



Control biológico de moscas blancas en cultivo de tomate: interacciones entre sus enemigos naturales

Rafael Moreno Ripoll

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL

FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Programa de doctorado de Biología Animal
Bienio 2005-2007

Control biológico de moscas blancas en cultivo de tomate: interacciones entre sus enemigos naturales

Memoria presentada por **Rafael Moreno Ripoll** para
optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona

Tesis realizada en Entomología, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries
(IRTA, Cabrils)

Directoras

Dra. Rosa Gabarra Ambert
Investigadora de Entomología
IRTA – Centro de Cabrils

Dra. Núria Agustí Abella
Investigadora de Entomología
IRTA – Centro de Cabrils

Tutora

Dra. Marta Goula Goula
Investigadora titular Dto. de Biología
Animal
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona

Capítulo 2

Depredación intragremial entre *Macrolophus pygmaeus*, *Nesidiocoris tenuis* y *Eretmocerus mundus*



Este capítulo ha sido enviado para su publicación al *Bulletin of Entomological Research*.

1. Introducción

Bemisia tabaci Gennadius y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae) son dos de las principales plagas de cultivo de tomate de invernadero (Avilla *et al.*, 2004). *Bemisia tabaci* se ha convertido en una plaga de gran importancia debido a los elevados daños que causa a los cultivos por la alimentación directa sobre las hojas, la producción de melazas que facilitan el asentamiento de hongos y la transmisión de diversos virus. Uno de los más importantes es el causante de la enfermedad del rizado amarillo del tomate (TYLCD), que causa grandes daños en todo el mundo (Moriones y Navas-Castillo, 2010).

Los depredadores polífagos *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) y *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Heteroptera: Miridae) han demostrado su eficacia controlando las moscas blancas en cultivos protegidos, realizándose inoculaciones de éstos para controlar sobre todo las moscas blancas y los lepidópteros en invernaderos comerciales de tomate (Alomar *et al.*, 2006; Calvo *et al.*, 2009). En la cuenca mediterránea ambos depredadores colonizan espontáneamente los cultivos de tomate, cuando las aplicaciones insecticidas se reducen dentro de programas de control integrado (CIP) basados en la conservación de enemigos naturales (Castañé *et al.*, 2004; Arnó *et al.*, 2006b). Hasta hace poco los *M. pygmaeus* encontrados en el cultivo de tomate han sido identificados como *M. caliginosus* Wagner (= *M. melanotoma* (Costa)) (Martinez-Cascales *et al.*, 2006) y aún es denominado de este modo por los productores que lo comercializan. Debido a esta errónea identificación, consideramos que mucha de la literatura previa referida a *M. caliginosus* en tomate se refiere a *M. pygmaeus*. El parasitoide *Eretmocerus mundus* (Mercet) (Hymenoptera: Aphelinidae) es también ampliamente utilizado con gran eficiencia para el control de *B. tabaci* (Stansly *et al.*, 2005; Gabarra *et al.*, 2006). Este parasitoide coloniza espontáneamente los cultivos de tomate en el litoral español cuando las aplicaciones insecticidas se reducen, llegando a alcanzar grandes poblaciones (Arnó *et al.*, 2005).

La depredación intragremial (DI) es una interacción muy extendida entre agentes de control biológico. Ocurre cuando dos especies comparten un mismo huésped o presa (y por tanto compiten por él) y también existe entre ellos una interacción trófica

(depredación o parasitismo). Esta interacción puede causar altos niveles de mortalidad para uno o ambos enemigos naturales (Rosenheim *et al.*, 1995). Un depredador intragremial puede afectar negativamente al otro bien al alimentarse de él o compitiendo por el recurso compartido (presa extragremial). En este caso *M. pygmaeus*, *N. tenuis* y *E. mundus* pueden interactuar entre ellos y su uso conjunto podría ser aditivo, sinérgicamente positivo o negativo sobre el control de *B. tabaci*. *Eretmocerus mundus* compite con ambos depredadores al parasitar las ninfas de *B. tabaci*, aunque también ha sido citado alimentándose de ellas, pudiendo causar de este modo un 10 % de mortalidad ninfal (Gerling y Fried, 2000).

Aunque no se observe mortalidad causada por la DI, la interacción de depredadores intragremiales puede producir diferentes efectos subletales. Lucas *et al.* (2009) observaron un desarrollo más lento de *M. caliginosus* en presencia del depredador intragremial *Dicyphus tamaninii* Wagner (Heteroptera: Miridae). Martinou *et al.* (2009) observaron una reducción en la permanencia del parasitoide *Aphidius colemani* (Viereck) (Hymenoptera: Aphidiidae) en las zonas en las que *M. caliginosus* estaba presente. Perdakis *et al.* (2009) no encontraron evidencias de DI entre *M. pygmaeus* y *N. tenuis*, pero sí que observaron cambios en su distribución en la planta de tomate, así como una menor capacidad para depredar *T. vaporariorum* cuando ambos depredadores coexistían en la misma arena. De igual manera, como se observa en el capítulo 1, ambos depredadores consumen *E. mundus* en invernaderos de tomate, lo cual sugiere que esta depredación podría afectar al CB que ejerce este parasitoide.

En muchos casos, en condiciones de campo, no es fácil determinar mediante observación directa qué presas consumen los depredadores. La depredación sobre estadios jóvenes del parasitoide no se puede observar debido a que el depredador vacía toda la presa y no quedan restos visibles del parasitoide. Por ello, se han desarrollado técnicas moleculares para estudiar en condiciones de campo tanto la depredación como el parasitismo mediante la identificación de proteínas o ADN de las presas (Agustí *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007; Kuusk *et al.*, 2008; Moreno-Ripoll *et al.*, 2009; King *et al.*, 2010) y de los parasitoides (Agustí *et al.*, 2005; Gariepy *et al.*, 2007; Ashfaq *et al.*, 2010).

