G.J., Van Steenpaal S.E.F., Ramakers P.M.J. (2006) Evaluation of phytoseiid predators for control of western flower thrips on greenhouse cucumber. *BioControl* 51:753–768.
- Moayeri H.R.S., Ashouri A., Brodsgaard H.F., Enkegaard A. (2006) Odour-mediated responses of a predatory mirid bug and its prey, the two-spotted spider mite. *Experimental and Applied Acarology* 40:27–36.
- Moayeri H.R.S., Ashouri A., Poll L., Enkegaard A. (2007) Olfactory response of a predatory mirid to herbivore induced plant volatiles: multiple herbivory vs. single herbivory. *Journal of Applied Entomology* 131:326–332.
- Montserrat M., Albajes R., Castañé C. (2004) Behavioral responses of three plant-inhabiting predators to different prey densities. *Biological Control* 30:256–264.
- Moreno-Ripoll R., Agustí N., Berruezo R., Gabarra R. (2012) Conspecific and heterospecific interactions between two omnivorous predators on tomato. *Biological Control* 62:189–196.
- Morris J.E. (1971) Hydration, its reversibility, and beginning of development in brine shrimp, *Artemia salina*. *Comparative biochemistry and physiology* 39:843–857.

## Bibliografia

---

- Nafziger Jr. T.D., Fadamiro H.Y. (2011) Suitability of some farmscaping plants as nectar sources for the parasitoid wasp, *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae): Effects on longevity and body nutrients. *Biological Control* 56:225–229.
- Nakashima Y., Hirose Y. (1999) Trail sex pheromone as a cue for searching mates in an insect predator *Orius sauteri*. *Ecological Entomology* 24:115–117.
- Naranjo S.E., Gibson R.L. (1996) Phytophagy in predaceous Heteroptera: effects on life history and population dynamics. In: Alomar O., Wiedenmann R.N. (eds) Zoophytophagous Heteroptera: implications for life history and integrated pest management. Thomas Say Publ. Entomol., Lanham, MD., pp 57–93.
- Nicoli G., Burgio G. (1997) Mediterranean biodiversity as source of new entomophagous species for biological control in protected crops. *IOBC/WPRS Bulletin* 20:27–38.
- Nogueira C., Iglesias A., Feas X., Estevinho L.M. (2012) Commercial Bee Pollen with Different Geographical Origins: A Comprehensive Approach. *International Journal of Molecular Sciences* 13:11173–11187.
- Nomikou M., Janssen A., Schraag R., Sabelis M.W. (2001) Phytoseiid predators as potential biological control agents for *Bemisia tabaci*. *Experimental and Applied Acarology* 25:271–291.
- Nomikou M., Janssen A., Schraag R., Sabelis M.W. (2004) Vulnerability of *Bemisia tabaci* immatures to phytoseiid predators: Consequences for oviposition and influence of alternative food. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 110:95–102.
- Nomikou M., Sabelis M.W., Janssen A. (2010) Pollen subsidies promote whitefly control through the numerical response of predatory mites. *Biocontrol* 55:253–260.
- Olson D.L., Nechols J.R. (1995) Effects of squash leaf trichome exudates and honey on adult feeding, survival, and fecundity of the squash bug (Heteroptera: Coreidae) egg parasitoid *Gryon pennsylvanicum* (Hymenoptera: Scelionidae). *Environmental Entomology* 24:454–458.
- Pallini A., Janssen A., Sabelis M.W. (1997) Odour-mediated responses of phytophagous mites to conspecific and heterospecific competitors. *Oecologia* 110:179–185.
- Patt J.M., Hamilton G.C., Lashomb J.H. (1997) Foraging success of parasitoid wasps on flowers: Interplay of insect morphology, floral architecture and searching behavior. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83:21–30.

