

FCN_yM
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

Toxicidad de insecticidas hacia el
depredador generalista *Chrysoperla externa*
(Neuroptera: Chrysopidae) incorporando
citogenética y genotoxicidad como
herramienta de diagnóstico

Ing. Agr. MSc. Victoria Fernández Acevedo

2024

Directora: Schneider, Marcela Inés

Director: Rodríguez Gil, Sergio Gustavo

Expediente: 1000-009755/18

Contenido

Agradecimientos	6
Especies citadas.....	7
Abreviaturas.....	9
Resumen.....	9
Abstract	14
Capítulo 1: Introducción general.....	18
1.1 Manejo integrado de plagas.....	19
1.2 Chrysopidae en el control biológico.....	20
1.2.1. <i>Chrysoperla externa</i>	21
1.2.2. <i>Chrysoperla argentina</i>	23
1.3 Los pesticidas en el control de plagas	24
1.3.1 Neonicotinoides	24
1.3.2 Insecticidas derivados del ácido tetrámico	28
1.4 Ecotoxicología	30
1.5 Bibliografía	34
1.6 Imágenes del capítulo	39
Capítulo 2: Objetivos e Hipótesis	43
2.1 Objetivos	44
Objetivo General:	44
Objetivos específicos:.....	44
2.2 Hipótesis.....	45
Hipótesis Generales:	45
Capítulo 3: Materiales y métodos generales	46
3.1 Mantenimiento del material vivo.....	47
3.2 Citogenética Básica	47
3.2.1 Confección de preparados citogenético con orceína.....	47
3.2.2 Determinación del complemento cromosómico para <i>C. externa</i> y <i>C. argentina</i>	48
3.3 Técnica del ensayo cometa variante alcalina	48
3.4 Cortes histológicos	51
3.5 Análisis estadísticos.....	51
3.6 Bibliografía	51
Capítulo 4: Resultados.....	52
4.1 Resultados de Estudios Morfológicos, Histológicos y Cariotipo.	53
4.1.1 Caracterización morfo-colorimétrica del desarrollo embrionario de <i>Chrysoperla externa</i> (Neuroptera: Chrysopidae): Enfoque para su uso en control biológico	54

Introducción	54
Materiales y métodos	55
Resultados	56
Discusión	58
Bibliografía	59
Imágenes de la sección.....	61
4.1.2 Descripción morfológica de machos <i>Chrysoperla externa</i> (Neuroptera: Chrysopidae)	63
Introducción	63
Materiales y métodos	64
Resultados	65
Discusión	67
Bibliografía	67
Imágenes de la sección.....	69
4.1.3 Ontogenia pupal de <i>Chysoperla externa</i> (Neuroptera: Chrysopidae).....	72
Introducción	72
Materiales y métodos	72
Resultados	73
Discusión	75
Bibliografía	76
Imágenes de la sección.....	78
4.1.4 Citogenética de <i>Chrysoperla externa</i> (Neuroptera: Chrysopidae)	81
Introducción	81
Materiales y métodos	81
Resultados	82
Discusión	83
Bibliografía	83
Imágenes de la sección.....	85
4.2 Resultados de Estudios Toxicológicos	87
4.2.1 Toxicidad del imidacloprid (Matrero 35®) sobre pupas de <i>Chrysoperla externa</i> (Neuroptera: Chrysopidae)	88
Introducción	88
Materiales y métodos	90
Resultados	92
Discusión	93
Bibliografía	94
Imágenes de la sección.....	96

4.2.2 Toxicidad del imidacloprid (Matrero 35®) sobre tercer estadio larval y estadio prepupa de <i>Chrysoperla externa</i> (Neuroptera: Chrysopidae)	100
Introducción	100
Materiales y métodos	101
Resultados	103
Discusión	105
Bibliografía	106
Imágenes de la sección.....	108
4.2.3 Toxicidad del imidacloprid (Confidor OD®) y spirotetramat (Movento®) sobre larvas de <i>Chrysoperla externa</i> (Neuroptera: Chrysopidae) alimentadas con presas tratadas.....	115
Introducción	115
Materiales y métodos	116
Resultados	118
Discusión	119
Bibliografía	120
Imágenes de la sección.....	121
4.2.4 Toxicidad del imidacloprid (Confidor OD®) y del spirotetramat (Movento®) sobre el ciclo de vida de <i>Chrysoperla externa</i> (Neuroptera: Chrysopidae)	124
Introducción	124
Materiales y métodos	125
Resultados	126
Discusión	128
Bibliografía	129
Imágenes de la sección.....	130
4.2.5 Toxicidad del imidacloprid (Confidor OD®) y del spirotetramat (Movento®) por ingestión en adultos <i>Chrysoperla externa</i> (Neuroptera: Chrysopidae)	132
Introducción	132
Materiales y métodos	133
Resultados	134
Discusión	135
Bibliografía	136
Imágenes de la sección.....	138
4.3 Resultados De Estudios Genotóxicos	140
4.3.1 Evaluación de la toxicidad de imidacloprid (Confidor OD®) en <i>Chrysoperla externa</i> (Neuroptera: Chrysopidae) mediante ensayo cometa.....	141
Introducción	141
Materiales y métodos	142

Resultados	144
Discusión	146
Bibliografía	148
Imágenes de la sección.....	150
4.3.2 Citotoxicidad del imidacloprid (Confidor OD®) y spirotetramat (Movento®) en huevos de <i>Chrysoperla externa</i> (Neuroptera: Chrysopidae)	153
Introducción	153
Materiales y métodos	154
Resultados	156
Discusión	157
Bibliografía	158
Imágenes de la sección.....	160
Capítulo 5: Conclusiones	164
Capítulo 6: Anexos.....	170
6.1 Estudios sobre <i>Chrysoperla Argentina</i>	171
Descripción morfológica de machos <i>Chrysoperla argentina</i> (Neuroptera: Chrysopidae)	171
Citogenética de <i>Chrysoperla argentina</i> (Neuroptera: Chrysopidae).....	181
6.2 Salidas de R para diferentes los modelos.....	187
6.3 Publicaciones y presentaciones derivadas de la tesis	193
Publicados	193
En evaluación	195
Congresos y otras actividades	197

Agradecimientos

A mi marido, por su apoyo incondicional en todas las cosas que se me ocurren realizar todo el tiempo.

A mi mamá, por su compañía y por las ganas de siempre ir por más a pesar de todas las dificultades que se presenten.

A mi familia Balcarceña, Tefy y Silvia por el apoyo del universo en cada paso.

A mis amigos, por todo el apoyo constante, bromas y ayuda en los momentos más caóticos.

A todos los que participaron indirectamente en esta tesis, como Analía, Silvana, Emilio y Graciela, que nunca se negaron a todas las cosas raras que les pedía hacer; y a tantos otros que participaron en el día a día del trabajo y el compañerismo.

A CONICET por darme la oportunidad de seguir formándome en ciencia que es verdaderamente lo que amo.

Especies citadas

En esta sección se encuentra detallado el nombre de todas las especies citadas en el texto, con autor, año, orden y familia para facilitar la lectura posterior.

Abeja: *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Apidae)

Agelaioides badius (Vieillot, 1819) (Passeriformes: Icteridae)

Arañas: Especies del orden Araneae (Arthropoda: Arachnida)

Bemisia Tabaci (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae),

Bombus terrestris (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Apidae)

Bombyx mori (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae). Gusano de seda.

Ceraeochrysa cubana (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysipidae)

Coccinella septempunctata (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Coccinellidae)

Cryptolaemus montrouzieri (Mulsant, 1850) (Coleoptera: Coccinellidae)

Ctenocephalides felis (Bouché, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae)

Chironomus dilutus (Shobanov, Kiknadze & Butler, 1999) (Diptera: Chironomidae)

Chironomus riparius (Meigen, 1804) (Diptera: Chironomidae)

Chorthippus biguttulus (Linnaeus, 1758) (Orthoptera: Acrididae)

Chorthippus brunneus (Thunberg, 1815) (Orthoptera: Acrididae)

Chrysopa formosa (Brauer, 1851) (Neuroptera: Chrysopidae)

Chrysopa perla (Linnaeus, 1758) (Neuroptera: Chrysopidae)

Chrysopa sapporensis (Okamoto, 1914) (Neuroptera: Chrysopidae)

Chrysoperla argentina (González Olazo & Reguilón, 2002) (Neuroptera: Chrysipidae)

Chrysoperla asoralis (Banks, 1915) (Neuroptera: Chrysipidae)

Chrysoperla carnea (Stephens, 1836) (Neuroptera: Chrysopidae)

Chrysoperla defreitasi (Brooks, 1994) (Neuroptera: Chrysopidae)

Chrysoperla externa (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae)

Chrysoperla rufilabris (Burmeister, 1839) (Neuroptera: Chrysopidae)

Danio rerio (Hamilton-Buchanan, 1822) (Cypriniformes: Cyprinidae)

Diaprepes abbreviatus (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae)

Drosophila melanogaster (Meigen, 1830) (Diptera: Drosophilidae)
Drosophila suzukii (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae)
Eisenia fetida (Savigny, 1826) (Crassieolitellata: Lumbricidae)
Episyrphus balteatus (De Geer, 1776) (Diptera: Syrphidae)
Eretmoceru s mundus (Mercet, 1931) (Hymenoptera: Aphelinidae)
Frankliniella occidentalis (Pergande, 1895) (Thysanoptera: Thripidae)
Galendromus occidentalis (Arachnida: Mesostigmata)
Galleria mellonella (Linnaeus, 1756) (Lepidoptera: Pyralidae)
Helicoverpa armígera (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae)
Melanoloma viatrix (Hendel, 1911) (Diptera: Richardiidae)
Menochilus sexmaculatus (Fabricius, 1781) (Coleoptera: Coccinellidae)
Misgurnus anguillicaudatus (Cantor, 1842) (Cypriniformes: Cobitidae)
Panonychus citri (McGregor, 1916) (Trombidiformes: Tetranychidae)
Pemphredon fabricii (Müller, 1911) (Hymenoptera: Aculeata)
Pez tilapia de río: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Perciformes: Cichlidae)
Pseudomallada prasinus (Burmeister, 1839) (Neuroptera: Chrysopidae)
Rana nigromaculata (Hallowell, 1861) (Anura: Ranidae)
Ratas: *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) (Rodentia: Muridae)
Schizaphis graminum (Rondani, 1852) (Hemiptera: Aphididae)
Sympetrum infuscatum (Selys, 1883) (Odonata: Libellulidae)
Tamarixia radiata (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae)
Tipula sp. (Linnaeus, 1758) (Diptera: Tipulidae)
Trialeuroides vaporariorum (Westwood, 1856) (Homoptera: Aleyrodidae) Mosca Blanca
Triticum aestivum (Linnaeus, 1753) (Poales: Poaceae)

Abreviaturas

ACh: Acetilcolina.

ATP: Adenosín trifosfato.

Df: Grados de libertad.

De: Desvio estándar.

F: Valor de distribución F de Fisher.

FAO: Food and Agriculture Organization.
(Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación).

GLMM: Generalized Linear Mixed Models
(Modelos Lineales Generalizados Mixtos).

HPTT: Hormona protoracicotrópica.

Máx: Máximo.

Min: Mínimo.

MIP: Manejo integrado de plagas.

mg i.a/l: Miligramos de ingrediente activo por litro.

nAChR: Receptores de acetilcolina de tipo nicotínico.

p-value: p-valor.

RC: Roturas de cadenas de ADN.

ReDox: Reaccion de óxido- reducción.

RNS: Reactive Nitrogen Species (Especies reactivas de nitrógeno).

ROS: Reactive Oxygen Species (Especies reactivas de oxígeno).

SAL: Sitios álcali-lábiles.

sd : Desviación estándar.

SOD: Enzima superóxido dismutasa.

X²: Modelo chi-cuadrado.

Resumen

El manejo integrado de plagas (MIP) se presenta como un enfoque integral que busca la compatibilidad de diversas técnicas de control para mantener el equilibrio en los ecosistemas agrícolas. Este método se fundamenta en el conocimiento de las interacciones biológicas, la información sobre los cultivos y el entorno circundante. Dentro del MIP, se destacan estrategias como el control mecánico, etológico, químico y biológico, siendo este último de especial relevancia.

La familia Chrysopidae desempeña un papel importante en la agricultura al contribuir al control biológico de plagas, especialmente durante sus estadios larvales, al consumir plagas

suctopícoras como áfidos, cochinillas y moscas blancas. Especies como *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) y *Chrysoperla argentina* (González Olazo & Reguilón, 2002) (Neuroptera: Chrysipidae) se presentan como agentes efectivos en la reducción de poblaciones de plagas agrícolas, demostrando su utilidad en el MIP. Sin embargo, la introducción de plaguicidas sintéticos en la agricultura ha suscitado preocupaciones sobre sus efectos en organismos no blanco, como *C. externa*, generando impactos tanto directos como indirectos en su comportamiento.

Dentro de los insecticidas utilizados para el control de plagas suctopícoras, destacan los neonicotinoides, los cuales afectan el sistema nervioso central de los insectos. Su uso generalizado a lo largo de los años ha revelado consecuencias inesperadas en la biodiversidad, afectando la salud de especies beneficiosas como *C. externa*. Estos compuestos, además de afectar el sistema nervioso central, generan daños en lípidos, ADN y proteínas, comprometiendo la supervivencia y el comportamiento de estos organismos benéficos. Como respuesta a estos desafíos, se han introducido insecticidas más específicos, como los derivados del ácido tetrámico, con el objetivo de reducir el impacto ambiental.

En este contexto, se evaluó el impacto de un neonicotinoide, el imidacloprid, y un insecticida de ácido tetrámico, el spirotetramat, sobre *C. externa*. Se analizaron no solo los aspectos relacionados con la mortalidad, sino también los daños en la reproducción. Se emplearon técnicas avanzadas, como el ensayo cometa alcalino, para analizar los posibles daños en el ADN, proporcionando una visión integral de los impactos ambientales de los insecticidas utilizados en la agricultura moderna.

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la toxicidad inducida por formulaciones comerciales de los insecticidas imidacloprid y spirotetramat sobre el depredador generalista *Chrysoperla externa* incorporando, además de las evaluaciones de los aspectos bioecológicos, la citogenética como nueva herramienta de diagnóstico ecotoxicológico.

Los especímenes de *C. externa* utilizados en este estudio fueron criados en el Laboratorio de Ecotoxicología, Plaguicidas y Control Biológico del Centro de Estudios de Parasitología y Vectores (CEPAVE), dependiente de Universidad Nacional de La Plata- CONICET - CICPBA, con sede en La Plata, Argentina. Los detalles de los materiales y métodos utilizados se encuentran en el capítulo 3. Todo este estudio se realizó gracias a una beca doctoral financiada por CONICET y financiado por los proyectos PUE N° 22920160100036CO otorgado al CEPAVE y CONICET PIP N° 0205 y N° 0893 otorgado a la Dra. Schneider.

En el capítulo 4, sección uno, se presentan las caracterizaciones morfológicas de *C. externa*. Se llevó a cabo una caracterización morfo-colorimétrica de los huevos mediante observación directa y preparaciones microscópicas con deshidratación alcohólica. Se determinó que los huevos muestran diferencias morfológicas a lo largo de su desarrollo, lo que facilita su identificación a simple vista, cambios que están respaldados por el desarrollo embrionario. Además, se incluye un estudio histológico de los machos de *C. externa*, en el que los especímenes fueron embebidos en parafina y se realizaron cortes con micrótopo para observar su anatomía interna. Se detallaron las estructuras del sistema digestivo, reproductor y el ganglio cerebral.

Se llevó a cabo un análisis de los cambios pupales que ocurren dentro del capullo de *C. externa*, identificando los principales cambios en la pupa mediante observación directa. Esta descripción fue acompañada por el análisis de cortes histológicos para la observación interna de dichos cambios.

En la última parte de la sección uno, se realizaron estudios de citogenética en *C. externa*. Se analizó el cariotipo, el ciclo celular y los detalles del proceso de mitosis. Este procedimiento incluyó la preparación de huevos tratados con colchicina y la tinción con orceína. Se logró determinar los pares cromosómicos, llevar a cabo un análisis detallado del tamaño de cada par y asignarles una nomenclatura correspondiente. Además, se identificaron los bandeos naturales presentes y se caracterizaron los cromosomas sexuales.

A continuación, en la sección 4.2 se evaluó el impacto de los insecticidas a nivel toxicológico. En la primera parte, se evaluó el efecto del imidacloprid sobre las pupas de *C. externa*. Para ello, se realizaron aplicaciones con el micro aplicador manual Burkart de las concentraciones recomendada sobre las pupas, y se llevó a cabo un seguimiento de los individuos hasta la etapa adulta. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la mortalidad, respaldando la hipótesis de que el capullo actúa como una protección para las pupas en su interior. La fecundidad de los adultos emergidos de pupas tratadas fue significativamente menor que la de las pupas del grupo control. Si bien la cantidad de huevos fue menor, eclosionaron de forma normal. La aplicación de imidacloprid en este estadio afectó únicamente la fecundidad de los adultos.

Se evaluó el impacto del imidacloprid sobre las larvas y prepupas de *C. externa*. Para ello, se realizaron aplicaciones con el micro aplicador manual Burkart de la concentración recomendada, y se realizó un seguimiento de los individuos hasta la etapa adulta. Las larvas mostraron movimientos descoordinados; dificultades para tejer el capullo de protección pupal,

resultando en la muerte. Muy pocos individuos alcanzaron la etapa adulta. El estadio de prepupa facilitó el desarrollo de un mayor número de individuos hasta la etapa adulta, evidenciando el papel crucial del capullo como barrera contra los pesticidas. El imidacloprid provocó una disminución tanto en la fecundidad como en la fertilidad de las hembras, resultando en huevos carentes de viabilidad.

Además, se analizó el efecto del imidacloprid y del spirotetramat cuando las larvas se alimentan de presas tratadas. Para ello, las larvas de *C. externa* fueron alimentadas con áfidos contaminados con estos insecticidas, y se realizó un seguimiento hasta la etapa adulta. La ingestión de larvas contaminadas con imidacloprid indujo una elevada tasa de mortalidad. En contraste, las larvas alimentadas con presas tratadas con spirotetramat lograron mudar y alcanzar la etapa adulta sin mayores cambios, aunque se observaron alteraciones en la fecundidad.

Junto a ello, se evaluó el efecto del imidacloprid y del spirotetramat en el ciclo de vida de *C. externa* cuando los huevos fueron tratados con estos insecticidas. Se aplicaron huevos con ambos productos por separado y se realizó el seguimiento hasta la etapa adulta. Los huevos de *C. externa* tratados con imidacloprid exhibieron una elevada tasa de mortalidad tanto en el estadio de huevo como en el primer estadio larval. Los que lograron avanzar hasta el tercer estadio larval experimentaron una alta tasa de mortalidad al intentar alcanzar el estadio pupal, y muy pocos individuos llegaron a la etapa adulta. La aplicación de spirotetramat sobre los huevos no tuvo ningún efecto significativo en cuanto a la longevidad ni la mortalidad. Sin embargo, se registró una alteración en la fecundidad.

Para finalizar, los adultos de *C. externa* fueron alimentados con imidacloprid y spirotetramat para analizar su efecto. Se proporcionaron los insecticidas en los bebederos a los adultos, y se realizó un seguimiento del efecto. Además, las cabezas de los organismos muertos fueron cortadas con micrótopo para la observación histológica. El imidacloprid en los individuos adultos produjo una alta tasa de mortalidad, junto con síntomas de neurotoxicidad. En las cabezas de estos individuos, se observaron diferencias significativas en la textura del ganglio cefálico, mostrando una elevada cantidad de vacuolas en la región continua del ganglio. Por otro lado, la ingesta de spirotetramat no tuvo efecto en la mortalidad de los individuos.

En la última parte de la sección 4, se evaluó el daño genotóxico de los productos. En la primer parte, se determinó el impacto sobre el ADN del imidacloprid en huevos de *C. externa*. Para ello, se llevó a cabo el ensayo cometa alcalino, adaptado específicamente para esta especie, sobre huevos tratados con diferentes concentraciones. Además, se realizó un análisis gráfico

de las imágenes de cometa obtenidas para determinar longitudes de cola, áreas de cometa e índices de daño. Se constató que el imidacloprid causó daño a nivel de ADN en los huevos de *C. externa*, observándose un aumento significativo en el daño con concentraciones más elevadas a medida que avanzaba el desarrollo del huevo. Para finalizar, en esta sección, se evaluó el impacto a nivel citogenético y sobre el ADN del imidacloprid y spirotetramat en huevos de *C. externa*. Se realizaron preparados de citogenética con tinción de orceína y se observaron las aberraciones cromosómicas presentes. Además, se realizó el ensayo cometa alcalino con huevos tratados en las concentraciones más altas para evaluar el daño. Se confirmó que ambos productos generan aberraciones cromosómicas en aproximadamente 4% de las células en división, siendo la principal aberración la presencia de cromosomas fuera de la placa en la metafase mitótica. Mediante el ensayo cometa, se determinó que ambos productos provocan daño a nivel del ADN.

Se concluye que a través de los ensayos toxicológicos realizados, se ha podido determinar que el spirotetramat exhibe un perfil de menor toxicidad para *C. externa* en comparación con el imidacloprid. En términos de supervivencia y desarrollo, el spirotetramat se ha revelado como un insecticida con una toxicidad menor para *C. externa*, superando al imidacloprid en este aspecto. No obstante, se observaron efectos adversos a nivel reproductivo en presencia de spirotetramat, lo que apunta a la necesidad de considerar su impacto a corto plazo en las poblaciones naturales presentes en los agroecosistemas.

La citogenética reveló ser una herramienta esencial para el análisis de los daños cromosómicos inducidos por los insecticidas en *C. externa*. Esta técnica de detección, además de ser sencilla y económica, prescinde de instalaciones o productos costosos, destacando su accesibilidad y utilidad en la evaluación de los efectos genotóxicos. La técnica de ensayo cometa alcalino fue una herramienta eficaz para identificar de manera rápida y precisa los daños a nivel de ADN causados por los insecticidas.

Se puede concluir que, la aplicación de insecticidas en la agricultura incide de manera directa e indirecta en organismos no blanco, generando impactos significativos. La comprensión profunda de estos efectos es esencial para formular recomendaciones precisas en el marco del MIP. El objetivo no solo es asegurar la producción de alimentos más seguros, sino también reducir al máximo los daños ambientales asociados con el uso de estos productos en el agroecosistema.

De forma complementaria, en el anexo se puede encontrar un análisis de la especie *C. argentina*. Se evaluó su anatomía interna y su cariotipo con el fin de aportar información sobre esta especie.

Abstract

Integrated Pest Management (IPM) is presented as a comprehensive approach that seeks compatibility among various control techniques to maintain balance in agricultural ecosystems. This method is based on the knowledge of biological interactions, crop information, and the surrounding environment. Within IPM, strategies such as mechanical, ethological, chemical, and biological control are prominent, with the latter being of particular importance.

The Chrysopidae family plays a significant role in agriculture by contributing to the biological control of pests, especially during their larval stages, when they consume sap-sucking pests such as aphids, scale insects, and whiteflies. Species such as *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) and *Chrysoperla argentina* (González Olazo & Reguilón, 2002) (Neuroptera: Chrysipidae) are effective agents for reducing agricultural pest populations, demonstrating their usefulness in IPM. However, the introduction of synthetic pesticides in agriculture has raised concerns about their effects on non-target organisms, such as *C. externa*, causing both direct and indirect effects on their behavior.

Among the insecticides used to control sap-sucking pests, neonicotinoids are known to affect the central nervous system of insects. Their widespread use over the years has revealed unexpected consequences for biodiversity, affecting the health of beneficial species, such as *C. externa*. In addition to affecting the central nervous system, these compounds cause damage to lipids, DNA, and proteins, compromising the survival and behavior of these beneficial organisms. In response to these challenges, more specific insecticides, such as tetraoic acid derivatives, have been introduced to reduce the environmental impact.

In this context, the impact of a neonicotinoid, imidacloprid, and a tetraoic acid insecticide, spirotetramate, was evaluated in *C. externa*. The analysis focused not only on aspects related to mortality but also on reproductive damage. Advanced techniques such as the alkaline comet assay have been used to analyze potential DNA damage, providing a comprehensive view of the environmental impacts of insecticides used in modern agriculture.

The aim of this study is to assess the toxicity induced by commercial formulations of the insecticides imidacloprid and spirotetramat on the generalist predator *C. externa*, incorporating, in addition to the bioecological assessments, cytogenetics as a new tool for ecotoxicological diagnosis.

The *C. externa* specimens used in this study were reared in the Laboratory of Ecotoxicology, Pesticides, and Biological Control at the Center for Parasitology and Vector Studies (CEPAVE) affiliated with the National University of La Plata, CONICET, and CICPBA, based in La Plata, Argentina. The details of the materials and methods used are described in Chapter 3. This study was made possible by a doctoral scholarship funded by CONICET and supported by PUE Project No. 22920160100036CO was awarded to CEPAVE and CONICET PIP No. 0205 and No. 0893 was granted to Dra. Schneider.