En este capítulo se pretende conocer la DI entre la ninfas de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* y determinar su efecto sobre el control de *B. tabaci*. Esta información es necesaria para mejorar las estrategias de CB cuando ambos depredadores coexisten. También se pretende estudiar la DI entre ninfas de ambos depredadores y larvas de *E. mundus*, así como determinar si el efecto conjunto de las tres especies puede ser o no ser aditivo para el control de la mosca blanca. Estos datos pueden proveer información útil a la hora de diseñar estrategias de control que permitan evitar efectos negativos en el CB de *B. tabaci*. Para conseguir estos objetivos, se llevaron a cabo tanto observaciones morfológicas como análisis moleculares.

2. Material y métodos

2.1. Insectos

Macrolophus pygmaeus y *N. tenuis* se criaron en las instalaciones del IRTA (Cabrils) como se describe en Agustí y Gabarra (2009a; b). Estas crías son renovadas cada año mediante la introducción de nuevos depredadores recolectados en campos de tomate de la misma zona. Fueron criados con huevos de *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) sobre planta de tabaco bajo condiciones controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ RH y L16:D8 de fotoperiodo). Los huevos de *E. kuehniella* se compraron a Biotop (Valbonne, France). *Bemisia tabaci* y *E. mundus* se criaron sobre plantas de col y de algodón respectivamente, bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

2.2. Secuenciación, diseño de los cebadores y amplificación de ADN

El ADN se extrajo a partir insectos individualmente mediante el *DNeasy Tissue Kit* de QIAGEN (protocolo para tejidos animales). El ADN total se diluyó en 100 ml de tampón AE y fue conservado a -20°C . Se utilizaron controles negativos en cada extracción de ADN. Se amplificó un fragmento de ADN de 710 pb a partir del ADN mitocondrial de la enzima citocromo oxidasa I (COI) de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* con los cebadores universales LCO1490 y HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994). Dichas reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 25 μL en tampón 1x (Invitrogen) con 4 mM de MgCl_2 (Invitrogen), 0,05 mM de dNTP mix (Invitrogen), 2,5 μg de

albúmina de suero bovino (BSA, New England Biolabs), 0,1 μ M de cada cebador, 0,625U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y 3 μ l de ADN. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador MJ Research PTC200 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Tras un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 2 min y 30 s, las muestras se amplificaron durante 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 47°C durante 30 s y 72°C durante 45 s. Posteriormente hubo un periodo de extensión final de 72°C durante 10 min. Los productos de PCR obtenidos (10 μ l) se purificaron añadiendo 0,25 μ l de Exonucleasa I (New England Biolabs) y 0,5 μ l de fosfatasa alcalina de camarón (USB) incubándolos a 37 °C durante 45 min y posteriormente a 80 °C durante 15 min. La secuenciación del ADN se llevó a cabo en secuenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) mediante la tecnología Big Dye (v1.1). Las secuencias obtenidas se publicaron en la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) con los siguientes números de acceso: HQ291843 (*M. pygmaeus*) y HQ291844 (*N. tenuis*). Las secuencias se alinearon utilizando el programa CLUSTAL (Thompson *et al.*, 1997) y para diseñar los cebadores específicos se utilizó el programa AMPLICON (Jarman, 2004).

Una vez obtenidas las secuencias de ADN y diseñados los cebadores, la amplificación del ADN del *B. tabaci* y *E. mundus* se hizo de igual forma que se ha descrito en el capítulo 1. La amplificación del ADN de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* se llevó a cabo de igual manera, excepto para la concentración de MgCl₂ que fue de 4 mM. Las muestras se amplificaron en un termociclador 2720 thermal cycler (Applied Biosystems). Las condiciones de PCR fueron las mismas que en el primer capítulo, menos la temperatura de anillamiento, que fue de 60°C. En todas la reacciones se utilizó ADN de la especie diana como control positivo y agua como control negativo. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz ultravioleta.

2.3. Especificidad de los cebadores y detección molecular de la depredación y el parasitismo

Se comprobó la especificidad de los cebadores de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* utilizando el ADN de las mismas especies mencionadas en el capítulo 1. Se probaron 10 individuos de cada especie de depredador para asegurar que los cebadores diseñados para detectar una de las especies, no detectaba la otra. Para asegurar que los cebadores detectaban el ADN del otro depredador tras ser ingerido, se aisló cada individuo (hembras) en cajas de plástico transparentes (2,5 cm de diámetro) a 25°C durante 24h, y posteriormente se les ofreció una ninfa del otro depredador de 2º-3er estadio (N2-N3). Una vez que las hembras hubieron depredado la ninfa ofrecida, fueron congeladas ($t=0$) para ser posteriormente analizadas. Se analizaron 10 hembras de cada depredador mediante PCR. Cada depredador fue analizado tres veces y considerado positivo si el ADN de la presa era detectado en al menos uno de los análisis.

La detección molecular de los diferentes estadios de *E. mundus* dentro de *B. tabaci* se analizó en tres momentos del desarrollo del parasitoide: 1) larva de primer estadio (L1); 2) larva de tercer estadio (L3) (cuando se observa el desplazamiento de los micetomas de *B. tabaci* debido a la presión interna del parasitoide (Naranjo *et al.*, 2004)); y 3) pupa (cuando el color de la ninfa de mosca blanca cambia debido a la presencia de la pupa del parasitoide). Se analizaron entre 8 y 10 ninfas de mosca blanca parasitada para cada estadio, usando tanto los cebadores específicos de *E. mundus* como los de *B. tabaci*. *Eretmocerus mundus* pone los huevos debajo de las ninfas de mosca blanca, siendo la L1 la que realmente parasita la ninfa (Gerling, 1990). Para obtener ninfas de *B. tabaci* parasitadas por los primeros estadios del parasitoide se ofrecieron ninfas de tercer estadio (N3) a hembras de *E. mundus* acopladas y bajo lupa binocular se observó la puesta, identificando así las ninfas parasitadas. Para poder asegurar que la L1 estaba en el interior del huésped (N3 de *B. tabaci*) éstas se mantuvieron durante 5 días después de la oviposición en cajas transparentes de plástico (5 cm de diámetro) con un disco de hoja de algodón (de igual diámetro) sobre una capa de agar de 0,5 cm de grosor (5%) a 25 °C. Los otros dos estadios del parasitoide se obtuvieron de las crías de *E. mundus*.