## Bibliografia

---

- Perdikis D., Alomar O. (2011) Heteropteran predators and their role in biological control in agroecosystems. *Biological Control* 59:1–69.
- Perdikis D., Fantinou A., Lykouressis D. (2011) Enhancing pest control in annual crops by conservation of predatory Heteroptera. *Biological Control* 59:13–21.
- Perdikis D., Lykouressis D. (2000) Effects of various items, host plants, and temperatures on the development and survival of *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hemiptera: Miridae). *Biological Control* 17:55–60.
- Perdikis D., Lykouressis D. (2004) *Macrolophus pygmaeus* (Hemiptera: Miridae) population parameters and biological characteristics when feeding on eggplant and tomato without prey. *Journal of economic entomology* 97:1291–1298.
- Pickett C.C.H., Bugg R.L. (1998) Enhancing biological control: habitat management to promote natural enemies of agricultural pests. University of California Press.
- Portillo N., Alomar O., Wäckers F.L. (2012) Nectarivory by the plant-tissue feeding predator *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Heteroptera: Miridae): Nutritional redundancy or nutritional benefit? *Journal of insect physiology* 58:397–401.
- Pumariño L., Alomar O. (2012) The role of omnivory in the conservation of predators: *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae) on sweet alyssum. *Biological Control* 62:24–28.
- Pumariño L., Alomar O., Lundgren J.G. (2012) Effects of floral and extrafloral resource diversity on the fitness of an omnivorous bug, *Orius insidiosus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 145:181–190.
- Put K., Bollens T., Wäckers F.L., Pekas A. (2012) Type and spatial distribution of food supplements impact population development and dispersal of the omnivore predator *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Hemiptera: Miridae). *Biological Control* 63:172–180.
- Quicke D.L. (1997) *Parasitic Wasps*. Chapman & Hall Ltd., London.
- Rahat S., Gurr G.M., Wratten S.D., JianHua M., Neeson R. (2005) Effect of plant nectars on adult longevity of the stinkbug parasitoid, *Trissolcus basalus*. *International Journal of Pest Management* 51:323–326.
- Rajabpor A., Seraj A.A., Allahyari H., Shishehbor P. (2011) Evaluation of *Orius laevigatus* Fiber (Heteroptera: Anthocoridae) for Biological Control of *Thrips palmi*

## Bibliografia

---

- Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) on Greenhouse Cucumber in South of Iran. *Asian Journal of Biological Sciences* 4:457–467.
- Ramakers P.M.J., O’Niell T.M. (1999) Cucurbits. In: Albajes R., Gullino M.L., van Lenteren J.C., Elad Y. (eds) *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 435–453.
- Riddick E.W. (2009) Benefits and limitations of factitious prey and artificial diets on life parameters of predatory beetles, bugs, and lacewings: a mini-review. *BioControl* 54:325–339.
- van Rijn P.C.J., van Houten Y.M., Sabelis M.W. (2002) How plants benefit from providing food to predators even when it is also edible to herbivores. *Ecology* 83:2664–2679.
- van Rijn P.C.J., Tanigoshi L.K. (1999) Pollen as food for the predatory mites *Iphiseius degenerans* and *Neoseiulus cucumeris* (Acari : Phytoseiidae): dietary range and life history. *Experimental and Applied Acarology* 23:785–802.
- Riudavets J., Castañé C. (1998) Identification and evaluation of native predators of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) in the Mediterranean. *Environmental Entomology* 27:86–93.
- Rivero A., Casas J. (1999) Incorporating physiology into parasitoid behavioral ecology: the allocation of nutritional resources. *Researches on Population Ecology* 41:39–45.
- Rodriguez-Saona C., Crafts-Brandner S.J., Cañas L.A. (2003) Volatile emissions triggered by multiple herbivore damage: beet armyworm and whitefly feeding on cotton plants. *Journal of Chemical Ecology* 29:2539–2550.
- Rodriguez-Saona C., Crafts-Brandner S.J., III L.W., Paré P.W. (2002) *Lygus hesperus* feeding and salivary gland extracts induce volatile emissions in plants. *Journal of Chemical Ecology* 28:1733–1747.
- Rosenheim J.A., Welter S.C., Johnson M.W., Mau R.F.L., Gusukumaminuto L.R. (1990) Direct feeding damage on cucumber by mixed-species infestations of *Thrips palmi* and *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera, Thripidae). *Journal of economic entomology* 83:1519–1525.
- Ruppel R.F. (1983) Cumulative insect-days as an index of crop protection. *Journal of Economic Entomology* 76:375–377.