In Chapter 4, section one; the morphological characterization of *C. externa* is presented. Morpho-colorimetric characterization of the eggs was performed through direct observation and microscopic preparation using alcoholic dehydration. The eggs showed morphological differences throughout their development, facilitating their identification by sight. These changes are supported by embryonic development. Additionally, a histological study of male *C. externa* was conducted, in which the specimens were embedded in paraffin and sectioned using a microtome for internal observation. The structures of the digestive, reproductive, and cerebral ganglia were detailed.

An analysis of pupal changes occurring within the *C. externa* cocoon was performed to identify key transformations in the pupa through direct observation. This description was complemented by histological sections to observe internal changes.

Cytogenetic studies on *C. externa* were performed. Karyotype, cell cycle, and mitosis were analyzed. This procedure included preparation of colchicine-treated eggs and staining with orcein. Chromosomal pairs were determined, a detailed analysis of each pair's size was conducted, and a corresponding nomenclature was assigned. Furthermore, natural banding patterns were identified and sex chromosomes were characterized.

In Section 4.2, the toxicological effects of the insecticides are evaluated. First, the effect of imidacloprid on *C. externa* pupae was assessed. Applications of the recommended dose were made using a Burkard applicator on the pupae, and the individuals were monitored until adulthood. No significant differences in mortality were observed, supporting the hypothesis that cocoons protect pupae. The fertility of adults emerging from treated pupae was

significantly lower than that of adults in the control group. Although the number of eggs was low, they hatched normally. Imidacloprid application at this stage only affected adult fertility.

The effect of imidacloprid on *C. externa* larvae and prepupae was also evaluated. Applications of the recommended dose were made using the Burkard applicator, and the individuals were monitored until adulthood. The larvae showed uncoordinated movements and difficulty spinning their protective pupal cocoons, resulting in death. Very few individuals reach adulthood. The prepupal stage allowed a greater number of individuals to reach adulthood, highlighting the crucial role of cocoons as a barrier against pesticides. Imidacloprid decreased both fecundity and fertility, resulting in non-viable eggs.

Additionally, the effect of imidacloprid and spirotetramat was analyzed when larvae fed on contaminated prey. For this, *C. externa* larvae were fed aphids contaminated with these insecticides, and they were monitored until the adult stage. The ingestion of imidacloprid-contaminated larvae induced a high mortality rate. In contrast, larvae fed on prey contaminated with spirotetramat successfully molted and reached adulthood without significant changes, although alterations in fecundity were observed.

In addition, the effects of imidacloprid and spirotetramat on the life cycle of *C. externa* were evaluated when eggs were treated with these insecticides. The eggs were treated separately with both products and monitored until adulthood. *C. externa* eggs treated with imidacloprid exhibited a high mortality rate during both the egg and first larval stages. Those that reached the third larval stage experienced high mortality when attempting to pupate, with very few individuals reaching adulthood. Spirotetramat application to eggs did not significantly affect longevity or mortality, although fecundity was altered.

Finally, adult *C. externa* were fed imidacloprid and spirotetramate to analyze their effects. Insecticides were provided to the drinking vessels and their effects were monitored. In addition, the heads of the deceased organisms were sectioned using a microtome for histological observation. Imidacloprid in adult individuals caused a high mortality rate, along with neurotoxicity symptoms. Significant differences in the texture of the cephalic ganglion were observed, with a large number of vacuoles in the continuous region of the ganglion. In contrast, spirotetramat ingestion did not affect mortality rate.

In the final part of Section 4, genotoxic damage caused by these products is evaluated. First, the impact of imidacloprid on *C. externa* egg DNA was assessed. The alkaline comet assay, specifically adapted for this species, was conducted on eggs treated with different doses. Furthermore, graphical analysis of the comet images was performed to determine the tail

lengths, comet areas, and damage indices. We confirmed that imidacloprid caused DNA damage in *C. externa* eggs, with a significant increase in damage at higher doses as egg development progressed.

Finally, in this section, the cytogenetic and DNA-level impact of imidacloprid and spirotetramate on *C. externa* eggs was evaluated. Cytogenetic preparations stained with orcein were carried out, and chromosomal aberrations were observed. In addition, the alkaline comet assay was performed on eggs treated with the highest doses to assess DNA damage. It was confirmed that both products induce chromosomal aberrations in approximately 4% of dividing cells, with the main aberration being chromosomes outside the metaphase plate. The comet assay further revealed that both products cause DNA damage.

It is concluded that the toxicological assays conducted have determined that spirotetramat exhibits a lower toxicity profile for *C. externa* than imidacloprid. In terms of survival and development, spirotetramat has been proven to be an insecticide with lower toxicity for *C. externa*, outperforming imidacloprid in this aspect. However, adverse effects on reproduction were observed in the presence of spirotetramat, highlighting the need to consider its short-term effects on natural populations within agroecosystems.

Cytogenetics has proven to be an essential tool for analyzing chromosomal damage induced by insecticides in *C. externa*. In addition to being simple and cost-effective, this detection technique does not require expensive facilities or products, emphasizing its accessibility and utility in assessing genotoxic effects. The alkaline comet assay is an effective tool for rapidly and accurately identifying insecticide-induced DNA damage.

It can be concluded that the application of insecticides in agriculture has both direct and indirect effects on non-target organisms, resulting in significant effects. A thorough understanding of these effects is crucial to formulate precise recommendations within the framework of Integrated Pest Management (IPM). The goal is not only to ensure safer food production but also to minimize the environmental damage associated with the use of these products in agroecosystems.

Additionally, the appendix includes an analysis of *C. argentina*. Their internal anatomy and karyotypes were evaluated to provide information about this species.

Capítulo 1:

Introducción general



1.1 Manejo integrado de plagas

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) según la FAO (s.f) comprende *“todas las técnicas disponibles para combatir las plagas y la posterior integración de medidas apropiadas que disminuyen el desarrollo de poblaciones de plagas. El MIP combina estrategias y prácticas específicas de gestión biológica, química, física y agrícola para producir cultivos sanos y minimizar la utilización de plaguicidas, mitigando o reduciendo al mínimo los riesgos que plantean estos productos para la salud humana y el medio ambiente.”*

El MIP se basa en el uso de numerosas técnicas de control de plagas con la idea de que sean compatibles entre ellas. Se apoya en la idea del conocimiento de las interacciones biológicas, información sobre el cultivo y el entorno circundante. Las estrategias de control de plagas apuntan a minimizar las poblaciones de ciertos agentes, pero manteniendo un equilibrio en los ecosistemas (Ilustración 1) (Da Costa *et al.*, 2019).

Dentro del MIP se incluyen técnicas como el control mecánico, control etológico, control químico y control biológico (Cucchi, 2020). El control biológico comprende el uso de organismos vivos (depredadores, parasitoides, patógenos y herbívoros) para el control de las poblaciones plagas, ya sea mediante la introducción de organismos o modificando su hábitat para aumentar la población existente. Según van Driesche *et al.* (2007) dentro del control biológico existen diferentes alternativas las cuales se clasifican tradicionalmente como:

- Control biológico clásico: comprende la importación de un enemigo natural para controlar una plaga;
- Control biológico de nueva asociación: incluye la búsqueda de un controlador en el área nativa por más que la especie plaga sea exótica;
- Control biológico aumentativo: comprende la liberación periódica de enemigos naturales criados en otro lugar para aumentar su población en el agroecosistema;
- Control biológico de conservación: comprende todas las técnicas para mejorar el establecimiento y permanencia en el lote de los enemigos naturales ya presentes en el área, como brindarles refugio, fuente de alimentación suplementaria, etc.

1.2 Chrysopidae en el control biológico

El orden Neuroptera está compuesto por insectos holometábolos, con metamorfosis completa y habitualmente presentan tres estadios larvarios. Incluye a más de 6000 especies (Chen *et al.*, 2019; Ribera & Melic, 2015) y se encuentra distribuido en todo el mundo a excepción de la Antártida (Gerth *et al.*, 2017).

El orden se compone de 17 familias, siendo Chrysopidae la segunda en importancia con 1416 especies agrupadas en 82 géneros distribuidos alrededor del mundo (Garzón-Orduña *et al.*, 2018; Winterton & Freitas, 2006;). Esta familia tiene una gran relevancia para la agricultura debido a que varias especies son utilizadas como agentes destinados al control biológico de plagas durante sus estadios larvales y algunas de ellas, incluso, en su etapa adulta (Ribeiro *et al.*, 2013; Villa *et al.*, 2019).

En la primera parte del siglo XIX, los géneros dentro de la familia Chrysopidae, se clasificaron por un número reducido de caracteres, lo que resultó en una gran dificultad para la taxonomía de las especies. Desde 1970 hasta 1990 los investigadores asociaron los caracteres tradicionales junto con caracteres biológicos permitiendo una diferenciación del género *Chrysoperla*. Éste se caracteriza taxonómicamente por la presencia de un labio redondeado en el ápice del esternito 8+9 del macho y biológicamente, por comportamientos específicos en los diferentes estadios. La ovipostura de huevos es individual, con pedicelos. Las larvas se mantienen desnudas y tienen un rápido desarrollo. Los adultos tienen una alimentación exclusivamente de sustancias azucaradas, una gran capacidad de dispersión, y al entrar en diapausa invernal, cambian su coloración a café-rosado (Olazo *et al.*, 2009; Pantaleoni & Sechi, 2014).

Las especies citadas para Argentina dentro del género *Chrysoperla* son *C. externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae), *C. argentina* (González Olazo & Reguilón, 2002) (Neuroptera: Chrysipidae), *C. asoralis* (Banks, 1915) (Neuroptera: Chrysipidae) y *C. defreitasi* (Brooks, 1994) (Neuroptera: Chrysopidae) siendo las tres primeras las de mayor presencia en los campos agrícolas motivo por el que se las considera de importancia para el control biológico de plagas (Haramboure *et al.*, 2014).

Los estadios inmaduros de *C. externa* y *C. argentina* actúan como depredadores activos de las principales plagas agrícolas, ya que su alimentación comprende áfidos, cóccidos, huevos de lepidópteros e insectos de cuerpo blando (Giffoni *et al.*, 2007; Valencia Luna *et al.*, 2006). En

contraste, los adultos se alimentan principalmente de néctar, polen y melazas (Olazo *et al.*, 2009).

Dadas las preferencias alimenticias de sus estadios juveniles, las especies de *Chrysoperla* son altamente utilizadas en estrategias de manejo integrado de plagas. Estas estrategias pueden implicar la liberación periódica de individuos criados en masa (Redolfi, 2014) y/o la modificación del hábitat para fomentar su presencia, a través del control biológico por conservación, que busca mantener las poblaciones naturalmente presentes en el cultivo (Andorro y Fernandez, 2020).

Chrysoperla externa es considerada con un alto potencial para el control biológico por su amplia capacidad de adaptación, su fácil producción a gran escala y amplia distribución en distintos ecosistemas (Giffoni *et al.*, 2007; Valencia Luna *et al.*, 2006). En tanto que, los estudios empleando *C. argentina* como especie controladora son más recientes, existiendo ensayos a campo que demuestran que la especie actúa como un controlador biológico eficaz para combatir la mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856) (Homoptera: Aleyrodidae)) (Flores *et al.*, 2015).

1.2.1. *Chrysoperla externa*

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *C. externa* ha sido ampliamente documentado (Ilustración 2), y siguiendo las descripciones de Núñez (1989), se puede detallar con precisión. Las hembras realizan la oviposición de manera continua a lo largo de su vida. Los huevos son individuales y están sostenidos por un pedicelo hialino de 4-6 mm de longitud. Estos huevos presentan una micrópila distal por la cual emerge la larva, de cuerpo fusiforme. La coloración larval puede variar dependiendo de su alimentación, aunque tiende a mostrar tonalidades marrones verdosas. El aparato bucal de la larva adopta la forma de una pinza de lados curvos, lo que le permite inmovilizar a sus presas para luego inyectar enzimas digestivas y succionar posteriormente los fluidos. En la parte dorsal de la cabeza, se distingue un diseño similar a una "Y" central. En el protórax, mesotorax y metatorax, se encuentran un par de tubérculos laterales con pelos.

Las larvas atraviesan tres estadios en los cuales aumentan su ingesta alimenticia. Al finalizar el tercer estadio, la larva suspende la alimentación, permanece inmóvil y comienza a tejer un capullo. Este capullo está elaborado con hilos finos de sustancia mucoproteica secretada por los tubos de Malpighi, que emergen por la abertura anal. La finalización de la construcción del capullo marca el inicio del estadio de prepupa. Después de tres días, pasa al estado de pupa, que es exarata y de color verde. La etapa de pupa tiene una duración aproximada de 10 días, tras la cual el adulto emerge al romper el capullo por el extremo apical.

El adulto presenta un tono verde claro con alas membranosas de gran tamaño y se distingue por las manchas rojizas en el rostro.

La duración de las etapas está influenciada por la temperatura y la alimentación. Canard & Volkovich (2001) indican que de huevo a adulto se tardan 27 días a 24°C. Los adultos tienen una longevidad diferencial entre sexos siendo superiores las longevidades en las hembras. Los machos viven en aproximadamente 66,38 días y las hembras 82,38 cuando los individuos son criados en laboratorio y alimentados con miel junto con levadura de cerveza (Lira & Batista, 2006).

Anatomía interna

El sistema digestivo de los adultos se sitúa principalmente en el abdomen y consta de varias secciones. La primera parte incluye la faringe, el esófago, el buche y un divertículo. En la parte final del intestino anterior se localiza el proventrículo. El intestino medio, un tubo alargado de diámetro casi uniforme, es seguido por el intestino posterior, donde se encuentran los túbulos de Malpighi. Esta sección está conformada por el íleon, seguido de un saco rectal que presenta cuatro almohadillas rectales (Dantas *et al.*, 2021).

El aparato reproductor masculino se halla entre los segmentos abdominales sexto y séptimo e incluye un par de testículos, conductos deferentes, vesículas seminales, glándulas accesorias y un conducto eyaculador. Los testículos, de tono amarillo brillante, presentan formas alargadas y retorcidas, albergando células germinales en diversas etapas de desarrollo. Por su parte, las vesículas seminales tienen una forma ovalada y están revestidas por un epitelio cúbico simple, rodeado de músculo y lleno de espermatozoides (Dantas *et al.*, 2021b).

El aparato reproductor femenino de las hembras se sitúa entre los segmentos abdominales 4 y 7, constando de un par de ovarios conectados por un par de oviductos laterales que

desembocan en un oviducto común. Este último, está asociado con una espermateca y una glándula colateral. Los ovocitos varían en tamaño a medida que progresan en su desarrollo (Dantas *et al.*, 2021b).

Citogenética

El número cromosómico de esta especie es $2n = 10A + XY$ (Andrada *et al.*, 2012). Los cromosomas tienen morfología telocéntrica con un cariotipo homogéneo que disminuye gradualmente de tamaño. La determinación del sexo es del tipo XY/XX, el tamaño de ambos es diferente ubicando al cromosoma X entre los pares 1 y 2 y el Y entre los pares 4 y 5 (Lopes, 2012).

1.2.2. *Chrysoperla argentina*

Ciclo de vida

El estudio del ciclo de vida de *C. argentina* es menos exhaustivo en comparación con el de *C. externa*. Según las descripciones de González Olazo & Reguilón (2002) y Reguilón *et al.* (2006), las hembras oviponen huevos solitarios, alargados y elípticos de tono verdoso sostenidos por un pedicelo. Esta tonalidad cambia a un pardo claro conforme avanza el desarrollo embrionario, tornándose pardo oscuro justo antes de la eclosión. La larva presenta un cuerpo fusiforme, más ancho en el mesotorax y metatórax, cubierto por finas setas, y se distingue por una mancha en forma de 'V' en la cabeza. Durante la etapa de pupa, se forma un capullo sedoso blanco de forma esférica que oculta su interior. Tras la emergencia, los adultos exhiben un tono verde brillante con ojos negros relucientes. Las patas muestran una tonalidad verde amarillenta clara, aclarándose aún más hacia las extremidades distales de la tibia.

Aunque presenta un comportamiento similar a *C. externa*, aún persiste la falta de conocimiento sobre su anatomía interna y la duración precisa de los diferentes estadios, lo que complica notablemente la evaluación del impacto toxicológico de esta especie.

Los estudios cromosómicos de *C. argentina* se encuentran solo realizados en meiosis. Su número cromosómico es $2n = 10A + XY$ (Andrada *et al.*, 2012). Las células meióticas en interfase presentan la cromatina descondensada, y un par de cuerpos heteropinóticos positivos, que corresponderían al par sexual. Las metafases I presentan cromosomas sexuales con segregación a distancia (Andrada *et al.*, 2012).

1.3 Los pesticidas en el control de plagas

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) define a los plaguicidas como *“cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga, incluidas vectores de enfermedades humanas o animales, especies no deseadas de plantas o animales que causan daño o interferir de otro modo con la producción, el procesamiento, el almacenamiento, el transporte o la comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales [...]”* (FAO, 1996; Maksymiv, 2015).

Los plaguicidas se pueden clasificar de diferentes formas, ya sea por organismo blanco (por ejemplo, insecticidas, que controlan insectos; herbicidas, que controlan malezas; fungicidas, que controlan hongos), por su estructuras químicas (organoclorados, organofosforados, carbamatos, neonicotinoides, entre otros) o por su estado físico (sólido, líquido, aerosol) (Maksymiv, 2015; Ramirez & Lacasaña, 2001).

1.3.1 Neonicotinoides

Los insecticidas neonicotinoides hicieron su entrada al mercado en 1990 como una nueva categoría de productos, destacados por su alta selectividad para los mamíferos, gracias a la diferenciación de los receptores nicotínicos específicos entre insectos y mamíferos (Honda *et al.*, 2006; Katić *et al.*, 2021). Estos químicos actúan en el sistema nervioso central, provocando una estimulación persistente de los receptores nicotínicos que conduce a una sobreestimulación de las sinapsis. Este efecto desencadena diversos síntomas como

hiperexcitación, temblores, convulsiones, parálisis y finalmente la muerte del insecto (Araújo *et al.*, 2023; Puricelli & Arregui, 2008).

Con el paso del tiempo, los neonicotinoides han modificado su composición química, dando lugar a tres grupos principales: nitroguanidinas, nitrometilenos y cianoamidas (Figura 1).

El imidacloprid [1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N -nitro-imidazolidin-2-ilidenamina] (CAS 138261-41-3), se convirtió en el primer insecticida neonicotinoide registrado en el mercado en 1988. Este producto se destacó en campo por su alta efectividad contra insectos, su baja persistencia en el suelo y una toxicidad relativamente baja en mamíferos. Su modo de acción se dirige hacia los receptores nicotínicos de acetilcolina (Figura 2) (Araújo *et al.*, 2023; Buckingham *et al.*, 1997). Todos los neonicotinoides actúan como agonistas en los receptores nicotínicos de acetilcolina postsinápticos (nAChR) en el sistema nervioso central de los invertebrados, compitiendo con el neurotransmisor natural acetilcolina (ACh) (Morrissey *et al.*, 2015).

Cuando el imidacloprid hizo su aparición en el mercado en 1988, se presentó como una alternativa óptima en el manejo integrado de plagas. Su persistencia sistémica permitía su translocación dentro de las plantas durante un período moderado, lo que sugería que una sola aplicación podría controlar las principales plagas succionadoras en los cultivos, evitando la necesidad de aplicaciones foliares continuas. Esta característica ofrecía la ventaja adicional de preservar a los insectos beneficiosos, ya que no estarían expuestos a tratamientos foliares repetidos, aumentando así sus posibilidades de supervivencia. No sólo se lo consideraba una herramienta directa para el control de plagas, sino que también se reconocía su capacidad para ejercer un control indirecto mediante la repelencia, la reducción o detención de la alimentación, la disminución de la actividad reproductiva, la limitación general del movimiento o actividad, y una mayor susceptibilidad de las plagas a ser depredadas (Mullins, 1993).

El uso del imidacloprid en la actualidad no se encuentra limitado a los cultivos agrícolas, sino que se utiliza para la medicina veterinaria y como insecticida doméstico (Katić *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2018).

En condiciones típicas de aplicación en el campo, es decir, con la maquinaria de pulverización adecuada y a las concentraciones recomendadas por el fabricante, sólo una pequeña porción del plaguicida aplicado llega al objetivo biológico. La mayoría se libera en el ecosistema, donde para evitar la contaminación o la acumulación debe degradarse de forma biológica, abiótica o fotoquímica (Wamhoff & Schneider, 1999). El proceso de degradación generalmente conduce a la formación de productos de descomposición menos dañinos, pero en algunos casos también se pueden producir productos más tóxicos, lo que puede constituir un riesgo

potencial para el medio ambiente, produciendo toxicidad en organismos no objetivo y acumulación de moléculas tóxicas en las cadenas tróficas (Tišler *et al.*, 2009; Wamhoff & Schneider, 1999). Bajo este marco, los neonicotinoides tienen una vida media entre 1 día y 19 años según las características de sus estructuras y su movilidad dentro de los vegetales. Estos compuestos al poseer un rango de persistencia variable, sumado a una alta solubilidad en agua y baja absorción en el suelo, presenta un potencial problema para la salud humana y ambiental (Katić *et al.*, 2021).

A pesar de la creencia original que los neonicotinoides tienen una baja toxicidad en los mamíferos, cada vez hay más evidencia de que los neonicotinoides también podrían causar una variedad de efectos tóxicos en los animales y humanos, tales como neurotoxicidad, inmunotoxicidad, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y en reproducción, junto con efectos citotóxicos en vertebrados e invertebrados (Araújo *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2018). Por ello desde 2016 en diferentes países, principalmente los que conforman la Unión Europea, se encuentra suspendido o prohibido (Araújo *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2018).

Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre el efecto del imidacloprid en la fauna. Los análisis de toxicidad en artrópodos sugieren una unión prolongada a los receptores nicotínicos, lo que indica que la exposición repetida o crónica puede generar efectos acumulativos en el tiempo (Morrissey *et al.*, 2015). Se observaron disminuciones en colonias de *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Apidae), deterioro en la microbiota de *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Apidae) tras exposiciones subcrónicas que llevaron a la muerte (Zunino, 2022), y reducción de las colonias y fertilidad (Whitehorn *et al.*, 2012), entre otros estudios. Según Suchail *et al.* (2004), se sugiere que en abejas melíferas, la molécula de imidacloprid podría ocasionar síntomas neurotóxicos iniciales, mientras que la combinación de sus metabolitos secundarios, como 5-hidroxiimidacloprid y olefina, incluso en concentraciones residuales mínimas, podría estar asociada con la inducción de mortalidad. También, se ha observado daño indirecto en tordos (*Agelaioides badius* (Vieillot, 1819) (Passeriformes: Icteridae)) debido al consumo de semillas contaminadas (Poliserpi, 2021).

En el lanzamiento comercial, se suponía que los neonicotinoides, debido a su modo de acción, no causarían daños en organismos no blanco, lo que llevó a investigaciones exhaustivas sobre su verdadero impacto en los seres vivos. Estudios revelaron que estos compuestos inducen daños en lípidos, ADN y proteínas tanto en vertebrados como en invertebrados, posiblemente debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS),

desencadenando estrés oxidativo (Wang *et al.*, 2018). Se ha identificado una relación directa entre la concentración de neonicotinoides y el daño al ADN (Wang *et al.*, 2018).

En investigaciones realizadas en *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) (Diptera: Drosophilidae), se observó que la exposición al imidacloprid desencadena un flujo constante de iones de calcio hacia las neuronas, aumentando las ROS en el cerebro y generando un incremento de las ROS mitocondriales primero en las células cerebrales y luego en el intestino. Este proceso conduce directamente a una reducción en la producción de ATP. Al mismo tiempo, el incremento de las ROS en el cerebro causa una disminución en la actividad mitocondrial de las neuronas e induce la acumulación de pequeñas gotas de lípidos en las células gliales (Marteli *et al.*, 2020). La exposición prolongada al imidacloprid también disminuye los marcadores antioxidantes como el glutatión, perturbando el equilibrio reducción-oxidación (RedOx) en *Chironomus riparius* (Meigen, 1804) (Diptera: Chironomidae) (Chandran *et al.*, 2018)

En el interior de las células, las especies ROS tienen su principal fuente de origen en las mitocondrias. Estas sustancias mantienen un equilibrio dinámico con las enzimas antioxidantes. Se ha verificado que los insectos emplean diversos mecanismos bioquímicos, como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa y catalasa, para limitar los daños provocados por las ROS (Boardman *et al.* 2012).

Cuando se altera el equilibrio entre las ROS y el complejo enzimático antioxidante, estas sustancias reactivas se vuelven inestables en el interior celular, vinculándose a moléculas biológicas y provocando el daño o destrucción de estas. Entre los efectos adversos, podemos mencionar la ruptura de cadenas de ADN y de membranas fosfolipídicas (Bayr, 2005; Fridovich, 1999; Sanz, 2016) (Figura 3). Esta teoría representa el principal mecanismo mediante el cual los neonicotinoides, particularmente el imidacloprid, ocasionan daño en las moléculas biológicas (Abdel-Halim & Osman, 2020; Duzguner & Erdogan, 2012; EL-Gendy *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2015).