2.4. Estudio de la Depredación Intragremial (DI)

Para evaluar la DI entre *M. pygmaeus*, *N. tenuis* y *E. mundus* se consideraron dos factores principales: por un lado la presencia de depredadores (sin depredadores, sólo *M. pygmaeus*, sólo *N. tenuis* y ambos depredadores juntos), y por otro la presa ofrecida (ninfas de *B. tabaci* sin parasitar, y ninfas de *B. tabaci* sin parasitar + ninfas de *B. tabaci* parasitadas por *E. mundus*). Aparte, se preparó otro tratamiento con ambos depredadores sin presa para detectar la DI entre ellos en ausencia de presa. El experimento se llevó a cabo con N2-N3 bajo las mismas condiciones controladas citadas anteriormente. Se introdujeron plantas de tomate de 3-4 hojas ($159 \pm 8 \text{ cm}^2$) individualmente en cilindros de plástico (20cm de diámetro x 30cm de altura). En cada cilindro se introdujeron 50 adultos de *B. tabaci* durante 48h (excepto en el tratamiento sin presa). Posteriormente los adultos de mosca blanca fueron retirados y las plantas se mantuvieron durante 13 días para permitir que las ninfas alcanzasen el tamaño apropiado para ser parasitadas por *E. mundus*. Posteriormente, para obtener ninfas de *B. tabaci* parasitadas, se introdujeron 4 hembras de *E. mundus* en cada cilindro. También se introdujo una tira de papel de filtro impregnada con miel para proveer de alimento a los parasitoides. Tras 48h, tanto las hembras de *E. mundus* como la tira de papel de filtro se retiró. Después de 6 días, se introdujeron en cada cilindro (excepto en los tratamientos sin depredadores) 5 N2-N3 de *M. pygmaeus* y/o 5 N2-N3 de *N. tenuis* (dependiendo de la combinación de depredadores en el tratamiento). Se hicieron cuatro replicas por tratamiento. Después de 24h los depredadores fueron extraídos de los cilindros, contados los vivos y los muertos, y los vivos fueron congelados hasta su análisis con los cebadores específicos de *B. tabaci*, *E. mundus*, *M. pygmaeus* y *N. tenuis*. Las ninfas de *B. tabaci* fueron también contadas y clasificadas bajo lupa binocular como no parasitadas, parasitadas, depredadas y muertas por causas desconocidas. Las ninfas parasitadas mostraron el desplazamiento de los micetomas debido a la presencia de la larva del parasitoide. Las ninfas depredadas fueron diferenciadas de otras causas de mortalidad al quedar la cutícula completamente vacía sin agujero de emergencia (Castañé *et al.*, 2004). Las ninfas muertas por causas desconocidas se deben a la mortalidad natural o a la alimentación de *E. mundus* sobre el huésped, y mostraban desorden tisular y opacidad (Malo, 2009). Para determinar el

parasitismo mediante la detección del ADN del parasitoide, se recogieron aleatoriamente 5 ninfas de *B. tabaci* por planta de aquellos tratamientos con presencia del parasitoide.

2.4.1. *Macrolophus pygmaeus* y *N. tenuis*

Para determinar si la presencia de presa (*B. tabaci* o *B. tabaci* + *E. mundus*) o la presencia de la otra especie de depredador afectaba a la supervivencia de los depredadores, se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para cada especie de depredador, comparando el número de depredadores vivos en cada tratamiento. La DI entre depredadores se estudió también molecularmente mediante la utilización de los cebadores específicos de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* en aquellos tratamientos donde ambos depredadores estaban presentes. Para conocer si la depredación de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* sobre las ninfas de *B. tabaci* se veía afectada por la presencia del otro depredador, el número ninfas de *B. tabaci* consumidas por depredador se calculó en cada tratamiento y se compararon mediante una ANOVA de dos vías para conocer si el efecto de ambos factores (presa ofrecida y presencia de especie de depredador) afectaba al número de ninfas consumidas. También se realizó una ANOVA de una vía considerando como factor únicamente la presencia de depredador. Una disminución en el número de ninfas consumidas de *B. tabaci* puede ser el resultado de que una o ambas especies de depredador disminuya su consumo o lo interrumpa completamente. Por esta razón, para detectar si la depredación sobre *B. tabaci* cambiaba cuando ambos depredadores coexistían, los depredadores fueron analizados mediante PCR utilizando los cebadores específicos de *B. tabaci*. La proporción de la detección de presa obtenida para cada depredador en los tratamientos donde coexistieron ambos depredadores se comparó con la proporción de detección obtenida en aquellos tratamientos en los que no coexistieron. Para ello se realizó una prueba t de Student para cada comparación.

2.4.2. *Macrolophus pygmaeus*, *N. tenuis* y *E. mundus*

El parasitismo obtenido en aquellos tratamientos en los que los se encontraba *E. mundus* se comparó para determinar si el parasitismo se veía afectado por la presencia de los depredadores. Esto se analizó de dos formas: 1) comparando el número total de

número de ninfas parasitadas observadas bajo lupa binocular, y 2) comparando la proporción de ninfas de *B. tabaci* parasitada obtenidas mediante PCR utilizando los cebadores específicos de *E. mundus*. Se hizo una ANOVA de una vía en cada caso.

Para estudiar la depredación sobre el parasitoide, se utilizaron los cebadores de *E. mundus* para detectar su presencia dentro de los depredadores. La preferencia de los depredadores por las ninfas parasitadas o no parasitadas se estudió molecularmente comparando la proporción de depredadores en los que se les detectó *E. mundus* (del total de depredadores positivos) con la proporción de *B. tabaci* parasitada por *E. mundus* en el tratamientos sin depredadores. El análisis molecular permite detectar la presencia de ADN del parasitoide, por lo tanto detecta estadios juveniles que aún no han producido un desplazamiento de los micetomas de la ninfa de mosca blanca. Por este motivo se utilizó como referencia el parasitismo obtenido molecularmente. La preferencia se analizó en los tratamientos que tenían *M. pygmaeus*, *N. tenuis* y ambas especies juntas realizando una prueba binomial para cada caso. Para realizar este análisis cuando coexistían ambos depredadores, se sumaron los depredadores positivos de ambas especies.