## Bibliografía

---

- Sanchez J., Martinez-Cascales J., Lacasa A. (2003) Abundance and wild host plants of predator mirids (Heteroptera: Miridae) in horticultural crops in the Southeast of Spain. *IOBC/wprs Bull* 26:147–151.
- Sánchez J.A., Alcazar A., Lacasa A., Llamas A., Bielza P. (2000) Integrated pest management strategies in sweet pepper plastic houses in the Southeast of Spain. *Bulletin OILB/SROP* 23:21–30.
- Sánchez J.A., Lacasa A. (2008) Impact of the zoophytophagous plant bug *Nesidiocoris tenuis* (Heteroptera: Miridae) on tomato yield. *Journal of economic entomology* 101:1864–1870.
- Sánchez J.A., Lacasa A., Arnó J., Castañé C., Alomar O. (2009) Life history parameters for *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Het., Miridae) under different temperature regimes. *Journal of Applied Entomology* 133:125–132.
- SAS Institute (2006) Enterprise Guide v. 4.2. SAS Institute, Cary, NC.
- Settle W.H., Ariawan H., Astuti E.T., Cahyana W., Hakim A.L., Hindayana D., Lestari A.S. (1996) Managing tropical rice pests through conservation of generalist natural enemies and alternative prey. *Ecology* 77:1975–1988.
- Shipp J., Wang K., Binns M. (2000) Economic injury levels for western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) on greenhouse cucumber. *Journal of economic entomology* 93:1732–1740.
- Shipp J.L., Ramakers P.M.J., Heinz K.M. (2004) Biological control of thrips on vegetable crops. In: Heinz K.M., Driesche R.G. van, Parella M.P. (eds) *Biocontrol in Protected Culture*. Ball Publishing, Batavia, USA, pp 265–276.
- Siekmann G., Tenhumberg B., Keller M.A. (2001) Feeding and survival in parasitic wasps: sugar concentration and timing matter. *Oikos* 95:425–430.
- Silveira L.C.P., Berti Filho E., Pierre L.S.R., Peres F.S.C., Louzada J.N.C. (2009) Marigold (*Tagetes erecta* L.) as an attractive crop to natural enemies in onion fields. *Scientia Agricola* 66:780–787.
- Sobhy I.S., Sarhan A.A., Shoukry A.A., El-Kady G.A., Mandour N.S., Reitz S.R. (2010) Development, consumption rates and reproductive biology of *Orius albidipennis* reared on various prey. *Biocontrol* 55:753–765.

## Bibliografía

---

- Stansly P., Calvo J., Urbaneja A. (2005a) Augmentative biological control of *Bemisia tabaci* biotype “Q” in Spanish greenhouse pepper production using *Eretmocerus* spp. *Crop Protection* 24:829–835.
- Stansly P.A., Calvo J., Urbaneja A. (2005b) 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.
- Takabayashi J., Dicke M. (1996) Plant—carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Trends in Plant Science* 1:109–113.
- Takasu K., Lewis W.J. (1995) Importance of adult food sources to host searching of the larval parasitoid *Microplitis croceipes*. *Biological Control* 5:25–30.
- Tatemoto S., Shimoda T. (2008) Olfactory responses of the predatory mites (*Neoseiulus cucumeris*) and insects (*Orius strigicollis*) to two different plant species infested with onion thrips (*Thrips tabaci*). *Journal of chemical ecology* 34:605–613.
- Taylor A. (1990) Metapopulations, dispersal, and predator-prey dynamics: an overview. *Ecology* 71:429–433.
- Telenga N.A. (1958) Biological method of pest control in crops and forest plants in the USSR. Report of the Soviet Delegation. Ninth International Conference on Quarantine and Plant Protection, Moscow. pp 1–15.
- Thompson S.N. (1999) Nutrition and culture of entomophagous insects. *Annual Review of Entomology* 44:561–592.
- Tumlinson J. (1993) Semiochemically mediated foraging behavior in beneficial parasitic insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 22:385–391.
- Tumlinson J.H., Turlings T.C.J., Lewis W.J. (1993) Semiochemically mediated foraging behavior in beneficial parasitic insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 22:385–391.
- Turlings T.C., Tumlinson J.H., Lewis W.J. (1990) Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science (New York, NY)* 250:1251–3.
- Urbaneja A., Desneux N., Gabarra R., Arnó J., González-Cabrera J., Mafra Neto A., Stoltman L., Pinto A. de S., Parra J.R.P., Peña J.E. (2013) Biology, ecology and management of the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. In: Peña J.E. (ed) Potential invasive pests of agricultural crops. CABI, Wallingford, pp 98–125.