1.3.1.1 Toxicología de los neonicotinoides sobre Chrysoperla externa

Se han realizado numerosos estudios ecotoxicológicos para analizar el efecto de los neonicotinoides en *C. externa*. El acetamiprid (en formulado comercial), por ejemplo, ha demostrado provocar una reducción en la supervivencia de huevos y en los primeros estadios larvales, así como muerte larval, muerte por ingestión de presas tratadas y mortalidad pupal

(Rimoldi *et al.*, 2017; Haramboure, 2016). El imidacloprid (en formulado comercial), por su parte, ha ocasionado la muerte de huevos, una disminución en la fecundidad de las hembras, muerte larval y mortalidad en adultos (Godoy *et al.*, 2008; Pasini *et al.*, 2020). Respecto al tiametoxam (en formulado comercial), ha generado mortalidad en larvas y adultos, reducción en la fertilidad y un incremento en el desarrollo de las etapas larvales (Sâmia *et al.*, 2019; Pasini *et al.*, 2020). En resumen, los principales neonicotinoides utilizados en la agricultura causan daños directos ejerciendo la mortalidad y también provocan efectos indirectos como la disminución en la fecundidad y fertilidad.

En este trabajo se evaluaron dos formulaciones comerciales de imidacloprid: Matrero 35® de la empresa Nufarm y Confidor OD® de la empresa Bayer. Inicialmente, los estudios se realizaron con Matrero 35®, que era el producto disponible en ese momento. Sin embargo, debido a razones comerciales ampliamente conocidas, como el cierre de importaciones y la escasez de insumos, no fue posible reponer el mismo producto. Por esta razón, se optó por utilizar Confidor OD®, que estuvo disponible para la continuación y finalización de las investigaciones.

1.3.2 Insecticidas derivados del ácido tetrámico

El ácido tetrámico se caracteriza por una estructura de anillos la cual está presente en numerosos compuestos naturales. El espectro de actividad biológica mostrado por los productos naturales que contienen ácido tetrámico es notable en su diversidad; incluye actividad antibiótica, propiedades antivirales, antifúngicas y antiulcerosas. En algunos casos se ha detectado inhibición tumoral en ratones, y también, es responsable de pigmentaciones en organismos como mohos y esponjas. Su estudio es amplio y se encuentra muy relacionado con la industria farmacéutica (Royles, 1995).

Dentro de la categoría de insecticidas con ácido tetrámico se encuentra el spirotetramat (cis-4-(etoxicarboniloxi)-8-metoxi-3-(2,5-xilil)-azaspiro-[4,5] dec-3-en-2-ona) (CAS 203313-25-1) (Figura 4). Este compuesto pertenece al grupo de los cetoenólicos y se caracteriza por su capacidad para inhibir la biosíntesis de lípidos, actuando como inhibidor de la acetil CoA carboxilasa. Esta acción impide la muda de los insectos, conduciendo finalmente a su muerte. Su uso está ampliamente dirigido al control de insectos fitófagos succionadores, mostrando una mayor eficacia en los estados inmaduros (Hussain & Gau, 2023; Ibis, 2010).

La efectividad del spirotetramat se manifiesta principalmente en los estados inmaduros, donde se observa una ecdisis incompleta, que impide que el insecto mude la totalidad de su exoesqueleto y, como resultado, se ve obstaculizado en su crecimiento. Sin embargo, en individuos adultos, la eficacia del tratamiento disminuye debido a la falta de muda. En las ninfas expuestas al producto, se ha registrado una alta mortalidad en un plazo de 24 h, lo que a su vez afecta significativamente su capacidad reproductiva al disminuir su fertilidad (Salazar-López *et al.*, 2016).

El spirotetramat es un principio activo considerado de última generación, y fue introducido al mercado de manera reciente. Aunque fue inicialmente aprobada en 2007, no obtuvo la aprobación para su uso en la Unión Europea hasta 2014. Los estudios disponibles sobre esta molécula son significativamente menos abundantes en comparación con los neonicotinoides. Sin embargo, las investigaciones actuales indicarían que es compatible con programas de MIP. Esto se evidencia en estudios que involucraron liberaciones de *Cryptolaemus montrouzieri* (Mulsant, 1850) (Coleoptera: Coccinellidae) y *Coccinella septempunctata* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Coccinellidae), donde se observó que el spirotetramat no causó efectos letales ni subletales, ya sea en aplicaciones directas o cuando se ofrecieron presas tratadas (Liu *et al.*, 2019; Planes *et al.*, 2012).

Además, se ha determinado que es un producto seguro para los sírfidos, ya que no afecta ni la mortalidad ni la fecundidad de estas especies (Salazar-López *et al.*, 2016). Sin embargo, en el caso de *Menochilus sexmaculatus* (Fabricius, 1781) (Coleoptera: Coccinellidae), se ha observado una reducción en la fecundidad, a pesar de que no se ha observado una disminución en la supervivencia (Azod *et al.*, 2020). Estos hallazgos coinciden con los informes de Elizondo *et al.* (2010), que indican un impacto directo en coccinélidos y chinches depredadoras. Además, se ha observado un alto índice de mortalidad en todos los estadios de *Galendromus occidentalis* (Arachnida: Mesostigmata) y *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) según lo informado por Salazar-López *et al.* (2016).

A diferencia de otros compuestos, existen pocos estudios que examinen cómo este producto afecta la fisiología de los artrópodos. El análisis mediante el ensayo cometa en ovarios de *Drosophila melanogaster* mostró un efecto genotóxico en dichas células (González-Marín *et al.*, 2021). En *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Crassiditellata: Lumbricidae), se observó un aumento del estrés oxidativo tras la exposición, lo que pudo inducir daños genéticos, también analizados por el ensayo cometa (Zhang *et al.*, 2015). Además, en el pez *Danio rerio* (Hamilton-

Buchanan, 1822) (Cypriniformes: Cyprinidae), la exposición incrementó el estrés oxidativo y causó daño a nivel de los ovocitos (Wu *et al.*, 2018).

Es importante destacar que no existen estudios sobre los efectos de esta molécula en *C. externa*.

En este trabajo se utilizó la formulación comercial Movento® de la empresa Bayer en todos los ensayos realizados.

1.4 Ecotoxicología

El descubrimiento en la mitad del siglo XX de que el insecticida organoclorado DDT (dicloro difenil tricloroetano) podía ingresar en las cadenas tróficas de los ecosistemas llevó a cuestionar la necesidad de comprender los efectos de diversos contaminantes en el entorno. Esta inquietud propició el surgimiento de la Ecotoxicología, una disciplina destinada a estudiar los impactos de los contaminantes en el ambiente (Planes & Fuchs, 2015).

La Ecotoxicología se define como *"la rama de la Toxicología relacionada con el estudio de los efectos tóxicos, causados por contaminantes naturales o sintéticos, a los componentes de los ecosistemas, animales (incluidos los humanos), vegetales y microbianos, en un contexto integral"* (Carriquiriborde, 2021; Di Marzio & Sáenz, 2013). Se trata de una disciplina sintética ya que muchas de sus herramientas y conocimientos utilizados, tales como las dosis respuestas o los bioensayos de toxicidad, han sido heredados de la toxicología y otras ramas de las ciencias (Carriquiriborde, 2021).

Existen diferentes formas de evaluar la toxicidad, la variable más frecuente es el análisis de la mortalidad de los individuos, sin embargo, pueden utilizarse índices o parámetros más sofisticados, como bioquímicos, fisiológicos, reproductivos y de comportamiento (Di Marzio & Sáenz, 2013).

Coexisten más de 100.000 sustancias producidas en cantidades que potencian o contaminan o afectan a los ecosistemas. Estas incluyen sustancias de uso doméstico tales como: detergentes, metales, cosméticos, fármacos, tinturas, plaguicidas, solventes, aditivos, etc. (Jørgensen *et al.*, 1998, como se citó en Di Marzio & Sáenz 2013; Miglioranza, 2021).

En el caso particular de los plaguicidas, éstos se mueven en el ambiente de diferentes formas según sus características químicas. Estas características también influyen en cómo será el comportamiento de la sustancia dentro de los organismos. Las sustancias entran a los organismos vía dérmica, respiratoria, digestiva, foliar o radicular, pudiendo bioconcentrarse, bioacumularse, biomagnificarse y biotransformarse (Carriquiriborde, 2021a; Di Marzio & Sáenz, 2013).

Las respuestas de los individuos a las sustancias tóxicas pueden manifestarse a diferentes niveles como: el nivel molecular (daño en ADN, enzimas, rutas metabólicas, entre otros), celular (muerte celular, aumento/disminución de divisiones, entre otros), histológico (desmielinización del tejido nervioso, malformación de gónadas, entre otros), fisiológico (neurotoxicidad, entre otros) y ello se traduce como una manifestación fisiológica y comportamental que conduce a un efecto adverso sobre la supervivencia, desarrollo y reproducción (Carriquiriborde, 2021b).

En el contexto de la Ecotoxicología, se llevan a cabo bioensayos que consisten en exponer a una población representativa de organismos a diferentes concentraciones de un agente químico, físico o biológico o de una muestra ambiental. Durante un periodo determinado, se registran las respuestas, o puntos finales, que pueden variar desde fenómenos de "todo o nada" como la mortalidad hasta efectos graduales como el crecimiento o la reproducción (fecundidad). Estos puntos finales pueden abarcar cualquier respuesta cuantificable relacionada con la dosis química o la exposición, como cambios en la actividad enzimática, alteraciones tisulares, patologías o modificaciones en el comportamiento. La duración de la exposición de los organismos a los químicos define si los ensayos son agudos o crónicos (Carriquiriborde, 2021; Di Marzio & Sáenz, 2013).

En el ámbito de los estudios ecotoxicológicos, los biomarcadores se han consolidado como herramientas clave para evaluar la respuesta biológica de los organismos frente a sustancias tóxicas. Estos marcadores permiten identificar los primeros daños a nivel celular, tisular, fisiológico, bioquímico o de comportamiento, y son esenciales para comprender las repercusiones de estos daños a nivel de poblaciones proporcionando una visión integral de la exposición a contaminantes (Di Marzio y Sáenz; 2013).

La definición de biomarcador, según Newman y Clements (2008) y Gupta (2014) (como se citó en Ruiz de Arcaute, 2018), se refiere a cualquier cambio cuantificable en un organismo vivo, que permite identificar y caracterizar la exposición a contaminantes específicos. Estos cambios,

que reflejan alteraciones en la respuesta biológica, son indicativos tanto de la exposición a xenobióticos como de los efectos tóxicos que estos pueden provocar (Mudry y Carballo, 2006).

Los biomarcadores se pueden clasificar en: biomarcadores de exposición, de susceptibilidad y de efecto (Ruiz de Arcaute, 2018). Los biomarcadores de efecto son aquellos que indican alteraciones bioquímicas, fisiológicas o genéticas resultantes de la exposición a un agente xenobiótico. Estas alteraciones pueden manifestarse como daño o patología, dependiendo de su magnitud (Ruiz de Arcaute, 2018). Entre estos biomarcadores se encuentran, por ejemplo, los que evalúan efectos letales como la mortalidad, y subletales como marcadores bioquímicos, como por ejemplo, minisatélites y microsatélites, marcadores fisiológicos como la expresión y actividad de enzimas, citotóxicos como la detección de procesos apoptóticos, genotóxicos como la estimación de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas, etc.

Dentro de los biomarcadores de efecto, el ensayo cometa o ensayo de electroforesis en gel es uno de los más comúnmente utilizados para evaluar el efecto genotóxico. Este ensayo evalúa la fragmentación de las cadenas del ADN provocadas por agentes xenobióticos, mediante el desenrollamiento y la migración electroforética de las unidades de ADN. Este procedimiento implica la lisis de las membranas, el desenrollamiento de las hélices, la electroforesis y, finalmente, la neutralización (Di Marzio & Sáenz, 2013).

1.4.1 El ensayo cometa

El ensayo del cometa es una técnica de amplia utilización a nivel global en la detección de daños inducidos sobre la molécula de ADN en pruebas de genotoxicidad y en estudios de biomonitorio en seres humanos. Particularmente, el ensayo del cometa en su variante alcalina es un método sensible que detecta principalmente roturas de cadenas de ADN (RC) dobles, cadenas simples y sitios álcali-lábiles (SAL) (Singh *et al.*, 1988) como los sitios apurínicos y apirimidínicos y los fosfotriésteres; en el núcleo de prácticamente todos los tipos de células eucariotas (Collins *et al.*, 2023).

El principio del ensayo cometa se basa en la organización espacial del ADN en el núcleo, es decir, bucles de ADN formados por la unión de la molécula lineal a intervalos a la matriz nuclear y el enrollamiento adicional de la doble hélice alrededor de las membranas nucleares y las proteínas para formar nucleosomas. Esta organización significa que, cuando las proteínas

se eliminan durante la lisis, el ADN permanece en un estado superenrollado compacto. Sin embargo, si hay presente una RC de ADN ya sea simple o doble, o un SAL, el superenrollamiento de los bucles se relaja. Como resultado de esta relajación, estos bucles, que todavía están unidos a la matriz nuclear, son atraídos hacia el ánodo, formando la característica "cola de cometa", vista al microscopio de fluorescencia (Collins *et al.*, 2023; Gajski *et al.*, 2019).

El procedimiento implica embeber células en una matriz de agarosa, seguido por la lisis celular en condiciones alcalinas. Luego, las células se someten a electroforesis y se neutralizan. Posteriormente, se tiñen un colorante con especificidad por el ADN para visualizar y calcular el grado de daño en el ADN (Figura 5). En esencia, el ADN intacto se encuentra en la "cabeza" del cometa, mientras que la cantidad de ADN en la cola del cometa indica el daño real del material genético de la célula, la migración del ADN es directamente proporcional al daño (Gajski *et al.*, 2019; Collins *et al.*, 2023).

En forma tradicional las imágenes se clasifican visualmente dándole un grado o valor el cual determina un índice de daño. También en la actualidad existen diferentes programas de computación que permiten análisis gráficos de las imágenes obtenidas, pero pueden tener problemas de análisis en cometa muy dispersos, es decir con grandes migraciones de ADN en el gel.

En resumen, el ensayo cometa ofrece la ventaja de poder aplicarse a cualquier población celular eucariota, independientemente de su actividad mitótica o de la fase del ciclo celular en la que se encontraban durante la exposición al xenobiótico. Además, requiere solo una pequeña cantidad de tejido o células, y además de los métodos visuales para categorizar el daño, los resultados pueden analizarse mediante programas informáticos y obtenerse en un corto período de tiempo por parte de un observador (Tice *et al.*, 2000; Collins, 2004).

Este ensayo ha sido ampliamente utilizado en diversos grupos de organismos para investigar contaminantes y efectos de la radiación. Sin embargo, en el ámbito de los insectos, la mayoría de los estudios se han centrado en dípteros y polillas, con escasos análisis con pesticidas como contaminantes. Por ejemplo, se han realizado estudios del daño causado por el dimetoato (insecticida organofosforado) en *Chorthippus biguttulus* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera: Acrididae) (Karpeta-Kaczmarek *et al.*, 2016), el paraquat (herbicida) en células neuronales de *Chorthippus brunneus* (Thunberg, 1815) (Orthoptera: Acrididae) (Augustyniak *et al.*, 2015), y mezclas de fitoinsecticidas como el aceite de neem en *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808)

(Lepidoptera: Noctuidae) (Packiam *et al.*, 2015), demostrando en todos los casos daño a nivel de ADN inducido por estos agroquímicos.

Las principales limitaciones del ensayo cometa se debe a la imposibilidad en la mayoría de los casos de realizar comparaciones entre ensayos con otros laboratorios o individuos por la escasez de estandarización en el protocolo, y por las diferentes formas de medir la migración de ADN (Collins *et al.*, 2023).

1.5 Bibliografía

- Abdel-Halim, K. Y., & Osman, S. R. (2020). Cytotoxicity and Oxidative Stress Responses of Imidacloprid and Glyphosate in Human Prostate Epithelial WPM-Y.1 Cell Line. *Journal of Toxicology*, 2020, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2020/4364650>
- Andrada, A. R., Lozzia, M. E., González-Olazo, E., & Heredia, F. (2012). Estudios meióticos en dos especies de crisópidos (Chrysopidae: Neuroptera). *Acta zoológica lilloana*, 38-43
- Andorro, A., & Fernández, B. (2020). Control biológico por conservación. En L. A. Polack, R. E. Lecuona, & S. N. López (Comps.), *Control biológico de plagas en horticultura: Experiencias argentinas de las últimas tres décadas* (Cap. 5). Ediciones INTA.
- Araújo, M. F., Castanheira, E. M. S., & Sousa, S. F. (2023). The Buzz on Insecticides: A Review of Uses, Molecular Structures, Targets, Adverse Effects, and Alternatives. *Molecules*, 28(8), 3641. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28083641>
- Augustyniak, M., Nocoń, Ł., Kędzierski, A., Łaszczyca, P., Sawczyn, T., Tarnawska, M., & Zawisza-Raszka, A. (2015). DNA damage in grasshopper *Chorthippus brunneus* (Orthoptera) hatchlings following paraquat exposure. *Chemosphere*, 125, 212-219. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.069>
- Azod, F., Shahidi-Noghabi, S., Mahdian, K., & Smagghe, G. (2020). Lethal and sublethal effects of spirotetramat and abamectin on predatory beetles (*Menochilus sexmaculatus*) via prey (*Agonoscyta pistaciae*) exposure, important for integrated pest management in pistachio orchards. *Belgian Journal of Zoology*. <https://doi.org/10.26496/bjz.2016.46>
- Bayr, Hülya MDI. Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine* 33(12):p S498-S501, December 2005. | DOI: 10.1097/01.CCM.0000186787.64500.12
- Boardman Leigh, Terblanche John S., Hetz Stefan K., Marais Elrike and Chown Steven L. (2012). Reactive oxygen species production and discontinuous gas exchange in insects. *Proc. R. Soc. B*. 279893–901
- Buckingham, S. D., Lapied, B., Corrone, H. L., Grolleau, F., & Sattelle, D. B. (1997). Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *The Journal of Experimental Biology*, 200(21), 2685-2692. <https://doi.org/10.1242/jeb.200.21.2685>
- Canard M, Volkovich TA. (2001) Outlines Of Lacewing Development. In: McEwen P, New T, Whittington A, Edits. *Lacewings In The Crop Environment*. Cambridge: Cambridge University Press.p.130-154.
- Carriquiriborde, P. (2021). *Introducción a la Ecotoxicología*. En *Principios De Ecotoxicología* (1.a ed., pp. 10-25). P. Carriquiriborde. <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/download/1663/1642/5353-1>
- Carriquiriborde, P. (2021a). Biodisponibilidad, bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación de los contaminantes. En *Ecotoxicología* (1.a ed., pp. 62-95). P. Carriquiriborde. <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/download/1663/1642/5353-1>
- Carriquiriborde, P. (2021b). Bases sobre los efectos tóxicos inducidos por los contaminantes. En *Ecotoxicología* (1.a ed., pp. 94-115). P. Carriquiriborde. <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/download/1663/1642/5353-1>
- Chandran, N. N., Fojtová, D., Blahová, L., Rozmánek, E., & Bláha, L. (2018). Acute and (sub) chronic toxicity of the neonicotinoid imidacloprid on *Chironomus riparius*. *Chemosphere*, 209, 568-577. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.102>
- Chen, Z., Huang, S., Chang, Y., Wang, Y., Shih, C., & Ren, D. (2019). Neuroptera – Lacewings. In *Rhythms of Insect Evolution: Evidence from the Jurassic and Cretaceous in Northern China* (p. 285). Dong Ren (Editor), Chungkun Shih (Editor), Taiping Gao (Editor), Yongjie Wang (Editor), Yunzhi Yao (Editor).
- Collins, A. R. (2004). The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261. <https://doi.org/10.1385/mb:26:3:249>
- Collins, A., Möller, P., Gajski, G., Vodenková, S., Abdulwahed, A., Anderson, D., Bankoglu, E. E., Bonassi, S., Boutet-Robinet, É., Brunborg, G., Chao, C., Cooke, M.

- S., Costa, C., Costa, S., Dhawan, A., De Lapuente, J., Del Bò, C., Dubus, J., Dušinská, M., . . . Azqueta, A. (2023). Measuring DNA modifications with the comet assay: A compendium of protocols. *Nature Protocols*, 18(3), 929-989. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00754-y>
- Cucchi, N. (Ed.). (2020). *Agricultura sin plaguicidas sintéticos: manejo agroecológico de plagas en cultivos argentinos* (1.a ed.): INTA Ediciones, Estación Experimental Agropecuaria Mendoza.
- Da Costa, C. A., Guiné, R., Costa, D., Correia, H. E., & Nave, A. (2019). *Pest control in organic farming*. En Elsevier eBooks (pp. 41-90). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813272-2.00003-3>
- Dantas, P. C., Serrão, J. E., Santos, H. C. P., & Carvalho, G. A. (2021). Anatomy and histology of the alimentary canal of larvae and adults of *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). *Arthropod Structure & Development*, 60, 101000. doi:10.1016/j.asd.2020.101000
- Dantas, PC, Santos, HCP, Bozdoğan, H, Serrão, JE, Carvalho, GA. (2021b) Morphology of the male and female reproductive tracts of virgin and mated *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). *Microsc Res Tech*. 84: 860–868. <https://doi.org/10.1002/jemt.23645>
- Di Marzio, W., & Sáenz, M. (2013). *Ecotoxicología* (1.a ed.). Eudeba.
- Duzguner, V., & Erdogan, S. (2012). Chronic exposure to imidacloprid induces inflammation and oxidative stress in the liver & central nervous system of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(1), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.06.011>
- EL-Gendy, K. S., Aly, N. M., Mahmoud, F. H., Kenawy, A., & El-Sebae, A. K. H. (2010). The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.10.003>
- Elizondo Silva, Ana Ibis, & Murguido Morales, Carlos A. (2010). Spirotetramat, nuevo insecticida para el control de insectos chupadores en el cultivo de la papa. *Fitosanidad*, 14(4), 229-234. Recuperado en 23 de agosto de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-30092010000400005&lng=es&tlng=es.
- FAO. (1996). *Eliminación de grandes cantidades de plaguicidas en desuso en los países en desarrollo - Colección FAO: Eliminación de plaguicidas*. Roma: FAO
- Flores, G. C., Reguilón, C., Alderete, G. L., & Kirschbaum, D. S. (2015). Liberación de *Chrysoperla argentina* (Neuroptera: Chrysopidae) para el control de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera, Aleyrodidae) en invernáculo de pimiento en Tucumán, Argentina. *Intropica*, 10(1), 28–36. Recuperado a partir de <https://revistas.unimagdalena.edu.co/index.php/intropica/article/view/1645>
- Fridovich, I. (1999), Fundamental Aspects of Reactive Oxygen Species, or What's the Matter with Oxygen?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893: 13-18. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07814.x>
- Gajski, G., Žegura, B., Ladeira, C., Novak, M., Šrámková, M., Pourrut, B., Del Bò, C., Milić, M., Gützkow, K. B., Costa, S., Dušinská, M., Brunborg, G., & Collins, A. (2019). The comet assay in animal models: From Bugs to whales – (Part 1 Invertebrates). *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 779, 82-113. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.02.003>
- Garzón-Orduña, I., Winterton, S., Jiang, Y., Breitzkreuz, L., Duelli, P., Engel, M., Penny, N., Tauber, C., Mochizuki, A. & Liu, X. (2019), Evolution of green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae): a molecular supermatrix approach. *Syst Entomol*, 44, 499-513. <https://doi.org/10.1111/syen.12339>
- Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., & Wang, J. (2015). Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Imidacloprid in Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(6), 1856–1862. <https://doi.org/10.1021/jf504895h>
- Gerth, M., Wolf, R., Bleidorn, C., Richter, J., Sontowski, R., Unrein, J., Schlegel, M., & Gruppe, A. (2017). Green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) are commonly associated with a diversity of rickettsial endosymbionts. *Zoological Letters*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/s40851-017-0072-9>
- Giffoni, Jennifer, Valera, Neicy, Díaz, Francisco, & Vásquez, Carlos. (2007). Nota técnica. Ciclo biológico de *Chrysoperla externa* (hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada con diferentes presas. *Bioagro*, 19(2), 109-113. Recuperado en 10 de agosto de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612007000200007&lng=es&tlng=es
- Godoy, M. S., Carvalho, C. F., & Carvalho, G. A. (2008). Selectivity of phytosanitary products used on citrus orchards to *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). In *7th IOBC conference on Integrated Fruit Production at Avignon in 2008*. (p. 233).
- González-Marín, B., Calderón-Segura, M. E., Karen González Pérez, A., & Gerardo Moreno Ciénega, L. (2021). Movento® 240SC (Spirotetramat) and Envidor® 240SC (Spirodiclofen) keto-enol insecticides induce DNA damage in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Fundamental Toxicological Sciences*, 8(3), 81–88. <https://doi.org/10.2131/fts.8.81>
- González Olazo, E., & Reguilón, C. (2002). Una nueva especie de *Chrysoperla* (Neuroptera: Chrysopidae) para la Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Arg.*, 61, 47-50.
- Haramboure, M. (2016). Evaluación de la tolerancia y susceptibilidad de insecticidas convencionales y bioirracionales en *Chrysoperla externa* y *C. asoralis* (Neuroptera: Chrysopidae) [Tesis doctoral]. Universidad Nacional de La Plata.
- Haramboure, M., Reguilón, C., Alzogaray, R., & Schneider, M. I. (2014). First Record of *Chrysoperla asoralis* And C.