2.4.3. Efecto de la DI sobre el control de *B. tabaci*

Para establecer si el parasitismo de *E. mundus* mejoraba el control que ambos depredadores ejercían sobre *B. tabaci*, se sumaron el número de ninfas de *B. tabaci* depredadas y parasitadas en el tratamiento donde *E. mundus* y ambos depredadores coexistieron. Estos valores se compararon con el número de ninfas depredadas en el tratamiento en el que sólo estuvieron ambos depredadores. Para ello se realizó una prueba t de Student.

3. Resultados

3.1. Especificidad

Los cebadores específicos de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* amplificaron fragmentos de 104 pb y 293 pb respectivamente (tabla 2.1). No hubo amplificación cuando estos cebadores se probaron con el ADN de otras especies que no eran la especie diana (26 especies, ver capítulo 1).

Tabla 2.1. Secuencia (5'-3') de los cebadores específicos de los depredadores y tamaño del fragmento que amplifican.

| Especie diana | Cebador | Secuencia | Tamaño (pb) |
|--------------------|---------|-----------------------|-------------|
| <i>M. pygmaeus</i> | Mp2F | TCATTACACTTAGCAGGAATC | 104 |
| | Mp2R | AATGGGATTCGTTCTGATGT | |
| <i>N. tenuis</i> | Nt2F | GACTTCTACCCCTTCACTA | 293 |
| | Nt2R | TGGGAGAGAGATAAGTAAG | |

3.2. Detección molecular de los depredadores y del parasitoide

Cuando las hembras consumieron una ninfa de la otra especie de depredador, siempre se detectó la presa ingerida justo después de haber sido consumida. Por otra parte, cuando los cebadores específicos de *B. tabaci* y *E. mundus* se utilizaron para detectar la L1 y L3 de *E. mundus* dentro de *B. tabaci*, se obtuvo un 100 % de detección tanto para el ADN del huésped como para el del parasitoide (n = 10 por tratamiento). Cuando los parasitoides estaban a punto de emerger también fueron detectados en el 100 % de los casos, y *B. tabaci* se detectó sólo en el 63 % de los casos (n = 8).

3.3. Estudio de la DI

Como resultado de la introducción de 50 adultos de *B. tabaci* en cada planta, las densidad de ninfas de mosca blanca obtenida después de 24 días varió entre $195 \pm 25,6$ y $353 \pm 23,7$ ninfas por planta (tabla 2.2). El número de ninfas de mosca blanca muertas por razones desconocidas fue muy bajo. En los tratamientos en los que no hubo presencia de parasitoide, la mortalidad por causas desconocidas varió entre

$1 \pm 0,5$ y $2 \pm 0,6$ ninfas de mosca blanca por planta. Cuando sí hubo presencia del parasitoide, la mortalidad por razones desconocidas fue de $4 \pm 1,2$ ninfas de mosca blanca por planta en el tratamiento sin depredadores, mientras que en el tratamiento en el que se encontraba *N. tenuis* no se observó esta mortalidad (tabla 2.2).

Tabla 2.2. Número de ninfas de *B. tabaci* totales y muertas por causas desconocidas por planta dependiendo de la especie de presa ofrecida y de la especie de depredador presente. Mp = *M. pygmaeus*, Nt = *N. tenuis*.

| Presa ofrecida | Especie de depredador | <i>B. tabaci</i> | |
|----------------|-----------------------|------------------|--|
| | | Ninfas/planta | Ninfas muertas por causas desconocidas |
| Bt | Control | $353 \pm 23,7$ | $1 \pm 0,5$ |
| | Mp | $201 \pm 40,7$ | $1 \pm 0,5$ |
| | Nt | $203 \pm 26,3$ | $1 \pm 0,5$ |
| | Mp + Nt | $229 \pm 33,2$ | $2 \pm 0,6$ |
| Bt + Em | Control | $256 \pm 37,8$ | $4 \pm 1,2$ |
| | Mp | $256 \pm 39,7$ | 0 |
| | Nt | $266 \pm 40,1$ | 0 |
| | Mp + Nt | $195 \pm 25,6$ | $1 \pm 0,3$ |

3.3.1. *Macrolophus pygmaeus* y *N. tenuis*

No se encontraron diferencias significativas entre la supervivencia de las ninfas de depredador de los diferentes tratamientos, mostrando que ni la presencia de la otra especie de depredador ni la presa ofrecida les afectaba (entre $4 \pm 0,7$ y $5 \pm 0,5$ ninfas por tratamiento; $F = 0,83$; $gl = 4$; $p = 0,530$ para *M. pygmaeus* y $F = 0,10$; $gl = 4$; $p = 0,979$ para *N. tenuis*). Esta ausencia de DI también fue observada mediante PCR utilizando los cebadores específicos para *M. pygmaeus* y *N. tenuis*. De los 53 *M. pygmaeus* y los 52 *N. tenuis* que se analizaron de los tratamientos donde ambas especies coexistieron durante 24h, únicamente en 1 individuo de *M. pygmaeus* y en otro de *N. tenuis*, se detectó el ADN de la otra especie de depredador.

El número de ninfas de *B. tabaci* consumidas por depredador estuvo significativamente relacionado con el tratamiento de depredador (*M. pygmaeus*, *N. tenuis* o ambos

depredadores juntos) ($F = 4,57$; $gl = 2$; $p = 0,026$). Sin embargo, no se encontró relación con la presa ofrecida (ninfas de *B. tabaci* sin parasitar, o ninfas de *B. tabaci* sin parasitar + ninfas de *B. tabaci* parasitadas) ($F = 1,18$; $gl = 1$; $p = 0,293$). Cuando se compararon los tratamientos de depredador sin considerar la presa ofrecida, el número de ninfas de *B. tabaci* consumidas por depredador fue significativamente más bajo cuando *M. pygmaeus* y *N. tenuis* coexistieron que cuando únicamente estuvo presente *N. tenuis* ($F = 3,66$; $gl = 2$; $p = 0,044$) (fig. 2.1).