## Bibliografia

---

- Urbaneja A., González-Cabrera J., Arnó J., Gabarra R. (2012) Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. *Pest ManagSci* 68:1215–1222.
- Urbaneja A., Monton H., Mollà O. (2009) Suitability of the tomato borer *Tuta absoluta* as prey for *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis*. *Journal of Applied Entomology* 133:292–296.
- Urbaneja A., Sánchez E., Stansly P.A. (2006) Life history of *Eretmocerus mundus*, a parasitoid of *Bemisia tabaci*, on tomato and sweet pepper. *BioControl* 52:25–39.
- Urbaneja A., Tapia G., Stansly P. (2005) Influence of host plant and prey availability on developmental time and survivorship of *Nesidiocoris tenuis* (Het.: Miridae). *Biocontrol Science and Technology* 15:513–518.
- Urbaneja A., Vercher R., Navarro V., García Marí F., Porcuna J.L. (2007) La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. *Phytoma España* 194:16–23.
- Urbaneja-Bernat P., Alonso M., Tena A., Bolckmans K., Urbaneja A. (2012) Sugar as nutritional supplement for the zoophytophagous predator *Nesidiocoris tenuis*. *Biocontrol* 58:57–64.
- Vandekerkhove B., van Baal E., Bolckmans K., De Clercq P. (2006) Effect of diet and mating status on ovarian development and oviposition in the polyphagous predator *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera : Miridae). *Biological Control* 39:532–538.
- Vandekerkhove B., De Clercq P. (2010) Pollen as an alternative or supplementary food for the mirid predator *Macrolophus pygmaeus*. *Biological Control* 53:238–242.
- Vandekerkhove B., Parmentier L., van Stappen G., Grenier S., Febvay G., Rey M., De Clercq P. (2009) *Artemia* cysts as an alternative food for the predatory bug *Macrolophus pygmaeus*. *Journal of Applied Entomology* 133:133–142.
- Vattala H.D., Wratten S.D., Phillips C.B., Wäckers F.L. (2006) The influence of flower morphology and nectar quality on the longevity of a parasitoid biological control agent. *Biological Control* 39:179–185.
- Venzon M., Janssen A., Sabelis M.W. (1999) Attraction of a generalist predator towards herbivore-infested plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 93:305–314.
- Vet L.E.M., Dicke M. (1992) Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology* 37:141–172.