- argentina* (Neuroptera: Chrysopidae) In Horticultural Fields Of La Plata Associated With The Sweet Pepper (*Capsicum Annum* L.). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 73 (3-4), 187-190. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0373-56802014000200013&lng=es&tlng=en.
- Honda, H., Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2006). Neonicotinoid metabolic activation and inactivation established with coupled nicotinic receptor-CYP3A4 and -aldehyde oxidase systems. *Toxicology Letters*, 161(2), 108-114. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.08.004>
- Hussain, S., & Gau, M. (2023). Tetrionic Acid and Tetramic Acid derived pesticides and their toxicity: A Review. Pesticidas derivados del ácido tetrónico y ácido tetrámico y su toxicidad: una revisión. *Sustainability, Agri, Food and Environmental Research*, 13. <https://10.770/safer-V13N1-art654>
- Ibis, E. S. A. (2010). Spirotetramat, nuevo insecticida para el control de insectos chupadores en el cultivo de la papa. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-30092010000400005
- Karpeta-Kaczmarek, J., Kubok, M., Dziewięcka, M., Sawczyn, T., & Augustyniak, M. (2016). The level of DNA damage in adult grasshoppers *Chorthippus biguttulus* (Orthoptera, acrididae) following dimethoate exposure is dependent on the insects' habitat. *Environmental Pollution*, 215, 266-272. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.032>
- Katić, A., Kašuba, V., Kopjar, N., Lovaković, B. T., Čermak, A. M. M., Mendaš, G., Micek, V., Milić, M., Pavičić, I., Pizent, A., Žunec, S., & Želježić, D. (2021). Effects of low-level imidacloprid oral exposure on cholinesterase activity, oxidative stress responses, and primary DNA damage in the blood and brain of male Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions*, 338, 109287. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109287>
- Lira, R., & Batista, J. (2006). Aspectos biológicos de *Chrysoperla externa* alimentados com pulgões da erva-doce. *Revista de biologia e ciências da terra*, 6(2).
- Liu, T., Wang, Y., Zhang, L., Xu, Y., Zhang, Z., & Mu, W. (2019). Sublethal effects of four insecticides on the Seven-Spotted lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Economic Entomology*, 112(5), 2177-2185. <https://doi.org/10.1093/jee/toz146>
- Lopes, Amália Torrezan. (2012). Caracterização citogenética de populações de crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae) de ocorrência em Jaboticabal, SP. *Dissertação (mestrado)* - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012. Disponible en: <<http://hdl.handle.net/11449/91335>>.
- Maksymiv, I. (2015). Pesticides: Benefits and Hazards. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University*, 2(1), 70-76. <https://doi.org/10.15330/jpnu.2.1.70-76>
- Martelli, F., Zhongyuan, Z., Wang, J., Wong, C. O., Karagas, N. E., Roessner, U., & Batterham, P. (2020). Low doses of the neonicotinoid insecticide imidacloprid induce ROS triggering neurological and metabolic impairments in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(41), 25840-25850.
- Martelli, F., Zhongyuan, Z., Wang, J., Wong, C. O., Karagas, N. E., Roessner, U., Rupasinghe, T., Venkatachalam, K., Perry, T., Bellen, H. J., & Batterham, P. (2020). Low doses of the neonicotinoid insecticide imidacloprid induce ROS triggering neurological and metabolic impairments in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(41), 25840-25850. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011828117>
- Miglioranza, K. (2021). Principales familias de contaminantes, distribución y destino ambiental. En *Ecotoxicología* (1.a ed.). P. Carriquiriborde. <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/download/1663/1642/5353-1>
- Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J. H., Sánchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C., & Liber, K. (2015). Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environment International*, 74, 291-303. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.024>
- Møller, P., Azqueta, A., Boutet-Robinet, É., Koppen, G., Bonassi, S., Milić, M., Gajski, G., Costa, S., Teixeira, J. P., Pereira, C., Dušinská, M., Godschalk, R., Brunborg, G., Gützkow, K. B., Giovannelli, L., Cooke, M. S., Richling, E., Laffon, B., Valdíglesias, V., . . . Langie, S. A. S. (2020). Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): Recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nature Protocols*, 15(12), 3817-3826. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0398-1>
- Mudry, M.D. y Carballo, M.A. (2006) Genética toxicológica. De los Cuatro Vientos Editorial, Buenos Aires. 672 pp.
- Mullins, J. (1993). Imidacloprid. En *Acs Symposium Series* (pp. 183-198). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-1993-0524.ch013>
- Núñez Z., E. (1989). Ciclo biológico y crianza de *Chrysoperla externa* y *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera, Chrysopidae). *Revista Peruana De Entomología*, 31(1), 76-82. Recuperado a partir de <https://www.revperuentomol.com.pe/index.php/rev-peru-entomol/article/view/904>
- Olazo, E. V. G., Lanati, S. J., & Heredia, J. F. (2009). Morfología y datos biológicos de los estados preimaginales de *Chrysoperla asoralis* (Neuroptera: Chrysopidae). *Acta Zool. Lilloana*, 53, 21-28.
- Packiam, S. M., Cosson, E., Baskar, K., & Ignacimuthu, S. (2015). Feeding Deterrent and genotoxicity analysis of a novel phytopesticide by using comet assay against *helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(4), 487-493. <https://doi.org/10.1590/s1516-8913201500141>

- Pantaleoni, R. A., & Sechi, P. (2014). ¿Existe realmente *Chrysoperla carnea*? Historia de la investigación sobre el complejo carnea. *Memorias XXV Curso Nacional de Control Biológico*, Mérida. Colegio de Postgraduados. Montecillo, 223-236.
- Pasini, R. A., Rakes, M., Castilhos, R. V., De Armas, F. S., De Bastos Pazini, J., Zantedeschi, R., & Grützmacher, A. D. (2020). Residual action of five insecticides on larvae and adults of the neotropical predators *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) and *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ecotoxicology*, 30(1), 44-56. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02314-0>
- Planes, Estela I.; Fuchs, Julio Silvio. (2015) Cuales son los aportes de la ecotoxicología a las regulaciones ambientales; *Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias; Ciencia e Investigación*; 65; 2; 45-62
- Planes, L., Catalán, J., Tena, A., Porcuna, J. L., Jacas, J. A., Izquierdo, J., & Urbaneja, A. (2012). Lethal and sublethal effects of spirotetramat on the Mealybug destroyer, cryptolaemus Montrouzieri. *Journal of Pest Science*, 86(2), 321-327. <https://doi.org/10.1007/s10340-012-0440-3>
- Poliserpi, M. (2021). Impacto para las aves granívoras del uso del insecticida imidacloprid como curasemillas: el tordo músico (*Agelaioides badius*) como modelo experimental. [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional de Buenos Aires.
- Puricelli, E. C., & Arregui, M. C. (2008). *Mecanismos de acción de plaguicidas* (1st ed.).
- Ramírez, J. A., & Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, 4(2), 67-75.
- Redolfi, I. (2014). Producción y liberación de huevos de crisopa en cultivo ecológico de olivo en la Rioja, Argentina. *Agroecología*, 9, 17-21.
- Reguilón, C., González Olazo, E., & Núñez Campero, S. (2006). Morfología de los estados inmaduros de *Chrysoperla argentina* (Neuroptera: Chrysopidae). *Acta zoológica lilloana*, 50(1-2).
- Ribeiro, A., Castellani, M., Moreira, A., Perez-Maluf, R., Silva, C. & Santos, A. (2013). Diversidade e sazonalidade de crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae) em plantas de urucum. *Horticultura Brasileira*, 31(4), 636-641. <https://doi.org/10.1590/s0102-05362013000400021>
- Ribera, I. and Melic, A., 2015. Orden Neuroptera. *Revista IDE@ - SEA*, Issue 58, pp. 1-12
- Rimoldi, F., Fogel, M. N., Ronco, A. E., & Schneider, M. I. (2017). Comparative susceptibility of two neotropical predators, *Eriopis connexa* and *Chrysoperla externa*, to acetamiprid and pyriproxyfen: short and long-term effects after egg exposure. *Environmental Pollution*, 231, 1042-1050. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.097>
- Royles, B. J. L. (1995). Naturally occurring tetramic acids: structure, isolation, and synthesis. *Chemical Reviews*, 95(6), 1981-2001. <https://doi.org/10.1021/cr00038a009>
- Ruiz de Arcaute, C. (2018). Evaluación genotóxica y del daño oxidativo inducido en *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae) por herbicidas [Tesis de doctorado no publicada]. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo
- Sanz, A. (2016). Mitochondrial reactive oxygen species: do they extend or shorten animal lifespan?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1857(8), 1116-1126.
- Salazar-López, N. J., Aldana-Madrid, M. L., Silveira-Gramont, M. I., & Aguiar, J. (2016). Spirotetramat — an alternative for the control of parasitic sucking insects and its fate in the environment. En *InTech eBooks*. <https://doi.org/10.5772/61322>
- Sâmia, R.R., Gontijo, P.C., Oliveira, R.L. and Carvalho, G.A. (2019), Sublethal and transgenerational effects of thiamethoxam applied to cotton seed on *Chrysoperla externa* and *Harmonia axyridis*. *Pest. Manag. Sci.*, 75: 694-701. <https://doi.org/10.1002/ps.5166>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0
- Stark, J. D., Vargas, R., & Banks, J. E. (2007). Incorporating Ecologically Relevant Measures of Pesticide Effect for Estimating the Compatibility of Pesticides and Biocontrol Agents. *Journal of Economic Entomology*, 100(4), 1027–1032. doi:10.1093/jee/100.4.1027
- Suchail, S., Debrauwer, L., & Belzunces, L. (2004). Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Management Science*, 60(3), 291-296. <https://doi.org/10.1002/ps.772>
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206–221.
- Tisler T, Jemec A, Mozetic B y Trebse P. 2009. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere*, 76, 907-914.
- Valencia Luna, Luis Aurelio, Romero Nápoles, Jesús, Valdez Carrasco, Jorge, Carrillo Sánchez, José Luis, & López Martínez, Víctor. (2006). Taxonomía y registros de Chrysopidae (Insecta: Neuroptera) en el estado de Morelos, México. *Acta zoológica mexicana*, 22(1), 17-61.
- van Driesche, R. G., Hoddle, M. S., Center, T. D., Cancino, E. R., Blanca, J. C., & Alvarez, J. M. (2007). *Control de plagas y malezas por enemigos naturales*. Academic Service.
- Villa, M., Somavilla, I., Santos, S., López-Sáez, J., & Pereira, J. (2019). Pollen feeding habits of *Chrysoperla carnea* adults in the olive grove agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 283. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.106573>

- Wamhoff, H., & Schneider, V. S. (1999). Photodegradation of imidacloprid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1730-1734. <https://doi.org/10.1021/jf980820j>
- Wang, X., Anadón, A., Wu, Q., Qiao, F., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., Yuan, Z., & Martínez, M. J. (2018). Mechanism of Neonicotinoid Toxicity: Impact on Oxidative Stress and Metabolism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 58(1), 471-507. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052429>
- Whitehorn, P. R., O'Connor, S., Wäckers, F., & Goulson, D. (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336(6079), 351-352. <https://doi.org/10.1126/science.1215025>
- Winterton, S., and de Freitas, S. (2006). Molecular phylogeny of the green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae). *Australian Journal of Entomology*, 45(3), 235-243. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.2006.00537.x>
- Zunino, P. (2022). *Impacto del imidacloprid en la salud de las abejas melíferas*. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/34647>
- Wu, H., Rao, Q., Zheng, J., Mao, C., Sun, Y., Gu, D., Wang, M., & Liu, X. (2018). Biochemical and histological alterations in adult zebrafish (Danio rerio) ovary following exposure to the tetrone acid insecticide spirotetramat. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.020>
- Zhang, Q., Zhang, G., Yin, P., Lv, Y., Yuan, S., Chen, J., Wei, B., & Wang, C. (2015). Toxicological effects of soil contaminated with spirotetramat to the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 139, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.091>

1.6 Imágenes del capítulo

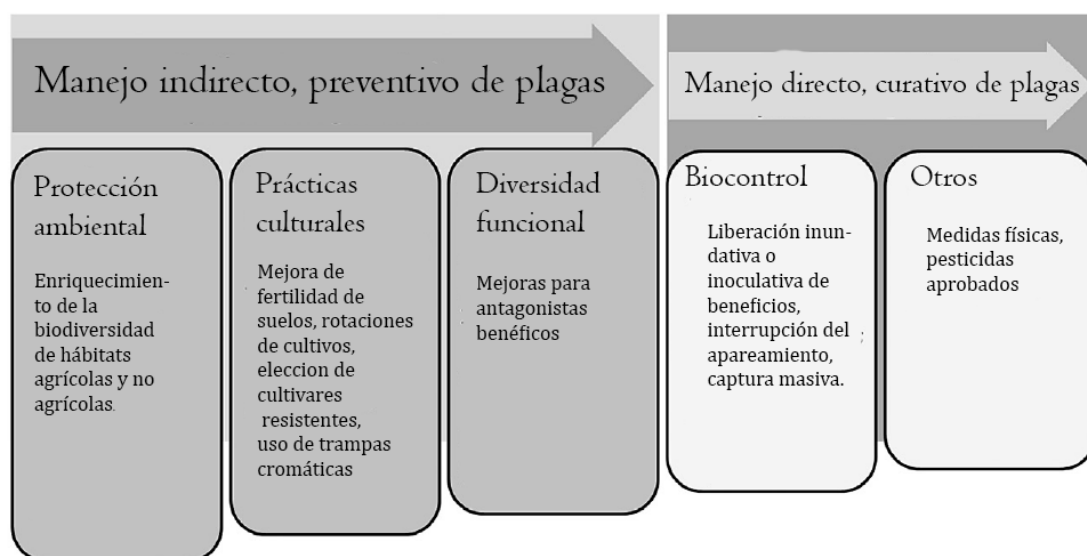


Ilustración 1: Resumen de técnicas de manejo integrado de plagas. Adaptado de Da Costa et al. (2019).

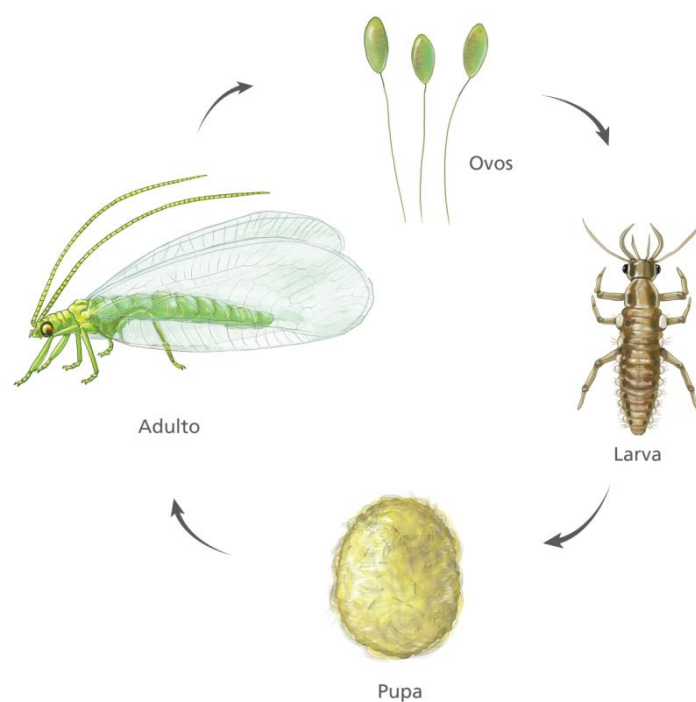
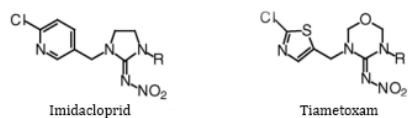
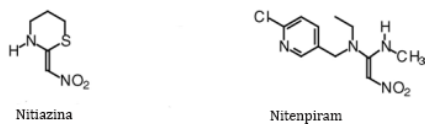


Ilustración 2: Ilustración del ciclo de vida de *Chrysoperla externa*. Extraído de Koopert Brasil.

Nitroguanidinas



Nitrometilenos



Cianoamidas



Figura 1: Estructura química de los principales neonicotinoides usados en la actualidad clasificados en tres grupos estructurales.

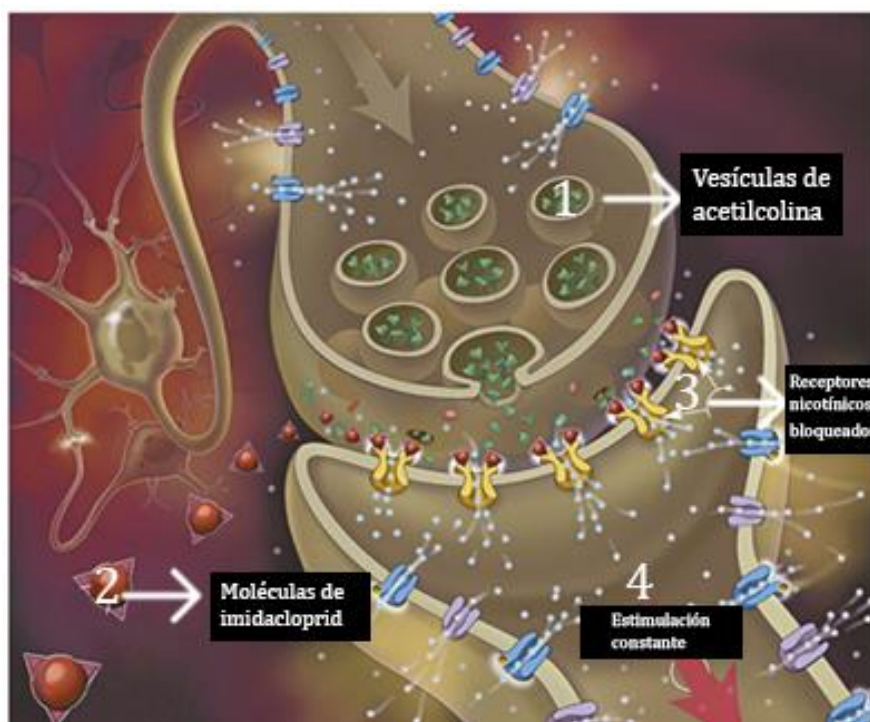


Figura 2: Representación de la forma de acción del imidacloprid. 1. Vesículas de acetilcolina. 2. Imidacloprid. 3. Receptores nicotínicos bloqueados permanentemente abiertos. 4 Estimulación constante de la neurona. (Adaptado de la lámina de obtenida en https://ferrebeekeeper.files.wordpress.com/2012/03/figure_02_site_of_action.jpg)

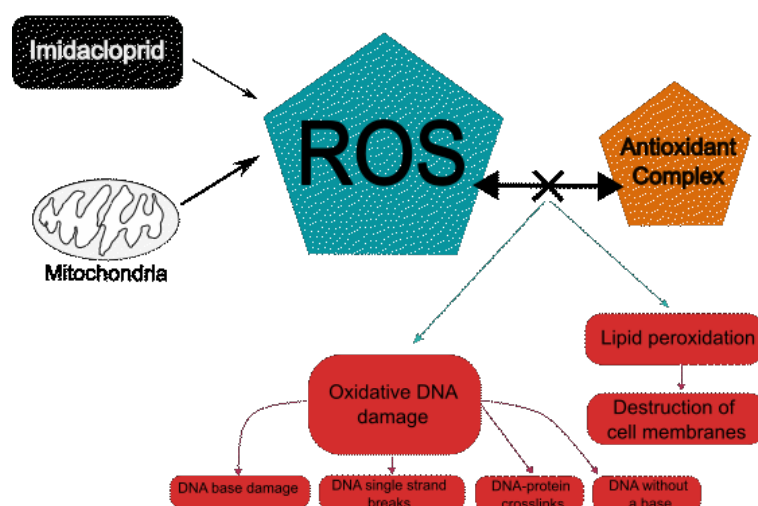
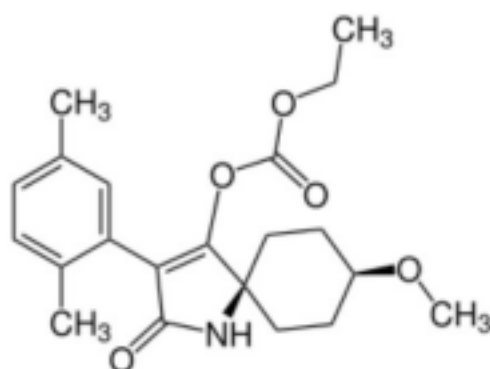


Figura 3: Diagrama resumen de los daños causados por las ROS a nivel celular inducidos por el imidacloprid.



Spirotetramat

Figura 4: Estructura química del spirotetramat.

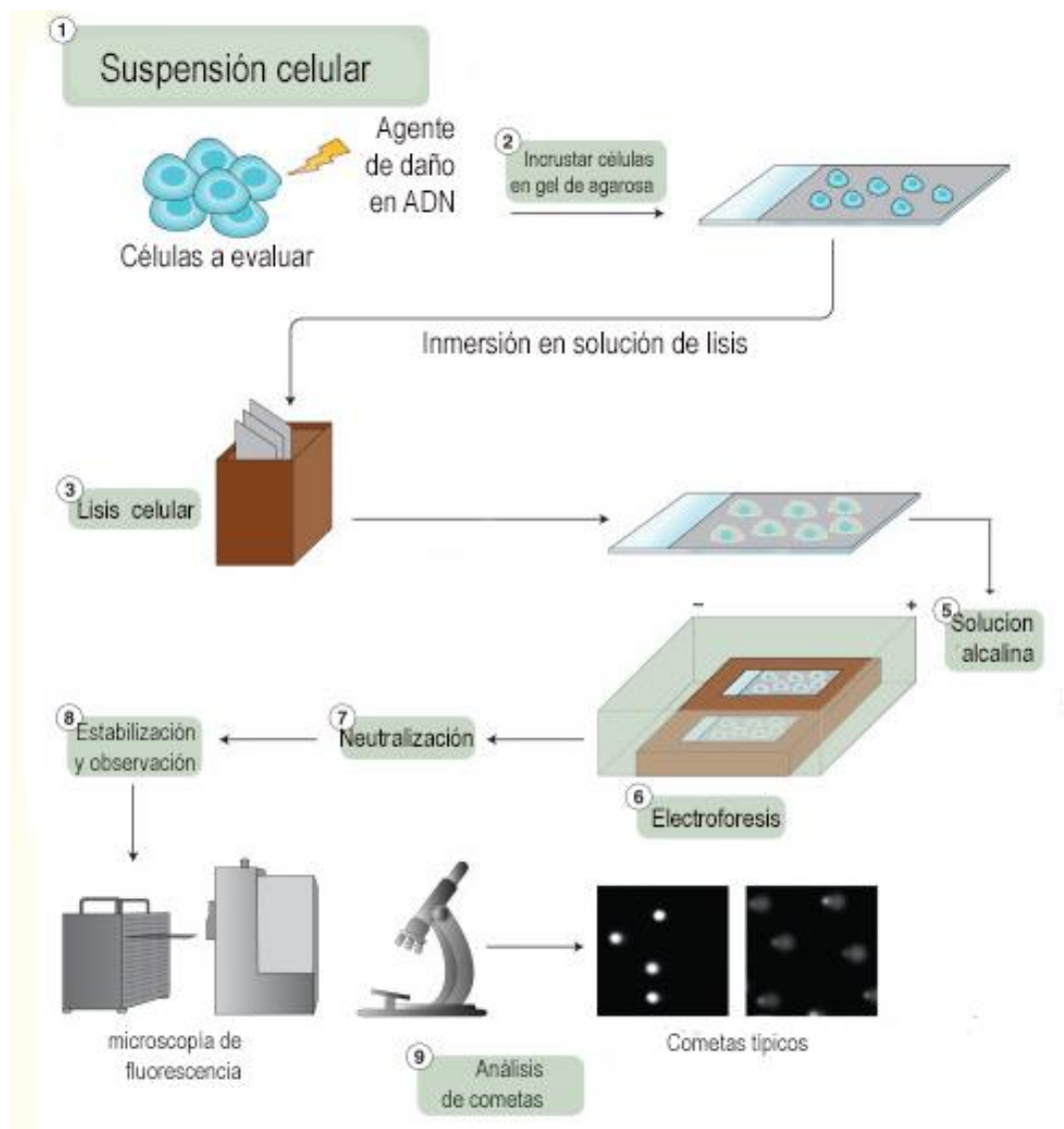


Figura 5: Esquema del procedimiento de ensayo cometa alcalino típico. Adaptado de Møller et al. (2020).

Capítulo 2: Objetivos e Hipótesis



2.1 Objetivos

Objetivo General:

Estudiar la toxicidad inducida por formulaciones comerciales de los insecticidas imidacloprid y spirotetramat sobre el depredador generalista *Chrysoperla externa* incorporando, además de las evaluaciones sobre los aspectos bioecológicos, la citogenética como nueva herramienta de diagnóstico ecotoxicológico.

Objetivos específicos:

- Estudiar la toxicidad de un insecticida comercial con imidacloprid en relación con la supervivencia, el desarrollo y la reproducción de *C. externa*.
- Estudiar la toxicidad de un insecticida comercial con spirotetramat evaluando la supervivencia, el desarrollo y la reproducción de *C. externa*.
- Estudiar la citotoxicidad y genotoxicidad de los insecticidas imidacloprid y spirotetramat sobre *C. externa*.