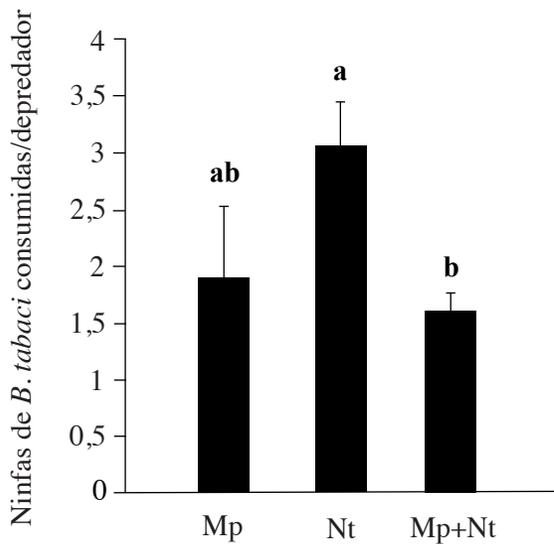


Fig. 2.1. Número de ninfas de *B. tabaci* consumidas por depredador (media \pm SE) dependiendo de las especies de depredadores presentes: *M. pygmaeus* (Mp), *N. tenuis* (Nt) o ambas especies juntas (Mp+Nt). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos en el test de Tukey ($p < 0,05$).

Para conocer si este descenso en el consumo de *B. tabaci* era debido a que uno o ambos depredadores disminuían su depredación, se utilizaron los cebadores específicos de *B. tabaci* para detectar el ADN de esta especie dentro de los depredadores mediante PCR (tabla 2.3). No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de detección de *B. tabaci* cuando *M. pygmaeus* y *N. tenuis* coexistieron y cuando no coexistieron, indicando que ambas especies de depredador consumieron *B. tabaci*

cuando coexistieron (*M. pygmaeus* ($t = 0,10$; $p = 0,920$ y $t = 0,77$; $p = 0,475$ cuando se ofreció *B. tabaci* y *B. tabaci* + *E. mundus* respectivamente); *N. tenuis* ($t = 0,19$; $p = 0,857$ y $t = 0,91$; $p = 0,396$ cuando se ofreció *B. tabaci* y *B. tabaci* + *E. mundus* respectivamente)).

Tabla 2.3. Proporción de ninfas de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* positivas por planta utilizando los cebadores específicos para *B. tabaci* (media \pm SE), dependiendo de la especie de presa ofrecida (*B. tabaci* o *B. tabaci* + *E. mundus*) y de la especie de depredador presente. Mp = *M. pygmaeus*, Nt = *N. tenuis*.

| Especie de depredador | <i>B. tabaci</i> | | <i>B. tabaci</i> + <i>E. mundus</i> | |
|-----------------------|------------------|----------------|-------------------------------------|----------------|
| | Mp | Nt | Mp | Nt |
| Mp | 0,6 \pm 0,17 | - | 0,4 \pm 0,22 | - |
| Mp + Nt | 0,5 \pm 0,11 | 0,7 \pm 0,07 | 0,6 \pm 0,14 | 0,8 \pm 0,14 |
| Nt | - | 0,7 \pm 0,14 | - | 1,0 \pm 0,05 |

3.3.2. *Macrolophus pygmaeus*, *N. tenuis* y *E. mundus*

La detección molecular de presa obtenida para *M. pygmaeus* y *N. tenuis* se muestra en la figura 2.2. Tanto *B. tabaci* como *E. mundus* fueron detectados en ambos depredadores. Cuando se ofrecieron únicamente ninfas de *B. tabaci*, esta especie fue detectada en el 52 % de los *M. pygmaeus* y en el 71 % de los *N. tenuis*. Cuando se ofrecieron a la vez *B. tabaci* y *E. mundus*, la detección de *B. tabaci* fue muy similar a la anterior, siendo un poco más elevada en *N. tenuis* (86 %). La detección de *E. mundus* fue de 27 % en *M. pygmaeus* y de 17 % en *N. tenuis*, siendo por tanto, menor que la de *B. tabaci*. De los 14 depredadores que resultaron positivos para *E. mundus*, 12 de ellos lo fueron también para *B. tabaci*.

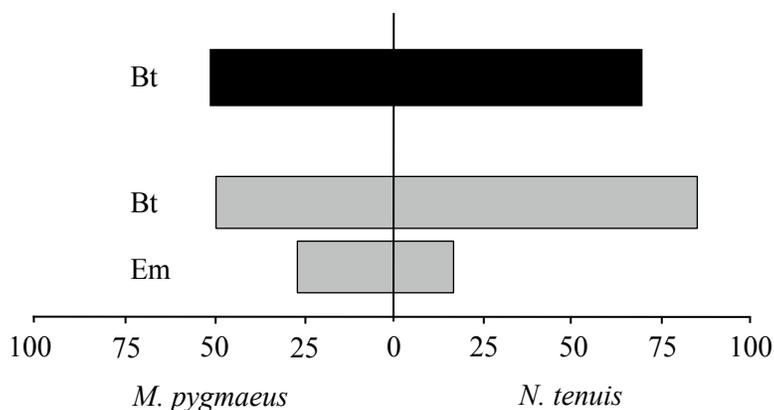


Fig. 2.2. Porcentajes de detección molecular de *Bemisia tabaci* (Bt) y *Eretmocerus mundus* (Em) obtenidas para *M. pygmaeus* y *N. tenuis* cuando se ofrecieron ninfas de *B. tabaci* sin parasitar (barras negras) o ninfas de *B. tabaci* sin parasitar + ninfas de *B. tabaci* parasitadas por *E. mundus* (barras grises).