## Bibliografia

---

- Wäckers F.L. (2004) Assessing the suitability of flowering herbs as parasitoid food sources: flower attractiveness and nectar accessibility. *Biological Control* 29:307–314.
- Wäckers F.L. (1994) The effect of food deprivation on the innate visual and olfactory preferences in the parasitoid *Cotesia rubecula*. *Journal of insect physiology* 40:641–649.
- Wäckers F.L. (2005) Suitability of (extra-) floral nectar, pollen, and honeydew as insect food sources. In: Wäckers F.L., van Rijn P.C.J., Bruin J. (eds) *Plant-Provided food for carnivorous insects: A protective mutualism and its applications*. Cambridge University Press, Cambridge, UK., pp 17–74.
- Wäckers F.L. (2001) A comparison of nectar- and honeydew sugars with respect to their utilization by the hymenopteran parasitoid *Cotesia glomerata*. *Journal of insect physiology* 47:1077–1084.
- Wäckers F.L., van Rijn P.C.J., Bruin J. (2005) *Plant-provided food for carnivorous insects: a protective mutualism and its applications*. Cambridge University Press., Cambridge (UK).
- Wäckers F.L., Romeis J., van Rijn P.C.J. (2007) Nectar and pollen feeding by insect herbivores and implications for multitrophic interactions. *Annual Review of Entomology* 52:301–323.
- Wade M., Kehrli P., Wratten S. (2005) Boosting biological control: Do we use a “bouquet” or a “KISS” approach to win a natural enemy’s heart. Summary of poster presentation at the Second International Symposium on Biological Control of Arthropods. p 21.
- Wade M.R., Hopkinson J.E., Zalucki M.P. (2008a) Influence of food supplementation on the fitness of two biological control agents: a predatory nabid bug and a bollworm pupal parasitoid. *Journal of Pest Science* 81:99–107.
- Wade M.R., Zalucki M.P., Wratten S.D., Robinson K.A. (2008b) Conservation biological control of arthropods using artificial food sprays: Current status and future challenges. *Biological Control* 45:185–199.
- Walling L. (2000) The myriad plant responses to herbivores. *Journal of plant growth regulation* 19:195–216.
- Welter S.C., Rosenheim J.A., Johnson M.W., Mau R.F.L., Gusukuma-Minuto L.R. (1990) Effects of *Thrips palmi* and western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) on the

## Bibliografia

---

- yield, growth, and carbon allocation pattern in cucumbers. *Journal of Economic Entomology* 83:2092–2101.
- Wilson L.J., Bauer L.R., Walter G.H. (1996) “Phytophagous” thrips are facultative predators of twospotted spider mites (Acari: Tetranychidae) on cotton in Australia. *Bulletin of entomological research* 86:297–305.
- Winkler K., Wäckers F.L., Kaufman L. V, Larraz V., van Lenteren J.C. (2009a) Nectar exploitation by herbivores and their parasitoids is a function of flower species and relative humidity. *Biological Control* 50:299–306.
- Winkler K., Wäckers F.L., Lenteren J. van, van Lenteren J. (2006) Strategic use of nectar sources to boost biological control. *Bulletin OILB/SROP* 29:165–168.
- Winkler K., Wäckers F.L., Pinto D.M. (2009b) Nectar-providing plants enhance the energetic state of herbivores as well as their parasitoids under field conditions. *Ecological Entomology* 34:221–227.
- Witting-Bissinger B.E., Orr D.B., Linker H.M. (2008) Effects of floral resources on fitness of the parasitoids *Trichogramma exiguum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Cotesia congregata* (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 47:180–186.
- Wollenweber E., Dorr M. (2003) Externally accumulated flavonoids in three Mediterranean *Ononis* species. *ZEITSCHRIFT FUR NATURFORSCHUNG C* 58:771–775.
- Wong S.K., Frank S.D. (2013) Pollen increases fitness and abundance of *Orius insidiosus* Say (Heteroptera: Anthocoridae) on banker plants. *Biological Control* 64:45–50.
- Yong T.H. (2003) Nectar-feeding by a predatory ambush bug (Heteroptera : Phymatidae) that hunts on flowers. *Annals of the Entomological Society of America* 96:643–651.
- Zappalà L., Bernardo U., Biondi A., Cocco A., Deliperi S., Delrio G., Giorgini M., Pedata P., Rapisarda C., Garzia G.T. (2012) Recruitment of native parasitoids by the exotic pest *Tuta absoluta* in Southern Italy. *Bulletin of Insectology* 65:51–61.
- Zappalà L., Biondi A., Alma A., Al-Jboory I.J., Arnò J., Bayram A., Chailleux A., El-Arnaouty A., Gerling D., Guenaoui Y., Shaltiel-Harpaz L., Siscaro G., Stavrinides M., Tavella L., Vercher Aznar R., Urbaneja A., Desneux N. (2013) Natural enemies of the South American moth, *Tuta absoluta*, in Europe, North Africa and Middle East, and their potential use in pest control strategies. *Journal of Pest Science* 86:635–647.