A partir de la búsqueda de los objetivos propuestos, surgieron nuevos interrogantes y por ello se han formulado nuevos objetivos que buscaron abordar de manera integral la investigación:

- Utilizar el ensayo cometa como herramienta de diagnóstico para evaluar la genotoxicidad de los insecticidas comerciales con imidacloprid y spirotetramat en células provenientes de huevos de la especie *C. externa*.
- Describir a nivel morfológico los estados de huevo y pupa de *C. externa*.
- Investigar la anatomía interna de *C. externa* a través de un análisis histológico exhaustivo.
- Analizar la toxicidad a nivel histológico de los insecticidas comerciales con imidacloprid y spirotetramat en *C. externa*.
- Describir y analizar el cariotipo de *C. externa* para comprender mejor su estructura genética.

2.2 Hipótesis

Hipótesis Generales:

- El spirotetramat presenta una toxicidad significativamente menor que el imidacloprid en *C. externa*.
- El insecticida spirotetramat no modifica la supervivencia, el desarrollo y la reproducción de *C. externa*.
- La citogenética es una herramienta de evaluación ecotoxicológica relevante para detectar efectos citotóxicos y genotóxicos de insecticidas en individuos de *C. externa*.

Producto de los nuevos objetivos específicos trazados, se plantearon además las siguientes hipótesis:

- El ensayo cometa en su variante alcalina como herramienta de evaluación ecotoxicológica, permite determinar en forma rápida y precisa efectos genotóxicos de plaguicidas en organismos de *C. externa*.
- La histología de insectos resulta de utilidad como herramienta complementaria para caracterizar a nivel cualitativo los efectos subletales de insecticidas.

Capítulo 3: Materiales y métodos generales



3.1 Mantenimiento del material vivo

Los especímenes de *C. externa* y *C. argentina* utilizados en este estudio fueron criados en el Laboratorio de Ecotoxicología, Plaguicidas y Control Biológico del Centro de Estudios de Parasitología y Vectores (CEPAVE), dependiente de Universidad Nacional de La Plata- CONICET - CICPBA, con sede en La Plata, Argentina.

Ambas colonias fueron mantenidas por separado y sin exposición a plaguicidas. Se las mantuvo en un bioterio con una temperatura de $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa del $70\% \pm 5\%$ y un fotoperiodo de L:O 16:8. Los adultos, emparejados y con un mínimo de 50 hembras, fueron alojados en recipientes de plástico transparente ventilados (5 litros de capacidad, con un diámetro de 21 cm y una altura de 25 cm) cubiertos con malla fina (tela voile).

Estos recipientes contenían en un bebedero, agua de red, así como polen, pasas de uva orgánicas y una dieta artificial compuesta por miel, germen de trigo y levadura de cerveza, esta última comúnmente empleada para la alimentación de los adultos de esta especie (Vogt *et al.*, 2000), todos proporcionados *ad libitum*. La limpieza y reposición de alimentos en los contenedores se realizaron cada 5 días.

Se disponían semanalmente cartulinas negras como sustrato de oviposición, las cuales, después de 24 h, se retiraban y trasladaban a un contenedor similar al mencionado anteriormente.

Los huevos obtenidos se colocaron en un contenedor junto con plántulas de trigo infestadas con áfidos, para el momento de la eclosión. También se agregó dieta artificial a base de hígado, para las larvas y papel para ofrecer refugio y evitar la depredación. La limpieza de estos contenedores se realizaba cada 5 días, mientras que la adición de alimento ocurría cada 2 días.

Una vez que los individuos alcanzaban el estado de pupa, eran trasladados a otro contenedor con agua en bebederos, a la espera de su emergencia para ser reintegrados a la colonia principal.

3.2 Citogenética Básica

3.2.1 Confección de preparados citogenético con orceína

Para llevar a cabo la técnica, se emplearon huevos enteros de *Chrysoperla externa* y *Chrysoperla argentina*. Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente:

1. Fue sumergido en solución hipotónica (1 parte de agua destilada con 1 parte de solución salina con una concentración isotónica de cloruro de sodio (NaCl) al 0,9%) durante 45 min.
2. Se trató con fijador Carnoy modificado (3 partes de ácido acético glacial con 1 parte de alcohol etílico puro) durante 1 h.
3. La muestra fue montada en un portaobjetos con ácido acético al 45%, seguido de la disección correspondiente del material.
4. Se aplicó una gota de colorante orceína acética al 1%.
5. Se cubrió con un cubreobjetos y se sometió a la técnica de squash sobre un plato caliente, por 1 h a 35 °C.
6. Se procedió a sellar el cubreobjetos utilizando barniz sintético para uñas.

3.2.2 Determinación del complemento cromosómico para *C. externa* y *C. argentina*

Para llevar a cabo la técnica, se emplearon huevos enteros de *Chrysoperla externa* y *Chrysoperla argentina*. Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente:

1. Los huevos fueron sumergidos en HCl 1N durante 3 min.
2. El material fue lavado dos veces con agua destilada para eliminar los residuos de HCl.
3. Se trató el material con 1 ml de colchicina al 0,02% durante 30 min.
4. Se añadió 1 ml de solución hipotónica (1 parte de agua destilada con 1 parte de solución salina con una concentración isotónica de cloruro de sodio (NaCl) al 0,9%) a la preparación anterior y se mantuvo durante 15 min.
5. La muestra fue colocada en fijador Carnoy modificado (3 partes de ácido acético glacial por 1 parte de alcohol etílico puro) durante 30 min.
6. Se llevó a cabo la tinción de orceína acética al 1% a partir del paso 3 previamente mencionado.

3.3 Técnica del ensayo cometa variante alcalina

Se describen los pasos de protocolo utilizado siguiendo lo propuesto por Møller *et al.* (2020):

PASO	PARÁMETRO DE ENSAYO DEL COMETA	PROCEDIMIENTO
1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS	Tipo de células	Se utilizaron las células intracoron de huevos de <i>C. externa</i> . Se utilizaron 5 huevos por preparado.
	Preparación de la suspensión	Se realizó un macerado de las células de los 5 huevos con 30 µL de agua destilada.
	Temperatura y tiempo del procesamiento	Este proceso se efectuó a temperatura ambiente y se completó al alcanzar la hora de evaluación.
	Controles del ensayo	Los preparados de control se llevaron a cabo de manera idéntica a los individuos tratados.
2. SEMBRADO LAS CÉLULAS EN LA AGAROSA	Concentración final de células que contienen agarosa de bajo punto de fusión	La solución celular (30 µl) fue suspendida en 170 µl de agarosa de bajo punto de fusión (0,5%).
	Sembrado	Se sembró en dos portaobjetos, cada uno cubierto con 100 µl de agarosa de punto de fusión normal (0,5%).
	Tiempo y temperatura	Se cubrió cada muestra con un cubreobjetos y se refrigeró a 4°C durante 10 min.
3. LISIS	Composición del buffer	2,50M NaCl, Na2EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton X-100 al 0,5%, pH 10
	Duración	1 h
	Temperatura	4 °C
4. TRATAMIENTO ALCALINO	Composición	Solución tampón (pH > 13) compuesta por 65 ml agua destilada a 4°C, 30 ml NaOH 10 M y 5 ml EDTA.
	Duración	15 min

5. ELECTROFORESIS ALCALINA	Temperatura	4 °C
	Composición	Solución tampón (pH > 13) compuesta por 65 ml agua destilada a 4 °C, 30 ml NaOH 10M y 5ml EDTA.
	Voltaje	25 voltios y 250 mA
	Duración	15 min
6. NEUTRALIZACION	Temperatura	4 °C
	Composición	Los portaobjetos fueron lavados tres veces con solución tampón Tris-HCl (pH 7,5) durante un minuto cada vez. Posteriormente, se llevó a cabo un lavado con agua destilada.
	Deshidratación	Los portaobjetos fueron sumergidos en etanol al 96% durante 10 min.
	Temperatura	Temperatura ambiente.
7. TINCION OBSERVACION	Y Tinción	SYBR Green Molecular Probes®
	Observación	Microscopía de fluorescencia con un objetivo Olympus BX51 de 40x y una cámara Olympus DP71, y las imágenes se obtuvieron con el programa DP controller 3.3.1.292 y DP manager 3.3.1.222.
	Descriptor utilizado	Se contabilizaron 100 nucleoides por gel y se clasificaron en categorías de daño. Se midieron parámetros considerando largo de cola y momento cuando fue posible.

3.4 Cortes histológicos

Todos los cortes histológicos se realizaron en el laboratorio de histología del CEPAVE y fueron realizados por Emilio Topa y Silvina Vargas.

1. Se sumergió el material en una solución fijadora acuosa de Bouin (compuesta por una solución saturada de 75% de ácido pícrico, 15% de formalina pura y 20% de ácido acético glacial) durante 24 h.
2. El material se infiltró con parafina, se cortaron secciones histológicas longitudinales de 5 µm utilizando un microtomo Leica RM 2125RT.
3. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina (HE) a 0,5%.
4. El material se montó en portaobjetos como preparado permanente.

3.5 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos realizados fueron especificados en cada sección. Todos los modelos matemáticos y salidas del software estadístico R fueron realizados por la Lic. Graciela Minardi personal de apoyo del CEPAVE. Todos los gráficos y salidas del software R se mantuvieron en el idioma original (ingles) para no adulterar las imágenes.

3.6 Bibliografía

Møller, P., Azqueta, A., Boutet-Robinet, É., Koppen, G., Bonassi, S., Milić, M., Gajski, G., Costa, S., Teixeira, J. P., Pereira, C., Dušinská, M., Godschalk, R., Brunborg, G., Gützkow, K. B., Giovannelli, L., Cooke, M. S., Richling, E., Laffón, B., Valdiglesias, V., . . . Langie, S. A. S. (2020b). Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): Recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nature Protocols*, 15(12), 3817-3826. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0398-1>

Vogt, H., Ufer, A., Bigler, F., Brown, K., Candolfi, M., Kemmeter, F., Kühner, C., Moll, M., Travis, A., Viñuela, E., Waldburger, M., & Waltersdorfer, A. (2000) Laboratory method to test effects of plant protection products on larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). Guidelines to evaluate side-effects of plant protection products to non-target arthropods (ed. Candolfi, M., Blümel, S., & Forster, R.), pp. 27–44. IOBC

Capítulo 4: Resultados



4.1 Resultados de Estudios Morfológicos, Histológicos y Cariotipo.



En este capítulo se plantea la resolución de los siguientes objetivos.

- Describir a nivel morfológico los estados de huevo y pupa de *C. externa*.
- Investigar la anatomía interna de *C. externa* a través de un análisis histológico exhaustivo.
- Describir y analizar del cariotipo de *C. externa* para comprender mejor su estructura genética.

4.1.1 Caracterización morfo-colorimétrica del desarrollo embrionario de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Enfoque para su uso en control biológico

Introducción

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) es una estrategia agrícola en la que se enfoca el control de plagas mediante la integración de todas las prácticas disponibles y estrategias de control (FAO & OMS, 2015). Su propósito principal consiste en mantener los niveles de población de plagas por debajo del Nivel de Daño Económico (UDE, por sus siglas en inglés) y disminuir la utilización de plaguicidas y otras intervenciones que no tengan justificación económica, reduciendo al mismo tiempo los riesgos para la salud humana y el medio ambiente (FAO, 2019). Dentro de las estrategias para el control de plagas en el MIP, se encuentra el control biológico, el cual es llevado a cabo por enemigos naturales, tales como parasitoides, depredadores y entomopatógenos, que se alimentan o desarrollan en organismos fitófagos (Van Driesche *et al.*, 2007; Fischbein, 2012).

Dentro de los enemigos naturales se encuentran los depredadores, cuya alimentación se centra en organismos considerados plagas en entornos agrícolas (Helyer *et al.*, 2014). Para lograr una implementación exitosa en programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP), no solo resulta crucial conocer aspectos como su taxonomía, biología, especificidad y tasas de depredación (Van Driesche *et al.*, 2007), sino que también es fundamental comprender en detalle sus ciclos de vida. Esto implica aspectos como las diferentes etapas de desarrollo, el

tiempo necesario para completar dichas etapas, el proceso de muda, los patrones de reproducción y el comportamiento, entre otras características relevantes. Este conocimiento exhaustivo contribuye a una utilización más efectiva de estos depredadores en estrategias de control de plagas.

En la Región Neotropical, una de las especies depredadoras es el generalista *Chrysoperla externa*. En el Argentina, *C. externa* se asocia comúnmente con los árboles frutales de manzana en el alto valle de Río Negro (González *et al.*, 2011), cultivos de olivo en La Rioja (González Olazo *et al.*, 2012), y cultivos bajo invernadero de pimientos en La Plata, Buenos Aires (Haramboure *et al.*, 2014).

A pesar de que diversos autores han comunicado el ciclo de vida y los aspectos biológicos de este depredador (Albuquerque *et al.*, 1994; Almeida, 2020; Fonseca *et al.*, 2015; Palomares-Pérez *et al.*, 2020), la revisión bibliográfica ha revelado que los estudios publicados hasta el momento se centran principalmente en el color de los huevos en pocas especies, sin establecer relaciones causales entre el estado de desarrollo y las variaciones de color (González Olazo *et al.*, 2009; Reguilón & Campero, 2006). Algunos estudios también describen la morfología externa de los huevos y el tipo de puesta (Da Costa Lima, 1943; Monserrat *et al.*, 2001; Smith, 1921).

El objetivo principal de esta sección es describir el desarrollo intracorion de los embriones de *C. externa* y analizar tanto los cambios en el color como de forma de los huevos para caracterizarlos morfo-colorimétricamente. A partir de los datos obtenidos, se ha desarrollado una **clave** práctica como herramienta para los lectores en general interesados en el control biológico inoculativo mediante la utilización de huevos en liberaciones de campo en agroecosistemas vegetales.

Materiales y métodos

El material vivo fue mantenido tal como se detalló en la sección de Materiales y Métodos generales. Se obtuvieron 60 huevos (normalmente después de 4 h), todos los cartones fueron extraídos de los contenedores, y las secciones de estos cartones que contenían huevos fueron aisladas en caja de Petri ventiladas.

Las observaciones de los huevos se realizaron cada 24 h mediante el uso de un microscopio estereoscópico (Leica® M205a, Alemania) con el propósito de registrar los cambios en el color del huevo y el desarrollo embrionario.

La observación microscópica se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Mirande *et al.* (2010) y Fogel *et al.* (2016). En resumen, se seleccionaron seis huevos de los 60 aislados en cajas Petri en diferentes momentos del estudio (24 h, 48 h, 72 h y 96 h después de la puesta). Estos huevos fueron retirados del cartón con una pinza blanda y depositados en un **microtubos Eppendorf de 1,5 ml con fijador de Bouin**. Posteriormente, se procedió a deshidratarlos gradualmente mediante diluciones de alcohol de grado analítico (desde 20 a 80% en tampón de fosfato pH 7) hasta alcanzar el 100 % de alcohol de grado analítico. El material deshidratado se dispuso en portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos de vidrio, utilizando el **medio de Hoyer** como soporte de montaje. Finalmente, las preparaciones se secaron en una estufa de cultivo (Faeta S. A., Argentina) a 50 °C, durante 48 h.

Resultados

Descripción de las etapas de desarrollo intra-corion del embrión de *C. externa*

Los huevos se caracterizaron por su forma elipsoide, con dimensiones promedio de 0,908 mm de altura y 0,47 mm de ancho. Las hembras depositaron los huevos de manera individual, presentando un pedicelo largo con una apariencia hialina. Las oviposiciones se localizaron tanto en los cartones dispuestos para este propósito como en los bordes plásticos del recipiente contenedor y sobre el bebedero.

A medida que transcurrieron los días, la coloración externa de los huevos presentó cambios diferenciables que permitieron establecer categorías según el desarrollo interno. Estas se detallan a continuación:

Huevos de puesta reciente; colocados en las primeras 24 h. Se presentaban externamente lisos y con un color verde fluorescente brillante. Se identificó la micrópila en el extremo apical. No se pudo distinguir internamente el embrión (Figura 6: a-b-c). En las preparaciones microscópicas, se evidenció una micrópila bien definida con bordes estriados. En este estadio, se logró distinguir claramente el corion, la membrana vitelina y el material citoplasmático del embrión, manifestado como una masa de células homogénea (Figura 7: a-b-c).

Huevos de desarrollo inicial; con 48 h de desarrollo, el verde fluorescente cambió a un tono verde claro. Se observó una intensa coloración verde en el extremo donde se encuentra la micrópila, mientras que en las partes cercanas al pedicelo la coloración se tornó más clara, alcanzando un tono amarillo-anaranjado en el extremo inferior, donde se identificó el embrión (Figura 6: d-e-f). En los preparados microscópicos, se identificó con claridad al embrión posicionado sobre uno de los lados del huevo y se reconocieron los segmentos, siendo la coloración del embrión más oscura que el resto del saco (Figura 7: d-e-f).

Huevos de desarrollo medio; con 72 h de desarrollo, la coloración verde claro se mantuvo solo en el extremo de la micrópila, mientras que el resto del huevo adquirió una tonalidad blanquecina. Internamente, se observó un embrión que ocupaba toda la superficie en forma de letra “C”, con una coloración rojo-anaranjada. Los segmentos del cuerpo del embrión se mostraron como anillos (Figura 6: g-h-i). En las preparaciones microscópicas, se constató el desarrollo de los ocelos y las protopatas en el embrión (Figura 7: g-h-i).

Huevos de desarrollo avanzado; con 96 h de desarrollo, presentaron una coloración blanca, lo que permitió una visión completa del embrión. Se pudieron diferenciar los ocelos, de coloración rojiza en el extremo cercano a la micrópila. A lo largo del huevo se distinguieron los segmentos anillados, también de coloración rojiza. Este estadio precedió a la emergencia del insecto (Figura 6: j-k-l). En las preparaciones microscópicas, se observó la ocupación total del huevo por el embrión, con sus ocelos y segmentos claramente diferenciados (Figura 7: j-k-l).

Huevos eclosionados; aquellos en los que la larva emergió, mostraron una coloración blanca y una apariencia aplanada. En el extremo se identificó la abertura de la eclosión (Figura 8: a-b).

Huevos inviables; correspondieron a huevos recientemente depositados pero no fértiles, donde no se desarrolló el embrión. Exhibieron una apariencia similar a los huevos eclosionados, pero con un tono verde brillante (Figura 8: c).

Clave práctica

Se elaboró una clave práctica utilizando los datos recopilados para facilitar la diferenciación en campo de las distintas categorías, considerando las características de coloración y observaciones del desarrollo embrionario dentro del huevo.

1. Huevos de aspecto aplanados _____ 4
- 1'. Huevos ovalados de aspecto turgente _____ 2
2. Huevos de coloración verde fluorescente..... **Huevo de puesta reciente**
- 2'. Huevos de otro tipo de coloración _____ 3
3. Se observa manchas redondas de coloración rojiza (ocelos).....**Huevo de desarrollo avanzado**
- 3'. No se observan manchas redondas de coloración rojiza (ocelos) _____ 6
4. Huevos de coloración verde fluorescente**Huevos inviábiles**
- 4'. Huevos de coloración de otra coloración _____ 5
5. Huevos de coloración blanca con apertura en el extremo distal del pedicelo
...**Huevos eclosionados**
6. El embrión solo ocupa la parte basal**Huevo de desarrollo inicial**
- 6'. El embrión ocupa todo el huevo en forma de "C"**Huevo de desarrollo medio**

Discusión

Las descripciones de los huevos de *C. externa* habían sido realizadas por Da Costa Lima (1943), Monserrat *et al.* (2001), Smith (1921), entre otros. Estos trabajos se enfocaban únicamente en la morfología externa y el tipo de puesta (ya sea solitaria o en grupo), sin hacer referencia a la relación entre la coloración del huevo, el tiempo de oviposición y el desarrollo embrionario. En el presente trabajo **se revelaron** cambios en la coloración de los huevos desde el momento de la oviposición hasta la eclosión, los cuales son perceptibles a simple vista. Las cuatro etapas propuestas en este trabajo (etapas relacionadas con el desarrollo embrionario intra-corion) son cómodamente identificables, y con la ayuda de la clave práctica, pueden ser reconocidas con facilidad. Los cambios en la coloración externa del corion están vinculados al desarrollo embrionario (Amaral *et al.*, 2013; Boregas *et al.*, 2003; Canard & Volkovich, 2001), y este a su

vez está directamente relacionado con la temperatura, completando su desarrollo en 96 h a 25°C o incluso más rápidamente (72 h) a 27°C (Griffoni *et al.*, 2007).

Mediante los preparados de microscopía, se identificó que a las 72 h posteriores a la oviposición (a 25°C), el embrión ya muestra la presencia de patas, aparato bucal y ocelos, evidenciando una diferenciación significativa en comparación con las etapas anteriores. Además, se identificó la micrópila estriada, junto con la apertura longitudinal del corion, características compartidas por otras especies de la familia, según lo descrito por Withycombe (1924).

Las tres especies citadas para Argentina, *C. externa*, *C. argentina* y *C. asoralis*, presentan una morfología externa del huevo similar. En todas ellas, las puestas son solitarias, los huevos poseen pedicelos largos de aspecto hialino y una coloración verde brillante que se torna parda al acercarse el momento de la eclosión (González Olazo *et al.*, 2009; Reguilón & Campero, 2006). En este contexto, la clave propuesta permitirá una identificación rápida del desarrollo embrionario intra-corion durante los monitoreos de campo, para cualquiera de las tres especies mencionadas, bajo la suposición de que el desarrollo es similar. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis, será necesario realizar una descripción detallada de las otras dos especies.

La clave propuesta en este estudio y la importancia de monitorear el estado de los huevos en Chrysopidae representan una novedad dentro de los protocolos existentes para el seguimiento de especies. En los protocolos utilizados en Argentina, se evalúa principalmente la presencia directa de estos enemigos naturales, haciendo especial hincapié en los estados larvarios y adultos, que son difíciles de observar en el campo. Con esta nueva información, se podría enfatizar en el monitoreo de los huevos para facilitar el trabajo de campo y proporcionar nuevas herramientas para mejorar los programas de MIP.

Bibliografía

Albuquerque, G. S., Tauber, C. A., & Tauber, M. J. (1994). *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Life history and potential for biological control in Central and South America. *Biological Control*, 4(1), 8-13. <https://doi.org/10.1006/bcon.1994.1002>

Almeida, R. P. (2020). Aspectos biológicos e etológicos de *Chrysoperla externa* Hagen, 1861 (Neuroptera: Chrysopidae) (1.a ed.). *Embrapa Algodão*.

Amaral, B., Souza, B., Souza Bezerra, C., Viana De Sousa, A., & Carvalho, C. (2013). Storing eggs of *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) for management of large-scale rearing. *Açoreana*, 9, 103-109.