Cuando se comparó el parasitismo obtenido en los diferentes tratamientos, no se encontraron diferencias significativas ni mediante el conteo de ninfas de *B. tabaci* parasitadas bajo lupa binocular ($F = 0,60$; $gl = 3$; $p = 0,627$) ni mediante PCR utilizando los cebadores específicos de *E. mundus* ($F = 0,20$; $gl = 3$; $p = 0,891$). Los porcentajes de ninfas parasitadas por planta observados bajo lupa varió entre $1 \pm 0,8$ y $3 \pm 1,7$ (tabla 2.4). Cuando las ninfas de mosca blanca fueron analizadas mediante PCR, la proporción de ninfas parasitadas varió entre $0,2 \pm 0,12$ y $0,3 \pm 0,17$ (tabla 2.4). Por lo tanto, la presencia de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* no disminuyó visiblemente el parasitismo de *E. mundus*, a pesar de que el análisis molecular mostró que el 27 % de los *M. pygmaeus* y el 17 % de los *N. tenuis* había consumido este parasitoide (fig. 2.2).

Tabla 2.4. Porcentaje y proporción de ninfas de *B. tabaci* parasitadas por *E. mundus* mediante la observación bajo lupa binocular y mediante PCR usando los cebadores específicos de *E. mundus*, respectivamente (media \pm SE), dependiendo de la especie de depredador presente (n = 5). Mp = *M. pygmaeus*, Nt = *N. tenuis*.

| Especie de depredador | Observadas bajo lupa binocular | | Analizadas mediante PCR |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| | Ninfas parasitadas/planta | % de ninfas parasitadas | Proporción de ninfas positivas |
| Control | 5 \pm 2,8 | 2 \pm 1,1 | 0,3 \pm 0,17 |
| Mp | 7 \pm 2,2 | 2 \pm 1,0 | 0,3 \pm 0,13 |
| Nt | 2 \pm 1,9 | 1 \pm 0,8 | 0,3 \pm 0,10 |
| Mp + Nt | 6 \pm 3,3 | 3 \pm 1,7 | 0,2 \pm 0,12 |

No se observó preferencia en *M. pygmaeus* ni en *N. tenuis* por las ninfas parasitadas de *B. tabaci*. La proporción de depredadores en los que se detectó *E. mundus* en los tratamientos que tenían *M. pygmaeus*, *N. tenuis* o ambos depredadores juntos, no fue significativamente distinta de la detección esperada (0,3, que fue la proporción de pupas parasitadas observada utilizando los cebadores específicos de *E. mundus* en el tratamiento sin depredadores) ($Z = 1,27$, $p = 0,419$; $Z = 1,37$, y $p = 0,262$; y $Z = 0,73$, $p = 0,623$, respectivamente).

3.3.3. Efecto de la DI entre *M. pygmaeus*, *N. tenuis* y *E. mundus* sobre el control de *B. tabaci*

La coexistencia de *M. pygmaeus*, *N. tenuis* y *E. mundus* en la misma planta redujo más eficazmente el número de ninfas de *B. tabaci*. Se encontró diferencia significativa cuando se comparó la mortalidad de ninfas de mosca blanca causada por ambas especies de depredador y por *E. mundus* (sumando las ninfas de *B. tabaci* depredadas y parasitadas) con la mortalidad obtenida únicamente por ambos depredadores ($t = 3,68$; $p = 0,010$), siendo mayor la mortalidad cuando el parasitoide estaba presente (fig. 2.3).

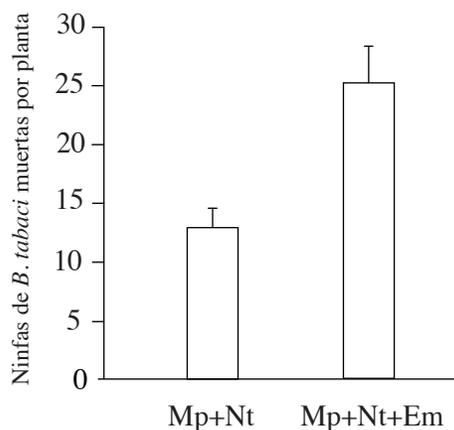


Fig. 2.3. Mortalidad de las ninfas de *Bemisia tabaci* por planta (media \pm SE) causada por *M. pygmaeus* y *N. tenuis* (Mp+Nt) y por *M. pygmaeus*, *N. tenuis* y *E. mundus* (Mp+Nt+Em).

4. Discusión

Los cebadores específicos para *M. pygmaeus* y *N. tenuis* diseñados a partir de la región mitocondrial COI para detectar el ADN de *M. pygmaeus* ingerido por *N. tenuis*, y viceversa amplifican fragmentos cortos de ADN (104 pb para *M. pygmaeus* y 293 pb para *N. tenuis*). Los fragmentos cortos se han recomendado previamente para este tipo de estudios de depredación (Agustí *et al.*, 1999; Zaidi *et al.*, 1999; King *et al.*, 2008). La detección de la presa fue posible en el 100 % de las hembras analizadas con ambos pares de cebadores justo después ser ingerida, como se esperaba para una región multicopia como la COI (Agustí *et al.*, 2003; King *et al.*, 2008). Además, estos cebadores resultaron altamente específicos, detectando exclusivamente la presa diana cuando se probaron con el ADN de otras presas potenciales, parasitoides y depredadores frecuentes en los cultivos hortícolas.

Los cebadores de *E. mundus* descritos en el capítulo 1 detectaron todos los estadios larvarios de este parasitoide dentro de las ninfas de *B. tabaci*. Debido a que *E. mundus* pone el huevo debajo de la ninfa de *B. tabaci* y a que es la L1 la que realmente parasita

el huésped, el huevo no puede ser encontrado dentro de la ninfa. Los estadios larvarios (L1 y L3) y las pupas del parasitoide se detectaron en todos huéspedes que se analizaron. Otros estudios han encontrado una detección molecular elevada de estadios juveniles del parasitoide. Traugott *et al.* (2006) detectaron el parasitoide *Diadegma semiclausum* Hellen en el 95 % de las larvas de *Plutella xylostella* (L.) 8 días después de la oviposición. Gariepy *et al.* (2005) encontraron una detección similar (90-100 %) de los estadios juveniles de los parasitoides *Peristenus digoneutis* Loan y *P. stygicus* Loan que parasitan *Lygus rugulipennis* Poppius. En este trabajo, la pupa de *E. mundus* también se detectó en el 100 % de los casos. Esto era lo esperado debido a la detección obtenida con los primeros estadios de desarrollo. La detección de *B. tabaci* mediante sus cebadores específicos fue también del 100 % cuando se analizaron las ninfas parasitadas por las larvas del parasitoide. Sin embargo, cuando éste se encontraba en estadio de pupa, la detección de *B. tabaci* se redujo hasta el 63 %. Traugott *et al.* (2006) después de 8 días desde la oviposición en larvas de lepidóptero también detectaron siempre el huésped.