Boregas, K. G. B., Carvalho, C. F., & Souza, B. (2003). Aspectos biológicos de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) em casa-de-vegetação. *Ciência e Agrotecnologia*, 27(1), 07-16. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542003000100001>

- Canard, M., & Volkovich, T. (2001). Outlines of lacewing development. In: P. McEwen, T. New, & A. Whittington (Eds.), *Lacewings in the Crop Environment* (pp. 130-154). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511666117.008
- Da Costa Lima, A. (1943). *Insetos Do Brasil* (1.ed.). Rio De Janeiro: Imprensa Nacional.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2019). *Plant Production and Protection Division: Integrated Pest Management*. <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/spi/scpi-home/managing-ecosystems/integrated-pest-management/en/>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO] & World Health Organization [OMS]. (2015). *Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas* (1. ed.) [Libro electrónico].
- FAO OMS. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/document/s/Pests_Pesticides/Code/Code_Spanish_2015_Final.pdf
- Fischbein, D. (2012). Introducción a la teoría del control biológico de plagas. In J. M. Villacide & J. C. Corley (Eds.), *Serie técnica: Manejo Integrado de Plagas Forestales* (1. ed., Vol. 15, pp. 4-21). INTA EEA Bariloche: Ediciones INTA.
- Fogel, M. N., Schneider, M. I., Rimoldi, F., Ladux, L. S., Desneux, N., & Ronco, A. E. (2016). Toxicity assessment of four insecticides with different modes of action on pupae and adults of *Eriopsis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae), a relevant predator of the Neotropical Region. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), 14918-14926. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6654-9>
- Fonseca, A. R., Carvalho, C. F., Cruz, I., Souza, B., & Ecole, C. C. (2015). Desarrollo y capacidad depredadora de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) bajo diferentes temperaturas. *Revista Colombiana de Entomología*, 41(1), 5+. <https://link.gale.com/apps/doc/A445875333/AONE?u=anon~867c0524&sid=googleScholar&xid=ce4e628b>
- González, E., Heredia, J., Cichón, L., Fernández, D., & Garrido, S. (2011). Crisópidos (Insecta: Neuroptera) asociados a frutales de pepita en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén (región Patagonia Norte Argentina). *Horticultura Argentina*, 30(73), 5-8. <http://www.horticulturaar.com.ar/>
- González Olazo, E., Lanati, S., & Heredia, J. (2009). Morfología y datos biológicos de los estados preimaginales de *Chrysoperla asoralis* (Neuroptera: Chrysopidae). *Acta Zoológica Lilloana*, 1-2(53), 21-28. <http://www.lillo.org.ar>
- González Olazo, E., Redolfi, I., Patt, G., & Campos, M. (2012). Diversidad específica de controladores biológicos crisópidos (Neuroptera: Chrysopidae) en el germoplasma olivícola en La Plaza Solar, La Rioja, Argentina. *Unlar Ciencia*, 1(2), 31-35. <https://revistaelectronica.unlar.edu.ar/>
- Griffoni, J., Valera, N., & Díaz, F. (2007). Ciclo biológico de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada con diferentes presas. *Bioagro*, 19(2), 109-113. <https://www.redalyc.org/pdf/857/85719207.pdf>
- Haramboure, M., Reguilón, C., Alzogaray, R., & Schneider, M. I. (2014). First record of *Chrysoperla asoralis* and *C. argentina* (Neuroptera: Chrysopidae) in horticultural fields of La Plata associated with the sweet pepper (*Capsicum Annuum* L.). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 73(3-4), 187-190. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0373-56802014000200013&lng=es&tlng=en
- Helyer, N., Cattlin, N. D., & Brown, K. C. (2014). *Biological Control in Plant Protection*. New York, NY: Amsterdam University Press.
- Mirande, L., Haramboure, M., Smagghe, G., Piñeda, S., & Schneider, M. I. (2010). Side-effects of glyphosate on the life parameters of *Eriopsis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) in Argentina. *Communications in agricultural and applied biological science*, 75(3), 367-372. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21539255/>
- Monserat, V., Oswald, J., Tauber, C., Diaz-Aranda, L., & Monserat, V. (2001). Recognition of larval Neuroptera. In P. McEwen, T. New, & A. Whittington (Eds.), *Lacewings in the Crop Environment* (pp. 43-81). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511666117.005
- Palomares-Pérez, M., Molina-Ruelas, T., Bravo-Núñez, M., & Arredondo-Bernal, H. (2020). Life table of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) reared on *Melanaphis sacchari* (hemiptera: Aphididae). *Revista Colombiana de Entomología*, 46, 1-5. <https://doi.org/10.25100/SOCOLEN.V46I1.6831>
- Reguilón, C., & Campero, E. (2006). Morfología de los estados inmaduros de *Chrysoperla argentina* (Neuroptera: Chrysopidae). *Acta Zoológica Lilloana*, 1-2(50), 31-39. <http://www.lillo.org.ar/>
- Smith, R. C. (1921). A study of the biology of the Chrysopidae. *Annals of the Entomological Society of America*, 14(1), 27-35. <https://doi.org/10.1093/aesa/14.1.27>
- Van Driesche, R. G., Hoddle, M. S., Center, T. D., Cancino, E. R., Blanca, J. C., & Alvarez, J. M. (2007). *Control de plagas y malezas por enemigos naturales*. Washington, DC: Academic Service.
- Withycombe, C. L. (1924). XV. Some aspects of the biology and morphology of the Neuroptera. With special reference to the immature stages and their possible phylogenetic significance. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 72(3-4), 303-411. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1925.tb03362.x>

Imágenes de la sección

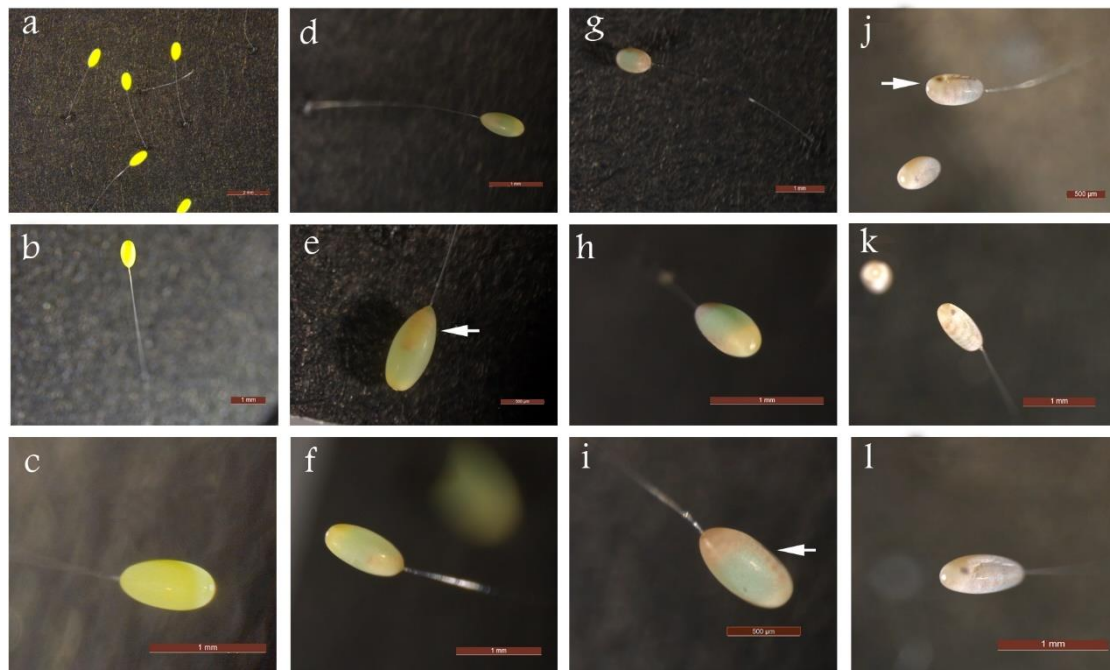


Figura 6: Huevos de *Chrysoperla externa*, observaciones bajo lupa binocular. a-b-c: huevos de 24 h de desarrollo a 25 °C. d-e-f: huevos de 48 h de desarrollo a 25 °C. g-h-i: huevos de 72 h de desarrollo a 25 °C. j-k-l: huevos de 96 h de desarrollo a 25 °C. Señalización en imagen (flechas) e: embrión en la parte basal. f: embrión en forma de c ocupando todo el espacio. j: ocelos bien desarrollados. Ubicación: Resultados de estudios morfológicos e histológicos.

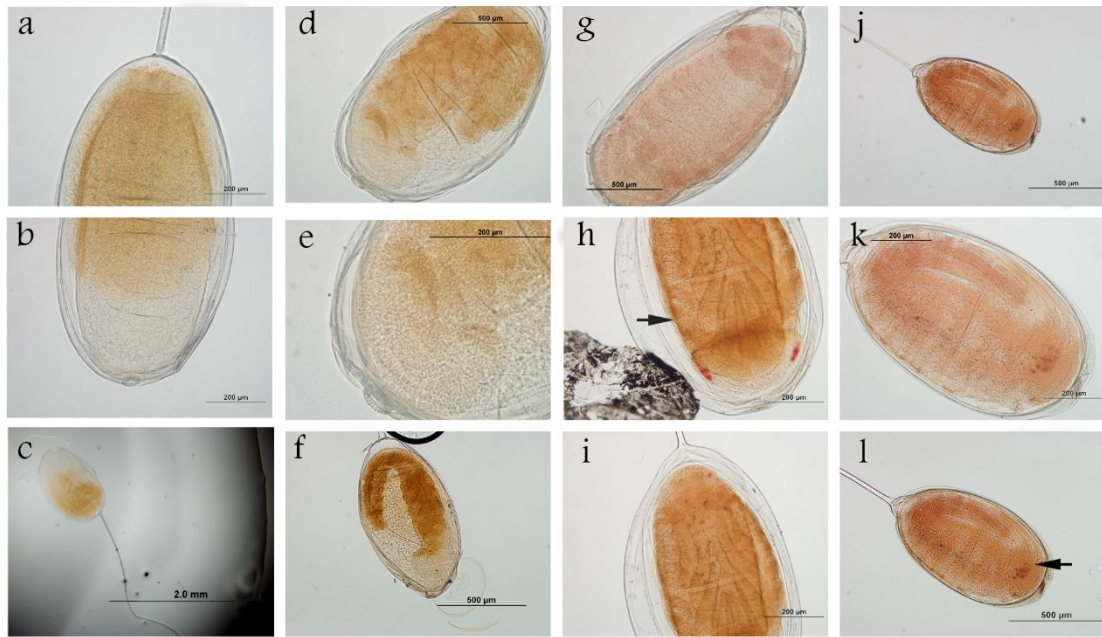


Figura 7: Desarrollo embrionario de *Chrysoperla externa*. Observación de preparados en microscopio. a-b-c: embriones de 24 h de desarrollo a 25 °C. d-e-f: huevos de 48 h de desarrollo a 25 °C. g-h-i: huevos de 72 h de desarrollo a 25 °C. j-k-l: huevos de 96 h de desarrollo a 25 °C. Señalización h: diferenciación de patas, mandíbulas y ocelos. l: ocelos.



Figura 8: Huevos de *Chrysoperla externa* a-b: huevos eclosionados. c: huevo inviable.

4.1.2 Descripción morfológica de machos de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae)

Introducción

El orden Neuroptera abarca insectos holometábolos con tres estadios larvarios y comprende 17 familias y más de 6.000 especies distribuidas por todo el mundo, excepto en la Antártida (Gerth *et al.*, 2017; Ribera y Melic, 2015; Chen *et al.*, 2019). Dentro de este orden, los Chrysopidae, conocidos como "crisopas", constituyen la segunda familia más numerosa y diversa, con 1.416 especies agrupadas en 82 géneros a nivel global (Winterton y Freitas, 2006; Garzón-Orduña *et al.*, 2018). Esta familia posee gran relevancia en la agricultura debido a que varias de sus especies son agentes de control biológico de plagas tanto en sus etapas larvarias como adultas (Ribeiro *et al.*, 2013; Villa *et al.*, 2019).

Chrysopidae se divide en tres subfamilias, de las cuales solo Nothochrysinæ está claramente identificada, mientras que Apochrysinæ y Chrysopinæ presentan problemas de clasificación constantes debido a la falta de información completa sobre las especies (Tauber *et al.*, 2009). La mayoría de las especies relevantes en el control biológico pertenecen a la familia Chrysopinæ, tribu Chrysopini, la cual es la más extensa en número de especies y, a su vez, la menos conocida (Tauber *et al.*, 2009). La taxonomía de estas especies es inestable, con descripciones y reevaluaciones continuas de especies previamente clasificadas (Cadena *et al.*, 2007).

En Argentina se han citado tres especies de *Chrysoperla* comúnmente encontradas en agroecosistemas: *C. externa*, *C. asoralis* y *C. argentina* (Reguilón *et al.*, 2006).

Algunas investigaciones se han centrado en el estudio del canal alimentario y el tracto reproductivo de las crisopas adultas, destacando la presencia de un divertículo en ciertas especies (Woolfolk & Douglas Inglis, 2004; Vacacela *et al.*, 2017; Costa Dantas *et al.*, 2021). Además, se ha observado que algunas especies de Chrysopidae presentan testículos largos y retorcidos revestidos por una vaina peritoneal, asociados con glándulas accesorias y vesículas seminales en el conducto eyaculador (Withycombe, 1922; Principi, 1949; Costa Dantas *et al.*, 2020).

Dado que las especies pueden mostrar similitudes o variaciones en sus características morfológicas externas, algunos autores han propuesto métodos adicionales de diferenciación,

como marcadores moleculares y morfológicos, como la genitalia interna, a fin de lograr una clasificación taxonómica precisa y contribuir al éxito de los programas de control de plagas (Cadena *et al.*, 2007; Tauber *et al.*, 2009). La introducción o el uso de especies mal identificadas pueden provocar fallos en los programas de control biológico (Cadena *et al.*, 2007).

En esta sección, se describe la anatomía interna general de los machos de *C. externa* con especial énfasis en el sistema reproductivo. Este enfoque busca complementar la información existente y proporcionar una base para futuros estudios. También se realizaron estudios en machos de *C. argentina* con el fin de comparar y aportar información nueva, los cuales se detallan en el anexo.

Materiales y métodos

El material vivo fue mantenido tal como se detalló en la sección de Materiales y Métodos generales.

Bioensayos

Los machos fueron seleccionados aleatoriamente de la colonia y, previo a los estudios histológicos, se procedió a anestésarlos en frío durante 15 min a 4 °C en un refrigerador White-Westinghouse W3100®.

Se llevó a cabo la evaluación de la anatomía de dieciocho abdómenes de ejemplares masculinos de *C. externa*. Estos especímenes fueron disectados en una solución fisiológica comercial (0,9% p/v de **CINa** en agua destilada), posteriormente observados y fotografiados utilizando un estereomicroscopio Leica® M205a. Las imágenes fueron capturadas utilizando los programas DP Controller 3.3.1.292 y DP Manager 3.3.1.222.

Se procedió al análisis de la morfología testicular, evaluando aspectos como el largo, ancho, ubicación, número de vueltas y altura de cada vuelta del testículo. Todas las mediciones se realizaron utilizando el programa Image J, extrayendo doce imágenes para cada parámetro, en las que se llevaron a cabo cinco mediciones para minimizar el margen de error.

Dado que tanto el tamaño como la estructura de los individuos se mantuvieron estables, se seleccionaron cinco abdómenes y cinco cabezas de *C. externa* para las secciones histológicas.

El material se preparó siguiendo las descripciones detalladas en la sección de Materiales y Métodos generales bajo el apartado de "Cortes histológicos".

Todas las secciones fueron observadas utilizando un microscopio Olympus BX51® equipado con una cámara Olympus DP71®. Las imágenes fueron capturadas utilizando los programas DP Controller 3.3.1.292 y DP Manager 3.3.1.222.

Resultados

Cabeza

La cabeza de *C. externa* presentó el ganglio cerebral definido, donde se distinguieron zonas de neuropilo de forma compacta y homogénea, así como la zona de pericaria, que albergó los cuerpos neuronales (Figura 9: A). Las medidas registradas fueron un largo de 0,74 mm (de= 0,02, Min= 0,68, Máx= 0,76) y un ancho de 0,20 mm (de= 0,03, Min= 0,13, Máx= 0,24).

En el protocerebro, se identificaron los lóbulos ópticos, que incluyeron la lámina más cercana al ojo compuesto, la médula y la lóbula más interna al ganglio (Figura 9: B). Asimismo, se observó el complejo central en la parte central del protocerebro (Figura 9: C). En cuanto al deutocerebro, se diferenciaron los glomérulos ubicados en los lóbulos antenales, los cuales mostraron una forma y tamaño similares (Figura 9: D).

Sistema digestivo

Durante la disección ventral del abdomen se observó el sistema digestivo, situado en el centro y con aspecto tubular de coloración transparente con áreas de tonalidades ocre pálido. En los cortes histológicos, se constató que este sistema ocupaba prácticamente la totalidad del abdomen.

En *C. externa*, se identificó una considerable cantidad de adipocitos entre los órganos del sistema digestivo (Figura 10). Se observó que el divertículo estaba asociado al buche y en la región del intestino anterior se localizó un proventrículo con forma de copa y aspecto firme (Figura 11: A). A continuación, hacia la parte posterior, se evidenció el intestino medio, que se extendía a lo largo de tres segmentos con un notable desarrollo y rodeado por fibras

musculares (Figura 11: B). En el intestino posterior se localizó el íleon, el recto y el ano. Los tubos de Malpighi se situaron lateralmente al íleon. En la región final del recto, se encontraron cuatro almohadillas rectales, las cuales presentaron una longitud de 0,11 mm (de= 0,02, Min= 0,08, Máx= 0,15) y un ancho de 0,06 mm (de= 0,01, Min= 0,04, Máx= 0,08) (Figura 11: C).

Testículos

Los testículos de *C. externa* se ubicaron a partir del segmento 6, en ambos laterales del sistema digestivo. Fueron dos estructuras semirígidas de color amarillo brillante en forma de espiral dextrógira (desde la vista antero posterior) con 4 vueltas siendo las vueltas de los extremos más angostas que las centrales (Figura 12: A). El ancho promedio de las vueltas fue de 0,19 mm (de= 0,04, Min= 0,12, Máx= 0,29).

La longitud promedio total del testículo fue 0,87mm (de= 0,12, Min= 0,72, Máx= 1,09). Respecto al ancho presentaron la región central más ensanchada respecto a las puntas. El ancho promedio fue de 0,33 mm (de= 0,07, Min= 0,22, Máx= 0,47). Al realizarse la extracción de los testículos del resto del abdomen, los mismos tendieron a despiralizarse, como un resorte que se encuentra bajo compresión y se libera. Los extremos de los testículos en solución fisiológica se rasgaron con el paso del tiempo (Figura 12: B).

Los espermatozoides se agruparon internamente en haces de más de 100 espermatozoides que acompañaron la curvatura del testículo. Cercanos a los testículos en el segmento 7 a 8 se encontraron las vesículas seminales y las glándulas accesorias. Estas últimas presentaron una estructura poco rígida de aspecto gelatinoso como gran parte de los órganos abdominales. Las dos vesículas seminales presentaron un color amarillo similar a los testículos y de aspecto circular.

En los cortes histológicos los testículos se encontraron rodeados por una capa uniforme de tejido conectivo (Figura 13: A). Los tubos seminíferos estuvieron formados por tejido conectivo y epitelial, donde se pudieron diferenciar células en interfase, células nutricias de gran tamaño y células en división meiótica (Figura 13: B). En la parte proximal se observaron células en primeros estadios de meiosis. En la parte media y distal del testículo se encontraron espermatozoides en estado de desarrollo avanzado. Su apariencia fue de estructuras filamentosas agrupadas en haces recubiertos con un promedio de 115 espermatozoides cada

uno (Figura 13: C).

Los espermatozoides presentaron aspecto filamentosos con una longitud media de 18,76 μm (de= 4,20, Mín= 14,79, Máx= 24,30), con una protuberancia de forma ovoide en uno de los extremos de un largo de 3.084 μm (de= 0,10, Min= 3,02, Máx= 3,20) por un ancho de 0, .89 μm (de= 0,05, Min=0,85, Máx= 0,95), correspondiente con la zona de la cabeza o cápsula acrosómica. Esta estructura en el microscopio óptico presentó una marcada refringencia.

Las vesículas seminales y sus glándulas anexas se observaron a partir del segmento 7 y en la parte ventral (Figura 13: D-E). Fueron estructuras de gran tamaño con células de aspecto poliédrico. Las vesículas seminales presentaron un tamaño en promedio de 0,17mm (de= 0,009, Min= 0,16, Máx= 0,18) por 0,15 mm (de= 0,009, Min= 0,14, Máx= 0,16) cada una (Figura 13: F). Internamente se observó una cavidad de gran tamaño, con numerosos espermatozoides en su interior que le dio el aspecto filamentosos con un lumen libre, rodeada externamente por una capa de epitelio con células grandes en estado de interfase. Las glándulas anexas, de diferentes formas geométricas, mostraron un epitelio diferenciado de capa simple.

Discusión

Para la discusión se eligió hacer una comparativa de especies de *C. externa*, junto con *C. argentina* y otras especies del género y de artrópodos. Ya que los resultados de *C. argentina* se presentaron en el anexo por ser ajenos al tema central de esta tesis, la discusión se encuentra en dicha sección.

Bibliografía

Cadena, P., Ángel, F., Gómez, L. A. & González, R., 2007. Diferenciación morfológica y molecular de especies de crisópidos (Neuroptera: Chrysopidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 2(33), pp. 171-177.

Chen, Z., Huang, S., Chang, Y., Wang, Y., Shih, C., & Ren, D. (2019). Neuroptera – Lacewings. In *Rhythms of Insect Evolution: Evidence from the Jurassic and Cretaceous in Northern China* (p. 285). Dong Ren (Editor), Chungkun Shih (Editor), Taiping Gao (Editor), Yongjie Wang (Editor), Yunzhi Yao (Editor).

Costa Dantas, P., Pinto Santos, H., Bozdogan, H., Serrao, J., & Carvalho, G. (2020). Morphology of the male and female reproductive tracts of virgin mated *Chrysoperla Externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). *Microsc Res Tech.*, 1–9. <https://doi.org/10.1002/jemt.23645>

Costa Dantas, P., Pinto Santos, H., Serrao, J., & Carvalho, G. (2021). Anatomy and histology of the alimentary canal of

larvae and adults of *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). *Arthropod Structure & Development*, 60, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2020.1010001467-8039>.

Garzón-Orduña, I., Winterton, S., Jiang, Y., Breitzkreuz, L., Duelli, P., Engel, M., Penny, N., Tauber, C., Mochizuki, A. & Liu, X. (2019), Evolution of green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae): a molecular supermatrix approach. *Syst Entomol*, 44. 499-513. <https://doi.org/10.1111/syen.12339>

Gerth, M., Wolf, R., Bleidorn, C., Richter, J., Sontowski, R., Unrein, J., Schlegel, M., & Gruppe, A. (2017). Green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) are commonly associated with a diversity of rickettsial endosymbionts. *Zoological Letters*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/s40851-017-0072-9>

Principi, M. (1948). Contributi allo studio dei Neurotterii

Italiani. VIII. Morfologia, anatomia e funzionamento degli apparati genitali nel gen. *Chrysopa* Leach (*Chrysopa septempunctata* Wesm. e *C. formosa* Brauer). *Bollettino dell'Istituto di Entomologia della Università degli Studi di Bologna* 17:316-362

Reguilón, C., González Olazo, E., & Núñez Campero, S. (2006). Morfología de los estados inmaduros de *Chrysoperla argentina* (Neuroptera: Chrysopidae). *Acta zoológica lilloana*, 50(1–2), 31–39.

Ribeiro, A., Castellani, M., Moreira, A., Perez-Maluf, R., Silva, C. & Santos, A. (2013). Diversidade e sazonalidade de crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae) em plantas de urucum. *Horticultura Brasileira*, 31(4), 636-641. <https://doi.org/10.1590/s0102-05362013000400021>

Ribera, I. and Melic, A., 2015. Orden Neuroptera. *Revista*

Tauber, C. A., Tauber, M. J., & Albuquerque, G. S. (2009). Neuroptera. En *Elsevier eBooks* (pp. 695-707).

Vacacela, H., Alvarez- Zapata, A., Gonzales, A., Martins, E.,

Martinez, L., & Serrao, J. (2017). Anatomy and histology of the alimentary canal and ovarioles of *Ceraeochrysa cubana* adult. *Bulletin of Insectology*, 70(2).

Villa, M., Somavilla, I., Santos, S., López-Sáez, J., & Pereira, J. (2019). Pollen feeding habits of *Chrysoperla carnea* adults in the olive grove agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 283. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.106573>

Winterton, S., and de Freitas, S. (2006). Molecular phylogeny of the green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae). *Australian Journal of Entomology*, 45(3), 235-243. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.2006.00537.x>

Withycombe, C. (1922). Notes on the biology of some British Neuroptera (Planipennia). *Transactions of the Entomological Society of London* 1922:501-594.

Woolfolk, S., Cohen, A. & Inglis, G. (2004). Morphology of the Alimentary Canal of *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae) Adults in Relation to Microbial Symbionts. *Annals of the entomological society of america*, 97(4), pp. 769-808.

Imágenes de la sección

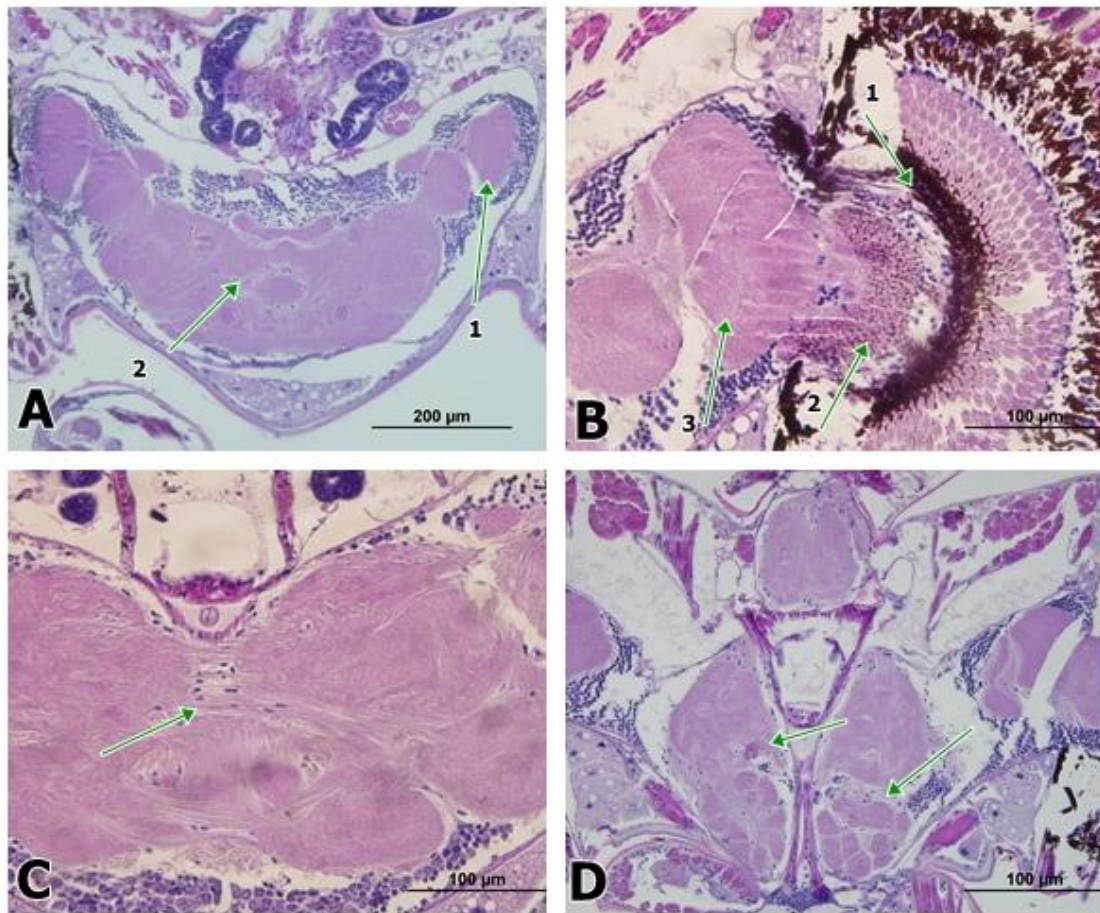


Figura 9: Sección anatómica de la cabeza de macho of *Chrysoperla externa*. A: Diferentes áreas del protocerebro. 1: lóbulos ópticos. 2 complejo central. B: detalle del lóbulo óptico. 1: Lámina. 2: Medula. 3: Lóbula. C: Detalle del complejo central señalado con flecha. D: detalle del lóbulo antenal con glomérulos señalado con flecha. Técnica de coloración HE.



Figura 10: Corte longitudinal de abdomen de *Chrysoperla externa*. Divertículo (dv); proventrículo (pv), intestino medio (mg), tubos de Malpighi (mt), íleon (il), recto (r), almohadillas rectal (rp), ano (a), ganglios neurales (g), testículos (t), vesículas seminales (vs), glándulas accesorias (ag). Técnica de coloración HE.

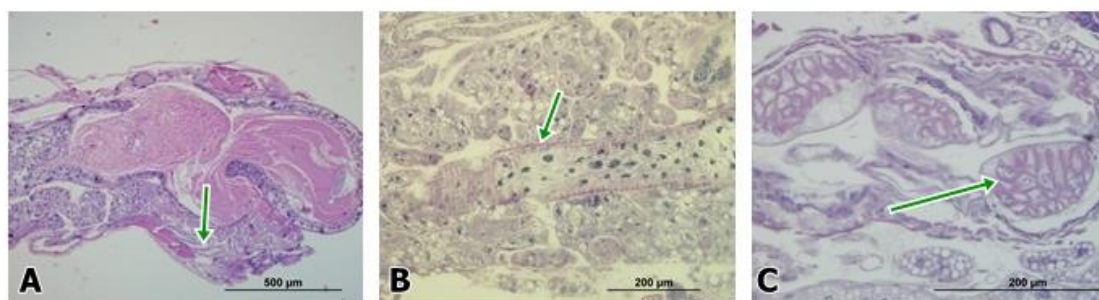


Figura 101: Detalle de partes del sistema digestivo de *Chrysoperla externa*. Las flechas indican: A: Divertículo. B: Músculos. C: Ampollas rectales. Técnica de coloración HE.

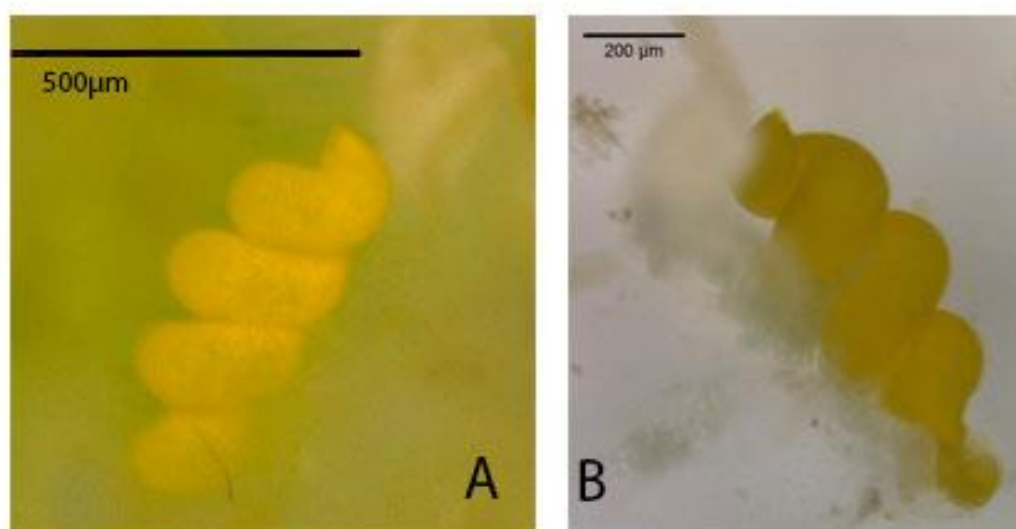


Figura 112: Testículos de *Chrysoperla externa*. A: Testículo con coloración natural dentro del abdomen al momento de realizar la disección. B: Porción terminal del testículo rasgada.

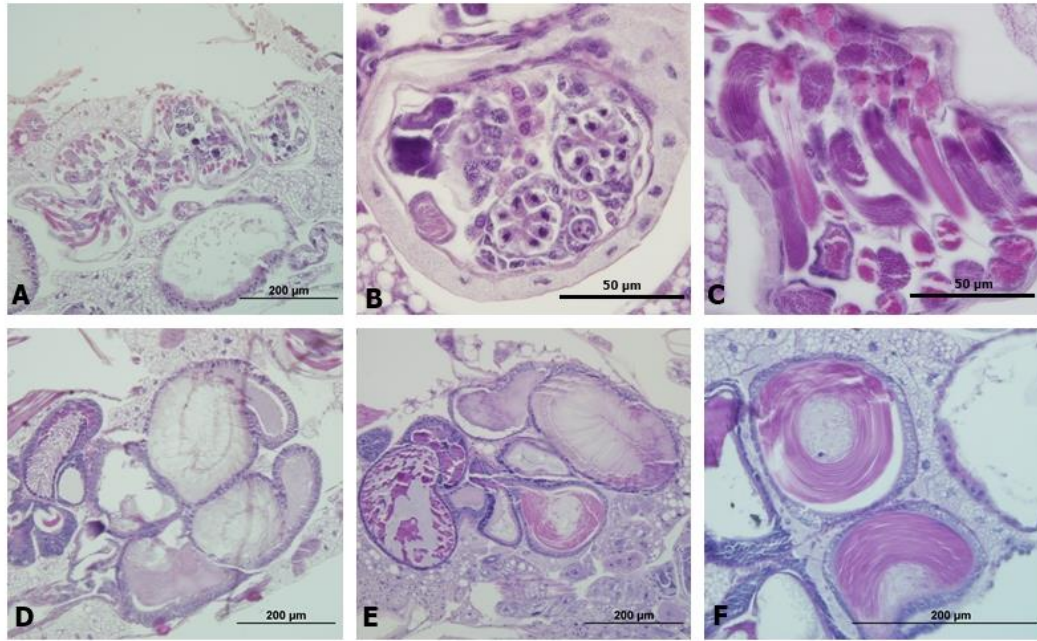


Figura 123: Corte longitudinal de abdomen de *Chrysoperla externa* realizado con tinción HE. A: Testículo, donde se observan las 4 vueltas espiraladas y las regiones de espermatogénesis. B: túbulos seminíferos con células en división meiótica temprana. C: detalle del testículo con espermatogénesis avanzada. D y E: glándulas anexas y vesículas seminales. F: Detalle de vesículas seminales. Técnica de coloración HE.

4.1.3 Ontogenia pupal de *Chysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae)

Introducción

Chysoperla externa es un insecto depredador que ataca las principales plagas agrícolas y muestra una notable adaptabilidad a distintos climas. Se encuentra mencionada en Argentina, junto con *C. argentina* y *C. asoralis*, y las tres especies se encuentran de manera espontánea en campos agrícolas. Entre sus presas más destacadas se incluyen insectos de cuerpo blando como pulgones, moscas blancas y trips, lo que la convierte en un agente valioso en diversos programas de control biológico (Haramboure *et al.*, 2014; Palomares-Pérez *et al.*, 2020).

El ciclo biológico de esta especie consta de estadios que van desde el huevo, tres etapas larvales, prepupa, pupa y adulto (Nuñez, 1989). Solo los estadios larvales tienen un comportamiento depredador, mientras que los adultos se nutren de polen, néctar y la melaza azucarada secretada por insectos (Nuñez, 1989; Valencia Luna *et al.*, 2006; Lira & Batista, 2006; Canard & Volkovich, 2007). El periodo de desarrollo desde el huevo hasta la emergencia del adulto se extiende aproximadamente durante 30 días y puede variar en función del tipo de alimento y la temperatura (Canard & Volkovich, 2007; Palomares-Pérez *et al.*, 2020). Cuando la tercer etapa larval ha alcanzado su peso máximo, comienza a secretar hilos proteicos por la abertura anal para formar el capullo. Una vez conformado, el tercer estadio larval permanece inmóvil en su interior, ingresando al estado de prepupa. Después de tres días, tiene lugar la muda pupal dentro del capullo, dando lugar a una pupa exarata. Siete días más tarde, el adulto emerge del capullo a través de una pequeña abertura redondeada que crea con sus mandíbulas (Nuñez, 1989; Canard & Volkovich, 2007).

La descripción de los cambios pupales de *C. externa* solo se basan en la diferenciación del estado de prepupa y pupa, por ello el objetivo de este capítulo fue evaluar los cambios morfológicos internos y externos de las prepupas y pupas de *C. externa* con el fin de identificar las diferentes estructuras para análisis posteriores de toxicidad.

Materiales y métodos

Todo el material vivo fue mantenido en el bioterio conforme se detalló en la sección de materiales y métodos generales.

Se extrajeron 45 huevos de la colonia y se colocaron individualmente en cajas de Petri. Las larvas que emergieron fueron alimentadas con áfidos y una dieta artificial. Se llevó a cabo un seguimiento hasta que empezaron a formar el capullo. Se realizaron observaciones del capullo exterior y se abrieron dos capullos diariamente desde el momento de su formación hasta la emergencia del adulto, con el propósito de examinar directamente la pupa interna y determinar los cambios morfológicos en el insecto. Los cocones completos fueron pesados y medidos.

Se empleó una lupa binocular Leica Mc120HD con cámara integrada para la observación y captura de imágenes. Estas imágenes fueron capturadas utilizando el programa Leica Applied Suite. Los pesajes se llevaron a cabo con una balanza de precisión. Todas las mediciones se realizaron utilizando el software ImageJ.

Para identificar los cambios morfológicos de las pupas, se consideraron tres parámetros: tagmatización, desarrollo de apéndices torácicos (patas y alas) y desarrollo de estructuras cefálicas (ojos, antenas y aparato bucal). Los cambios fueron evaluados cualitativamente, considerando el inicio como la fecha en que se reconocieron estas estructuras y la finalización al compararlas su similitud con las presentes en los adultos.

En los días 5 y 7 del seguimiento, respectivamente, se abrieron 5 pupas cada día y se procesaron siguiendo el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos generales sobre "cortes histológicos".

Resultados

Los cocones presentaron cambios de coloración a lo largo de su desarrollo. El tamaño medio de los cocones fue de 2.97 mm (± 0.52 mm). El peso medio fue de 8.1 mg (± 0.11 mg).

- Día 1: Se encontró que el capullo había sido recientemente formado y los hilos se hallaban sujetos al sustrato, otorgando estabilidad al cocón en proceso de formación. Tras finalizar la estructuración interna del tejido, la larva permaneció inmóvil. (Figura 14: A y Figura 16: B).
- Día 2: El capullo estaba completamente formado y de color blanco esférico. Dentro del capullo, la larva mantenía su forma de "C" y presentaba un marcado ensanchamiento abdominal que se tornó amarillento. La sección cefálica del exoesqueleto larval comenzó a

desprenderse, adoptando la cabeza una tonalidad blanca a transparente. Las patas larvales se desprendieron del abdomen. (Figura 14: B – Figura 15: A).

- Día 3: No se observaron cambios con respecto al día anterior.
- Día 4: Exteriormente, el capullo se mantuvo similar al día previo. Internamente, la larva dejó de mantener su aspecto larval para convertirse en una masa de tejido, con diferenciación del tagma torácico y abdominal. La parte inferior del abdomen se estrechó. La cabeza se mantuvo como una masa transparente con vestigios del exoesqueleto larval. Las patas larvales estaban desintegradas. (Figura 15: B).
- Día 5: En la parte apical del capullo se comenzó a observar una exuvia negra, producto de la muda larval. Lateralmente, en el extremo opuesto, se detectaron dos manchas oscuras correspondientes a los ojos compuestos (Figura 14: C). En el interior del capullo, la pupa cambió su morfología de prepupa a pupa verdadera, la cual presentó una forma similar al adulto. En el tagma cefálico se comenzaron a formar los ojos compuestos y se presentaron como una gran mancha oscura con puntos negros que correspondieron a los omatidios (Figura 16: A). Se observaron los rudimentos antenales y mandibulares. El abdomen se encontró totalmente formado y se diferenciaron los diferentes tagmas. Se observaron pequeñas estructuras blancas laterales al tagma torácico que darán origen a los rudimentos alares (Figura 15: C). En los cortes histológicos, se apreciaron el ganglio cefálico en formación y los ojos, destacándose las fibras musculares y el resto del tejido en desarrollo. El sistema digestivo aún no mostraba conexión al exterior (Figura 17).
- Día 6: Exteriormente las manchas laterales de los ojos comenzaron a oscurecerse (Figura 14: D). Internamente en el tagma cefálico los ojos compuestos se encontraron totalmente formados, y tomaron un color negro metalizado (Figura 15: D). Las antenas se alargaron y el aparato bucal continuó su formación. Las patas rudimentarias aparecieron en el tagma torácico.
- Día 7: No se observaron diferencias exteriores. En el interior, las patas se hicieron más notorias. Histológicamente, la cabeza se presentó completamente formada. El sistema digestivo no mostró conexión anal con el exterior, pero se notó un desarrollo de las fibras musculares torácicas (Figura 18).
- Día 8: El tagma cefálico estuvo totalmente formado. Las antenas y el aparato bucal se encontraron totalmente formados. En el tagma torácico las alas comenzaron a crecer en tamaño y mantuvieron el color blanquecino.
- Día 9: Externamente no se produjeron diferencias. Internamente las alas libres comenzaron a tener una coloración oscura y se comenzaron a diferenciar filamentos negros (Figura 16: C).

- Día 10: Exteriormente, las manchas de los ojos se tornaron de un color oscuro metalizado y en la zona media se observaron manchas oscuras correspondientes a las alas completamente formadas. Internamente, el adulto se mostró completamente formado. Las alas se oscurecieron rápidamente debido al desarrollo de los pelos que las cubren. Las patas también se encontraron totalmente formadas. (Figura 14: E, Figura 15: E, Figura 16: D).
- A partir del día 10, se produjo la emergencia del adulto mediante una apertura redonda en el extremo apical del capullo. Las alas presentaban una coloración negra oscura (Figura 14: F, Figura 15: F).

Discusión

El estado pupal de diversas especies de Chrysopidos fue previamente abordado de manera general por Canard & Volkovich (2007). Este trabajo, por primera vez, se enfoca en el desarrollo pupal de la especie *C. externa*, el cual exhibe un comportamiento similar al de otras especies del género: la larva permanece inmóvil en el capullo en el estado de prepupa y, después de tres días, transita al estado de pupa exarata. En contraste con el estudio de Canard & Volkovich (2007), en nuestra investigación, el cambio de larva a pupa se produce entre el día 4 y el día 5 de observación, considerando el primer día como la formación del capullo; estas diferencias podrían atribuirse a variaciones de temperatura, tal como sugiere Palomares-Pérez *et al.* (2020), donde se determinó que la duración total del estado de pupa fue de 10,6 días.

Durante el estado de prepupa, se registra un incremento en el tejido abdominal con una coloración amarilla, correlacionado con los cuerpos grasos, fenómeno descrito también por Riddiford (1993), quien lo atribuye a la acumulación de proteínas de la hemolinfa de las larvas en estos cuerpos grasos.

Los estudios acerca de los cambios en el estado pupal de los insectos son limitados y se restringen a algunas especies. Una diferencia notable en *C. externa* es que la formación de los ojos compuestos concluye primero, seguido por las antenas y el aparato bucal, lo que sugiere que el tagma cefálico es la primera estructura en completar su desarrollo, en contraste con los apéndices torácicos, que finalizan su formación hacia el final del estado pupal. Este hallazgo contrasta con los estudios sobre dípteros como *Melanoloma viatrix* (Hendel, 1911) (Diptera: Richardiidae) y *Drosophila melanogaster*, donde la formación de los apéndices cefálicos ocurre al final del estado pupal (Cagan & Ready, 1989; Villalobos *et al.*, 2009).

Las alteraciones externas en la coloración del capullo guardan una estrecha relación con los cambios internos que acontecen. Esta relación es relevante, ya que puede utilizarse para comprender el estado real del desarrollo, independientemente de conocer la temperatura o de realizar conteo de días fijos, siendo útil para determinar en qué estadio se encuentran las pupas de *C. externa* en el campo y coordinar estrategias sanitarias apropiadas para no interferir con el desarrollo del controlador biológico a campo.

El conocimiento de los cambios internos en el capullo es significativo, ya que permite determinar el momento preciso de muerte de la pupa en estudios ecotoxicológicos de laboratorio y comprender la relación entre los mecanismos de acción de los contaminantes y los cambios fisiológicos del individuo.

En resumen, los cambios internos de las pupas de *C. externa* son poco explorados y difíciles de comparar con otras especies debido a la escasez de datos similares. Esta información resulta valiosa para la comprensión biológica de esta especie, las actividades de campo y los estudios ecotoxicológicos sobre el impacto de los pesticidas en los agentes de control biológico.

Bibliografía

Cagan, R. L., & Ready, D. F. (1989). The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina. *Developmental biology*, 136(2), 346-362.

Canard, M., & Volkovich, T. A. (2007). Outlines of lacewing development. En *Lacewings in the crop environment* (2da ed., pp. 130-155). Peter McEwen.

Haramboure, M., Reguilón, C., Alzogaray, R., & Schneider, M. I. (2014). First Record of *Chrysoperla asoralis* And *C. argentina* (Neuroptera: Chrysopidae) In Horticultural Fields Of La Plata Associated With The Sweet Pepper (*Capsicum Annuum* L.). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 73 (3-4), 187-190. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0373-56802014000200013&lng=es&tlng=en.

Lira, R., & Batista, J. (2006). Aspectos biológicos de *Chrysoperla externa* alimentados com pulgões da erva-doce. *Revista De Biología E Ciências Da Terra*, 6(2).

Liu, X., Guo, X., Feng, Y. et al. (2023). Morfología del aparato reproductor masculino y ultraestructura espermática de la crisopa verde, *Chrysopa pallens* (Rambur, 1838) (Neuroptera: Chrysopidae). *BMC Zool* 8, 15 <https://doi.org/10.1186/s40850-023-00175-8>

Núñez Z., E. (1989). Ciclo biológico y crianza de *Chrysoperla externa* y *Ceraeochrysa cincta*, (Neuroptera, Chrysopidae). *Revista Peruana De Entomología*, 31(1), 76–82. Recuperado a partir de <https://www.revperuentomol.com.pe/index.php/rev-peru-entomol/article/view/904>

Palomares-Pérez, M., De Jesús Molina-Ruelas, T., Bravo-Núñez, M., & Arredondo-Bernal, H. C. (2020). Life table of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) reared on *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae). *Revista Colombiana de Entomología*, 46(1), e6831. <https://doi.org/10.25100/socolen.v46i1.6831>

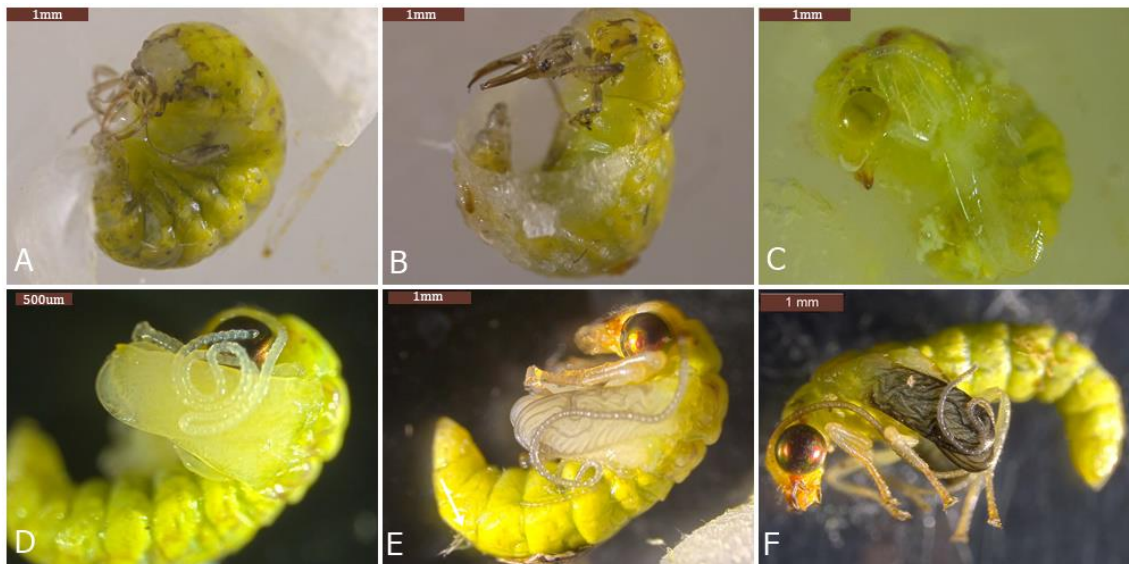
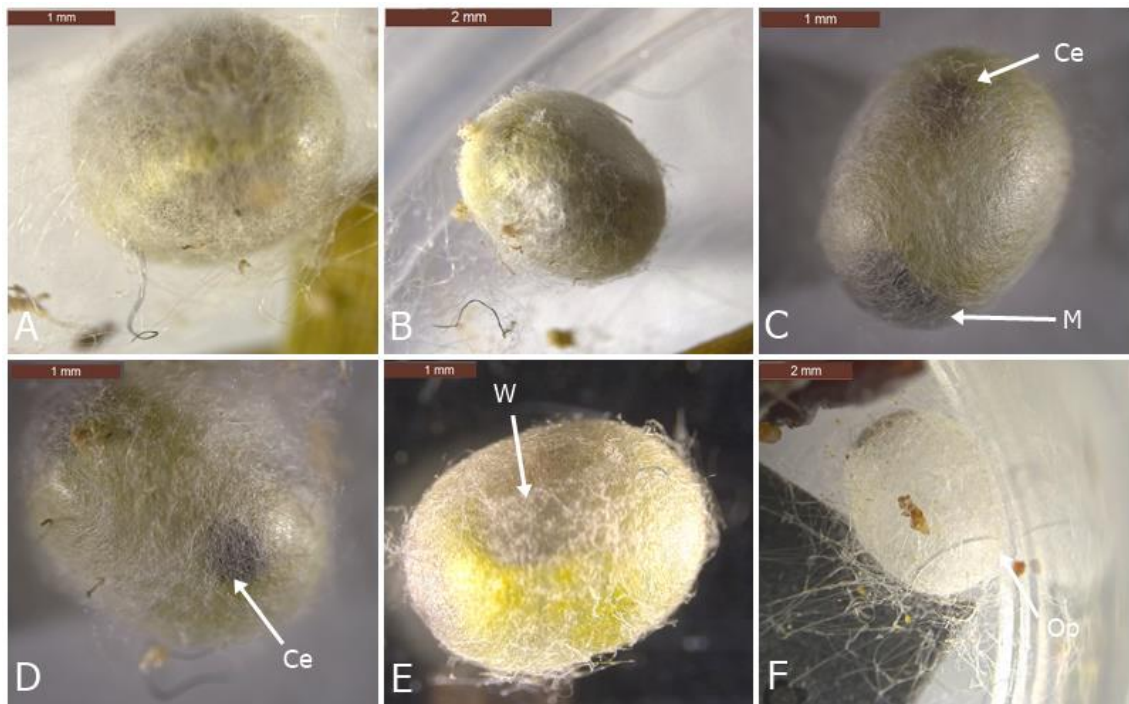
Riddiford, L. M. (1993). Hormones and *Drosophila* development. The development of *Drosophila melanogaster*, 2, 899-939.

Valencia Luna, Luis Aurelio, Romero Nápoles, Jesús, Valdez Carrasco, Jorge, Carrillo Sánchez, José Luis, & López Martínez, Víctor. (2006). Taxonomía y registros de Chrysopidae (Insecta: Neuroptera) en el estado de Morelos, México. *Acta zoológica mexicana*, 22(1), 17-61. Recuperado en 24 de julio de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372006000100003&lng=es&tlng=es.

Villalobos Moreno, Alfonso, Agudelo M, Juan Carlos, Barajas S, Andrés Fernando, Herrera Q, Sandra, & Céspedes, Juan Carlos. (2009). Cambios morfológicos durante la ontogenia del estado pupal de *Melanoloma viatrix* (Diptera: Richardiidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 35(1),

98-100. Retrieved July 28, 2023, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882009000100017&lng=en&tlng=es.