Cuando la supervivencia de las ninfas del depredador se comparó entre tratamientos, no se observaron evidencias de DI entre las ninfas de *M. pygmaeus* y *N. tenuis*. Varios factores pueden influir en la aparición de la DI. Se sabe que la coexistencia de distintos tamaños y estadios del los depredadores, la presencia de presa alternativa y el tamaño de las arenas, pueden influir tanto en la aparición como en la intensidad de la DI.

Lucas y Alomar (2002) tampoco hallaron DI entre las ninfas del mismo tamaño (N2) de *M. caliginosus* y del mírido depredador *D. tamaninii*. No obstante, cuando Perdikis *et al.* (2009) estudiaron la interacción entre ninfas de *M. pygmaeus* y 1 adulto de *N. tenuis* en placas de Petri durante varios días, observaron DI únicamente cuando no había presa alternativa disponible. Lucas *et al.* (2009) observaron que la presencia de presa adicional disminuyó la intensidad de la DI entre *M. caliginosus* y *D. tamaninii*, y según Jakobsen *et al.* (2004), la DI entre *M. caliginosus* y *Orius majusculus* (Reuter) ocurrió únicamente en ausencia de presa alternativa. Nóia *et al.* (2008) también observaron una reducción de la DI entre los coccinélidos *Harmonia axyridis* Pallas y *Coccinella undecimpunctata* L. cuando aumentaba la presa extragremial, y lo mismo observaron Ingels y De Clercq (2011) al estudiar la DI entre *H. axyridis* y el sírfido

Episyrphus balteatus DeGeer. También se ha mostrado que el confinamiento de los depredadores en pequeñas arenas puede sobrestimar los niveles de DI al facilitar los ataques entre los depredadores, debido a la imposibilidad de huir u ocultarse. Fréchette *et al.* (2007) observaron que *M. caliginosus* evitaba ser depredado por sírfidos en planta, pero no en cajas de plástico. Ingels y De Clercq (2011) también observaron la influencia del tamaño de la arena, y observaron que la DI sobre el segundo estadio del sírfido *E. balteatus* era menor sobre planta. Lucas *et al.* (2009) también observaron DI de *D. tamaninii* sobre *M. caliginosus* en cajas de plástico, pero no en planta. En cuanto a las especies analizadas en este trabajo, la coexistencia de ninfas de tamaños similares (N2-N3) sobre planta de tomate durante un corto periodo de tiempo (24h) podría explicar la ausencia de DI que hemos encontrado en este estudio.

Los cebadores de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* detectaron que estos depredadores ingirieron individuos de la otra especie. Pero esta detección fue muy escasa, dado que únicamente se detectó la presencia de la otra especie de depredador en un individuo de *M. pygmaeus* y en otro de *N. tenuis*. El hecho de que esta detección se debiera a la ingestión de individuos muertos no puede descartarse, dado que esta práctica ha sido citada como una fuente potencial de errores en el estudio de las interacciones tróficas (Foltan *et al.*, 2005; Juen y Traugott, 2005). De hecho, Torreno y Magallona (1994) observaron a individuos de *N. tenuis* depredando individuos muertos de su propia especie. También en el presente estudio se observó que *M. pygmaeus* y *N. tenuis* depredaban ninfas muertas de la otra especie de depredador. El hecho de que no fuera observada DI entre ninfas de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* bajo estas condiciones, sugiere que en condiciones de campo, donde no hay limitaciones espaciales, la mortalidad asociada a la DI entre ninfas debe ser muy baja.

Los depredadores intragremiales también pueden verse afectados por efectos subletales. En este caso, aunque no se observó una mortalidad asociada a la DI, sí se observó una menor depredación sobre *B. tabaci* cuando ambos depredadores coexistían, lo que indica que la depredación de ambas especies cuando coexistieron sobre la misma planta fue negativa para el control de la plaga (fig. 2.1). Resultados similares han sido citados por Perdikis *et al.* (2009), quienes también encontraron que *M. pygmaeus* y *N. tenuis* depredaban menos ninfas de *T. vaporariorum* cuando estos

depredadores estaban juntos en placas de Petri. Esta menor depredación podría deberse a que una o ambas especies de depredador disminuyeran su consumo o a que uno de ellos lo detuviera completamente. Los resultados moleculares obtenidos en este trabajo muestran que la detección de *B. tabaci* dentro de los depredadores no disminuyó cuando ambos coexistieron, lo que indicaría que ambos siguieron alimentándose de *B. tabaci*. Esto sugiere que el descenso de la depredación sobre las ninfas de mosca blanca ocurrió debido a que ambas especies de depredador redujeron su consumo. En este estudio no se encontró mortalidad de los depredadores asociada a la DI, por ello, la menor depredación sobre *B. tabaci* podría ser debida a cambios en el comportamiento de los depredadores orientados a evitar a la otra especie de depredador intragremial. Se han citado previamente efectos similares en otros estudios. Por ejemplo, Schmitz *et al.* (1997) observaron que la presencia de la araña *Pisurina mira* (Walckenaer) bastaba para producir cambios en el comportamiento de las ninfas del ortóptero *Melanoplus femurrubrum* (DeGeer), reduciendo su alimentación. Okuyama (2002) también observó un descenso en la búsqueda de presas en la araña *Phidippus octopunctatus* (Peckham y Peckham) debido únicamente a la presencia de su depredador intragremial *Phidippus audax* (Hentz), lo cual producía un efecto beneficioso en la supervivencia de la presa compartida.

Cuando en los tratamientos hubo tanto ninfas parasitadas por *E. mundus* como sin parasitar, el número de ninfas de *B. tabaci* muertas por causas desconocidas fue menor en los tratamientos en los que hubo depredadores. Malo (2009) observó los mismos resultados cuando *M. pygmaeus* y *E. mundus* coexistieron en la misma planta con ninfas de *B. tabaci*. Esta relación inversa entre mortalidad de ninfas de mosca blanca y presencia de depredador sugiere que éstos depredan las ninfas muertas por causas naturales o que previamente han sido atacadas por las hembras del parasitoide para alimentarse.

Cuando el parasitismo de *B. tabaci* fue analizado entre 7 y 9 días después de la puesta del parasitoide, es decir, cuando las larvas de *E. mundus* se encontraban entre L2- L3, el parasitismo asociado a cambios morfológicos que se observó fue mucho menor que el que se detectó mediante el marcador molecular específico de *E. mundus* (tabla 2.4). Los resultados de este estudio indican que la media del porcentaje de parasitismo

obtenida mediante PCR con los cebadores específicos de *E. mundus* fue del 27 %, mientras que el porcentaje máximo de ninfas observadas con los micetomas desplazados fue únicamente del 3 %. En las pruebas de laboratorio los cebadores de *E. mundus* fueron muy eficaces, detectando todos los estadios analizados (L1, L3 y pupa) en el 100 % de los casos, lo que indica que estos cebadores son capaces de detectar todos los estadios del parasitoide que se encuentran dentro del huésped. Por ello, la detección molecular del parasitoide podría ser más precisa para estimar el parasitismo real existente en campo. El porcentaje obtenido mediante técnicas moleculares fue similar al porcentaje de detección de *E. mundus* en los depredadores (el 27 % de los *M. pygmaeus* y el 17 % de los *N. tenuis* se alimentaron del parasitoide), lo que indica que los marcadores moleculares de *E. mundus* permitieron detectar eficazmente la depredación de ambos depredadores sobre ninfas de *B. tabaci* parasitadas por estadios juveniles de este parasitoide.

La utilidad de los marcadores moleculares para evaluar el parasitismo ha sido demostrada por diversos autores (Agustí *et al.*, 2005; Garipey *et al.*, 2008). Además, la detección de ADN de los endoparasitoides proporciona la oportunidad de detectar interacciones parasitoide-parasitoide y depredador-parasitoide, las cuales son difíciles o imposibles de detectar mediante métodos convencionales (Traugott *et al.*, 2008).

Aunque mediante los cebadores específicos de *E. mundus* se detectó una DI importante sobre este parasitoide, los resultados indican que el parasitismo de *E. mundus* no se vio afectado en ningún caso por la presencia de los depredadores y que no se observó preferencia de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* por las ninfas parasitadas de *B. tabaci*. Estos resultados son distintos de los obtenidos por Malo (2009), donde ninfas y hembras de *M. pygmaeus* mostraron preferencia por ninfas de *B. tabaci* no parasitadas cuando se les ofrecieron ninfas sin parasitar y parasitadas en las que se observaban los micetomas desplazados. En el presente estudio, únicamente algunas de las ninfas de *B. tabaci* mostraban el desplazamiento de los micetomas, lo cual sugiere que la elevada detección de *E. mundus* observada en ambos depredadores podría deberse a que no son capaces de detectar los estadios más tempranos de parasitoide. Por ello, bajo estas condiciones (planta de tomate y presa abundante), la reducción de las ninfas parasitadas de *B. tabaci* sería proporcional a la reducción de las ninfas de mosca

blanca, debido a que *M. pygmaeus* y *N. tenuis* depredarían aleatoriamente tanto ninfas de *B. tabaci* parasitadas como sin parasitar. Aunque en condiciones de campo se encuentren no sólo estadios tempranos del parasitoide, parece que la depredación sobre *E. mundus* sería también proporcional a la reducción de las moscas blancas, o incluso menor, debido a la capacidad de estos depredadores para no consumir estadios más desarrollados del parasitoide, como muestra Malo (2009).

En el presente estudio, cuando coexistieron *M. pygmaeus*, *N. tenuis* y ninfas parasitadas por *E. mundus*, la supresión de *B. tabaci* fue mayor, contribuyendo a un mejor control de esta plaga. Esto coincide con resultados obtenidos por Gabarra *et al.* (2006), donde estudió la supresión de *B. tabaci* producida por *M. caliginosus* o por *M. caliginosus* y *E. mundus* juntos en condiciones de semicampo. Algunos estudios han mostrado cómo el CB de las presas compartidas mejora cuando coexisten depredadores y parasitoides. Colfer y Rosenheim (2001) observaron que la presencia conjunta del depredador *Hippodamia convergens* Guérin-Ménéville y el parasitoide *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) mejoraba el control del áfido *Aphis gossypii* Glover, a pesar de que el depredador consumía activamente el parasitoide. Esto también fue observado por Snyder y Ives (2003) cuando estudiaron el efecto de la DI entre diversas especies de depredador y el parasitoide *Aphidius ervi* Haliday sobre el control del áfido *Acyrtosiphon pisum* (Harris).

En este estudio se han descrito dos marcadores moleculares para detectar la depredación en *M. pygmaeus* y *N. tenuis*, y se ha mostrado la efectividad de los cebadores de *E. mundus* descritos en el capítulo 1 para detectar todos los estadios del parasitoide cuando se encuentra dentro del huésped. Mediante la utilización de la observación directa y de los marcadores moleculares, se ha demostrado que aunque no existe DI entre *M. pygmaeus* y *N. tenuis*, su presencia conjunta disminuye su depredación sobre *B. tabaci* bajo las condiciones analizadas. También se ha mostrado que estos depredadores no tienen preferencia por los estadios jóvenes de *E. mundus* y que la presencia conjunta de ambos depredadores y de este parasitoide mejora el control de *B. tabaci*.