Imágenes de la sección



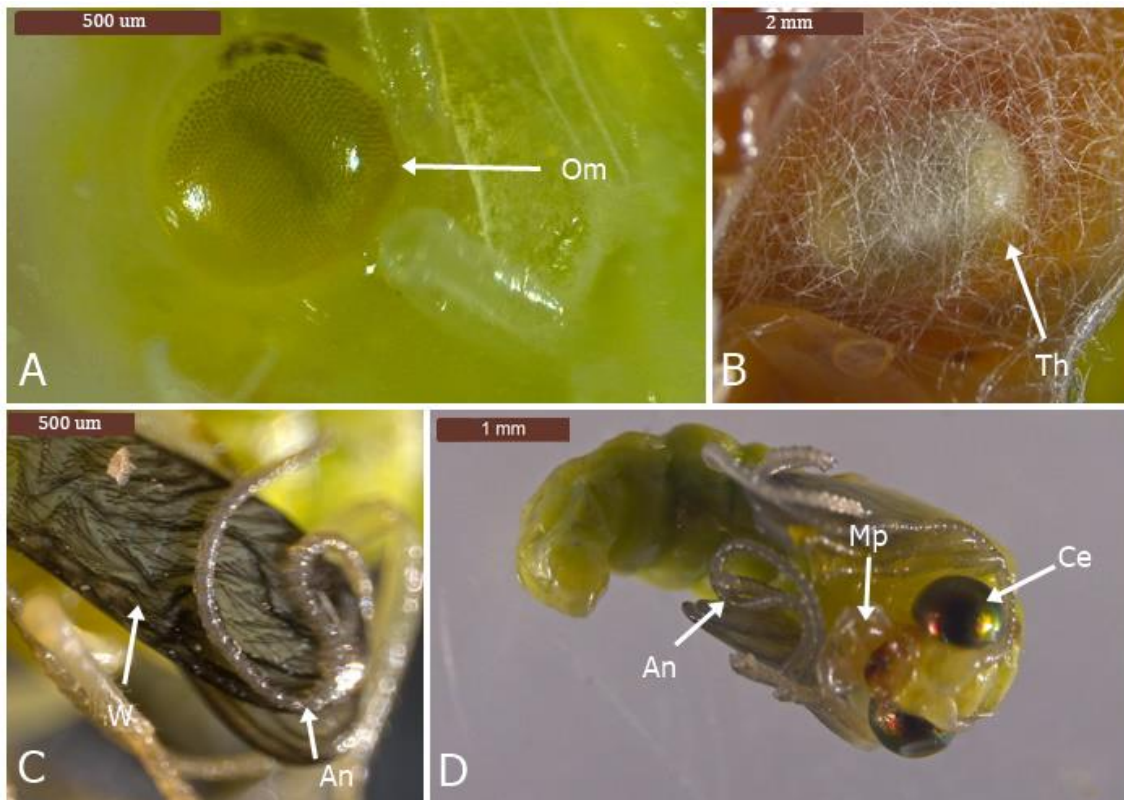


Figura 16: Detalle de pupas de *Chrysoperla externa*. A: Detalle de la formación de omatidios. B: Hilos fijados al sustrato en el primer día de formación del cocón. C: Detalle de alas y antenas día 10 de pupa. D: Tagma cefálico totalmente formado día 9 de pupa. Referencias. Om: omatidios. Th: Hilos del cocón. An antenas. Mp: aparato bucal. Ce: ojos compuestos. W: alas.

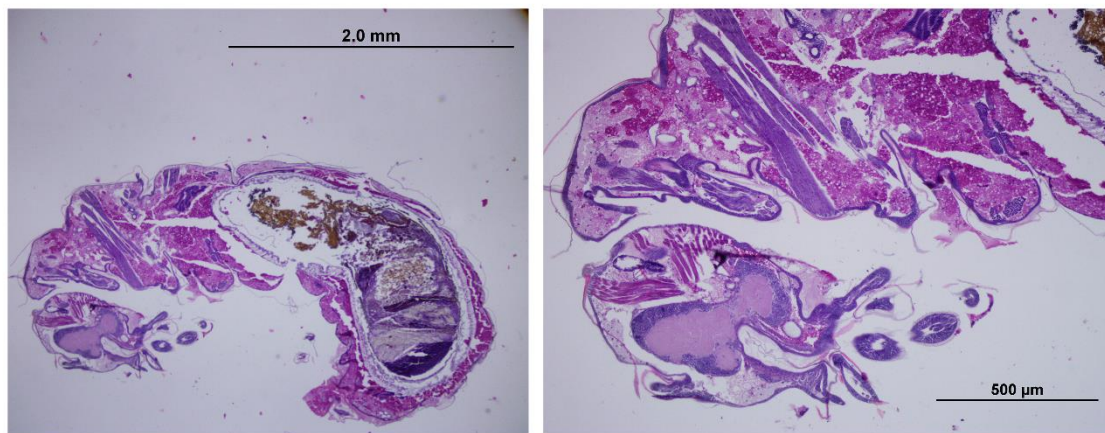


Figura 17: Cortes histológicos de pupa de *Chrysoperla externa* de 5 días de desarrollo. Izq. Cuerpo entero. Dere: Detalle de cabeza.

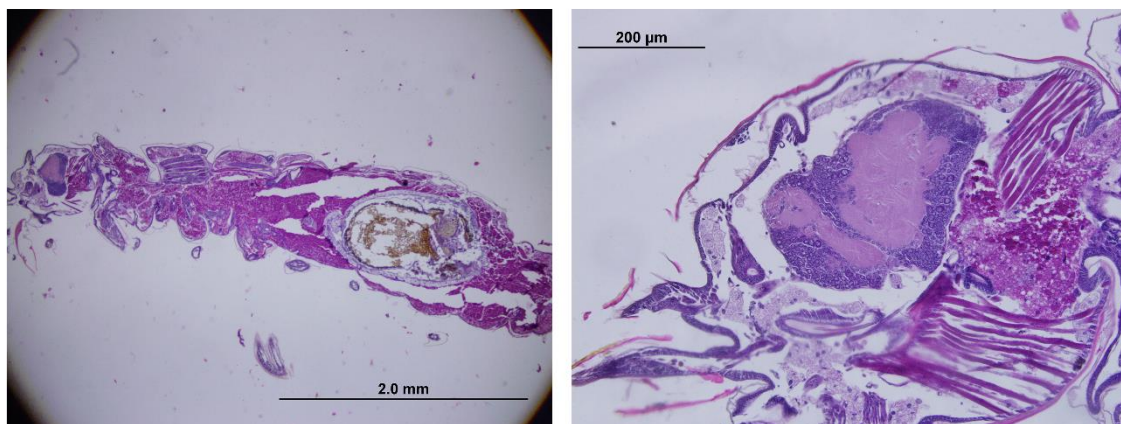


Figura 18: Cortes histológicos de pupa de *Chrysoperla externa* de 7 días de desarrollo. Izq. Cuerpo entero. Dere: Detalle de cabeza.

4.1.4 Citogenética de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae)

Introducción

La familia Chrysopidae es la segunda en importancia dentro del orden Neuroptera. Está compuesta por 1416 especies agrupadas en 82 géneros distribuidos alrededor del mundo (Winterton & Freitas 2006; Garzón-Orduña *et al.*, 2018). *Chrysoperla externa* y *C. argentina* son dos especies de las cuatro especies de crisópidos de importancia económica citadas en Argentina (Reguilón *et al.*, 2006; Haramboure *et al.*, 2014). Las formas juveniles se caracterizan por su poder depredador de plagas agrícolas y forestales de gran importancia económica. Dentro de los principales plagas consumidas se encuentran los áfidos y moscas blancas (Flores *et al.*, 2015).

Los estudios citogenéticos dentro de Chrysopidae indican que pueden observarse con mayor frecuencia la fórmula cariotípica $2n=12$ con sistema cromosómico sexual XY/XX (Hirai, 1957; Blackmon *et al.*, 2016). Los cromosomas sexuales presentan igual tamaño o el cromosoma X puede ser mayor al cromosoma Y (MacLeod, 1969). En base a los estudios meióticos realizados en las especies presentes en Argentina, se ha reportado que *C. externa* y *C. argentina* presentan dicha fórmula cariotípica (Andrada, 2012). Ensayos realizados en Brasil señalan que *C. externa* presenta cromosomas telocéntricos como la mayoría de las especies del orden (Lopes, 2012). En esta especie, los cromosomas exhiben un decrecimiento gradual de tamaño, ubicando al cromosoma X intermedio entre los pares 1 y 2 y al cromosoma Y entre los pares 4 y 5 (Lopes, 2012).

El objetivo de este trabajo fue analizar y describir el ciclo celular mitótico de *C. externa* junto con un análisis de la morfometría cromosómica para utilizar esta información con base en la evaluación de daños citogenéticos producidos por agroquímicos. Junto a ello, se presentan los primeros resultados de cariotipo de *C. argentina*, junto con las sus mediciones cromosómicas.

Materiales y métodos

El material biológico fue criado según lo descrito en la sección materiales y métodos generales.

La obtención de cromosomas se llevó a cabo extrayendo 200 huevos de los cartones que actúan de sustrato en las colonias. Los huevos fueron seleccionados al azar, y se aplicó la técnica “confección de preparados citogenéticos con orceína”, tal como se describe en la sección de materiales y métodos generales. Adicionalmente, se extrajeron otros 200 huevos, se seleccionaron al azar y se llevó a cabo la técnica determinación de complemento cromosómico (sección 3.2.2), según los procedimientos detallados en la sección de materiales y métodos generales.

Todos los preparados fueron observados mediante un microscopio Olympus BX51 con cámara Olympus DP71, y las imágenes fueron capturadas utilizando el programa DP controller 3.3.1.292.

Los cromosomas de *C. externa* fueron medidos en el estado de metafase. Estas mediciones se llevaron a cabo utilizando el software libre IdeoKar 1.3, que permitió obtener las imágenes cariotípicas. Las ediciones de las fotos fueron realizadas con Inkscape 0.92.3. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando la versión de prueba de Minitab 18.

Los cromosomas que exhibieron bandeo natural fueron emparejados en pares. Aquellos cromosomas que no manifestaron una diferenciación marcada fueron agrupados según el criterio de un aporte cromosómico similar, y la relación de dicho aporte entre los cromosomas que se mantuvo constante a lo largo de las diversas imágenes.

El índice mitótico se obtuvo por conteo de 1000 células de cada uno de los tiempos de evaluación.

Resultados

Las células somáticas presentaron un tamaño de $9,74 \mu\text{m}$ ($\pm 1,99 \mu\text{m}$). Durante la interfase, el ADN se visualizó como cuerpos heteropicnóticos con una membrana nuclear bien diferenciada. Desde los primeros estadios de la mitosis, la membrana nuclear desapareció.

El índice mitótico en células provenientes de huevos de 24 h de puesta fue de 19,52%, el de células de huevos de 48 h de puesta fue de 5,19%. En el estado de metafase los cromosomas presentan la máxima compactación y los mismos se ubicaron en la placa ecuatorial (Figura 19).

Chrysoperla externa presentó 12 cromosomas sin evidencia de constricción primaria, con una longitud cromosómica total de 45,05 μm ($\pm 7,44 \mu\text{m}$). Los cromosomas en profase mostraron una condensación laxa con picnosis diferencial entre ellos, permitiendo diferenciar los pares cromosómicos. Los cromosomas sexuales presentaron diferencias de tamaño entre sí.

Se ordenaron los cromosomas de mayor a menor y se determinó cada par a partir de dicho ordenamiento. El par 1, compuesto por cromosomas de gran tamaño, exhibió un bandeo cromosómico natural, con un largo total de 11,39 μm ($\pm 4,18 \mu\text{m}$). El par 2 se caracterizó por cromosomas con un satélite y un largo total de 9,90 μm ($\pm 3,82 \mu\text{m}$). A lo largo de la condensación de profase, uno de los cromosomas presentó una condensación más lenta. El par 3 presentó un bandeo natural con un largo total de 9,70 μm ($\pm 3,66 \mu\text{m}$). Los pares 4 y 5 presentaron largos totales de 8,78 μm ($\pm 3,87 \mu\text{m}$) y 7,22 μm ($\pm 2,55 \mu\text{m}$), respectivamente. El par 4 mostró alociclia en comparación con el resto de los cromosomas, con una mayor velocidad de condensación (Figura 20).

El par sexual X/Y si bien tuvo un tamaño diferencial no se tuvo certeza de cuál era X e Y. Se decidió en base a la bibliografía que el cromosoma de mayor tamaño fuera el X. El largo total del par fue de 7,15 μm ($\pm 2,99 \mu\text{m}$) con un tamaño diferencial entre ellos. El cromosoma Y aportó al genoma total el 5,61% ($\pm 1,01$) con un largo total de 2,84 μm ($\pm 1,17 \mu\text{m}$), el X aportó el 7,36% ($\pm 0,43$) al genoma con un largo total de 3,72 μm ($\pm 1,37 \mu\text{m}$) (Gráfico 1).

Discusión

Para la discusión se eligió hacer una comparativa de especies de *C. externa*, junto con *C. argentina* y otras especies del género y de artrópodos. Ya que los resultados de *C. argentina* se presentaron en el anexo por ser ajenos al tema central de esta tesis, la discusión se encuentra en dicha sección.

Bibliografía

Andrada, A. R., Lozzia, M. E., González-Olazo, E., & Heredia, F. (2012). Estudios meióticos en dos especies de crisópidos (Chrysopidae: Neuroptera). *Acta zoológica lilloana*, 38-43.

Blackmon, H., Ross, L., & Bachtrog, D. (2016). Sex determination, sex chromosomes, and karyotype evolution in insects. *Journal of Heredity*, 108(1), 78-93. <https://doi.org/10.1093/jhered/esw047>

Flores, G. C., Reguilón, C., Alderete, G. L., & Kirschbaum, D. S. (2015). Liberación de *Chrysoperla argentina* (Neuroptera: Chrysopidae) para el control de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera, Aleyrodidae) en invernáculo de pimiento en Tucumán, Argentina. *Intropica: Revista del Instituto de Investigaciones Tropicales*, 10(1), 28-36.

Garzón-Orduña, I., Winterton, S., Jiang, Y., Breitzkreuz, L., Duelli, P., Engel, M., Penny, N., Tauber, C., Mochizuki, A. & Liu, X. (2019). Evolution of green lacewings

(Neuroptera: Chrysopidae): a molecular supermatrix approach. *Syst Entomol*, 44. 499-513. <https://doi.org/10.1111/syen.12339>

Haramboure, Marina, Reguilón, Carmen, Alzogaray, Raúl A., & Schneider, Marcela Inés. (2014). First record of *Chrysoperla asoralis* and *C. argentina* (Neuroptera: Chrysopidae) in horticultural fields of La Plata associated with the sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 73(3-4), 187-190. Recuperado en 06 de julio de 2023, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0373-56802014000200013&lng=es&tlng=en.

Hirai, H. (1957). A Cytotaxonomic Study of the Chrysopidae (Neuroptera) (With 12 Text-figures). *北海道大學理學部紀要*, 13(1-4), 219-223.

MacLeod, E. (1969). Chromosome Cytology, Reproductive Behavior, and Ecology of the Insect Family Chrysopidae. *Research Project Report*. <https://journals.uwyo.edu/index.php/jhrs/article/view/4655>

Reguilón, C., González Olazo, E., & Núñez Campero, S. (2006). Morfología de los estados inmaduros de *Chrysoperla argentina* (Neuroptera: Chrysopidae). *Acta zoológica lilloana*, 50(1-2), 31-39.

Winterton, S., and de Freitas, S. (2006). Molecular phylogeny of the green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae). *Australian Journal of Entomology*, 45(3), 235-243. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.2006.00537.x>

Imágenes de la sección

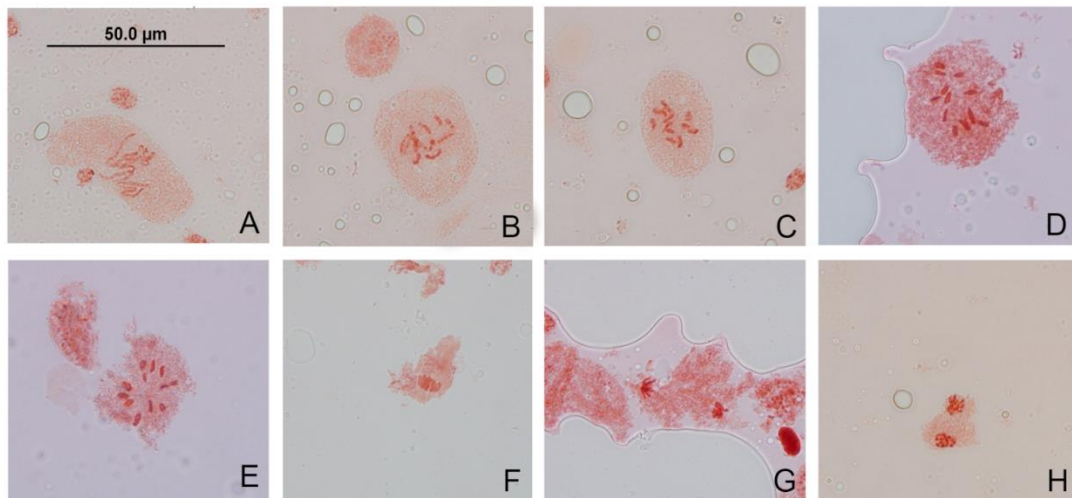


Figura 23: Ciclo mitótico de *Chrysoperla externa*. Tinción con orceína acética. Observación con microscopio Olympus BX51 A-B: Profase. C: Profase tardía. D: Prometáfase E-F: Metafase. G: Anafase. H: Anafase tardía.

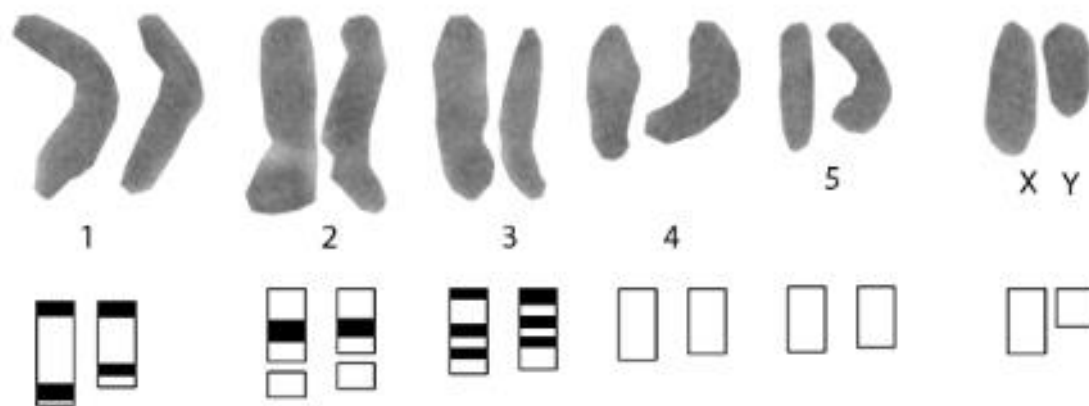


Figura 20: Cariotipo de *Chrysoperla externa* obtenido a partir del análisis de las imágenes obtenidas a partir de preparaciones citogenéticas. Parte superior: Imagen real de los cromosomas. Parte inferior: Diagrama de los cromosomas obtenido de forma promedio de las imágenes evaluadas.

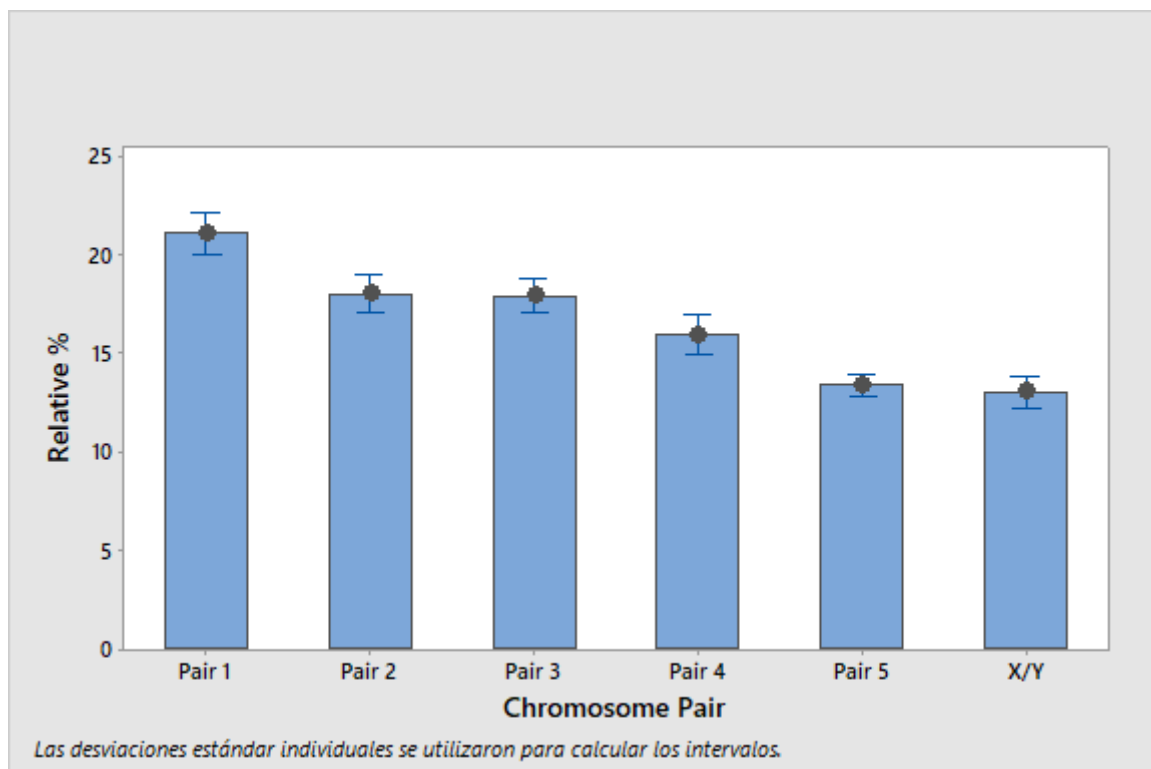


Gráfico 1: Aporte relativo de ADN de cada par cromosómico para la especie *Chrysoperla externa*. Los puntos indican media estadística. IC de 95% de la media.

4.2 Resultados de Estudios Toxicológicos



En este capítulo se plantea la resolución de los objetivos específicos:

- Estudiar la toxicidad de un insecticida comercial con imidacloprid en relación con la supervivencia, el desarrollo y la reproducción de *C. externa*.
- Estudiar la toxicidad de un insecticida comercial con spirotetramat evaluando la supervivencia, el desarrollo y la reproducción de *C. externa*.
- Analizar la toxicidad a nivel histológico de los insecticidas comerciales con imidacloprid y spirotetramat en *C. externa*.

En los ensayos que involucraron insecticidas, se utilizaron exclusivamente formulaciones comerciales en todos los casos. En este texto se nombra la molécula activa como sinónimo del formulado analizado con el fin de hacer más llevadera la redacción. Sin embargo, es relevante destacar que en ninguno de los ensayos se empleó la molécula pura.

Con el propósito de alcanzar los objetivos establecidos, se separaron los estudios en secciones principalmente por el estado de desarrollo en el cual se realizaron los ensayos.

4.2.1 Toxicidad del imidacloprid (Matrero 35®) sobre pupas de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae)

Introducción

En la agricultura moderna, los insecticidas sintéticos son la principal forma de control de las poblaciones de insectos plaga. Solo una pequeña porción del plaguicida aplicado en el campo alcanza el objetivo biológico final. Una gran parte del plaguicida aplicado se libera al medio ambiente, donde puede provocar problemas, en los organismos no blanco como en los enemigos naturales. No solo se pueden producir efectos directos como la muerte sino también efectos indirectos como la reducción de la capacidad de alimentación, reducción de la fertilidad, reducción de la longevidad y tamaño de los organismos entre otras cosas (Ndakidemi *et al.*, 2016; Tišler *et al.*, 2009).

El imidacloprid [1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N -nitro-imidazolidin-2-ilidenamina], es un insecticida utilizado principalmente para el control de insectos succionadores en los cultivos agrícolas. Su modo de acción es como agonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina postsinápticos (nAChR) de forma irreversible, lo que provoca un efecto en el funcionamiento normal del sistema nervioso (Buckingham *et al.*, 1997; Wamhoff & Schneider, 1999).

Algunos productos de síntesis pueden tener impactos negativos sobre los enemigos naturales y los polinizadores que no son objetivo de control (Ndakidemi *et al.*, 2016). En el contexto de la agricultura, las crisopas desempeñan un papel crucial como enemigos naturales de las principales plagas agrícolas succionadoras como áfidos y cochinillas. Las especies citadas para Argentina dentro del género *Chrysoperla* son *C. externa*, *C. argentina*, *C. asoralis* y *C. defreitasi*, siendo las tres primeras las principales registradas en los campos agrícolas (Haramboure *et al.*, 2014).

El ciclo biológico de las crisopas consta de siete estados de desarrollo, desde el huevo hasta el adulto. Los huevos eclosionan en larvas que pasan por tres estadios, alimentándose principalmente de insectos fitófagos. Las larvas del tercer estadio suspenden su alimentación e ingresan a un estado de prepupa donde comienzan a tejer un cocon con hilos mucoproteicos secretados por los tubos de Malpighi que salen por la abertura anal. Luego de aproximadamente 3 días, la larva pasa a estado de pupa verdadera y los restos de muda se visualizan a través del capullo. De los capullos emergen adultos de color verde brillante. Los adultos no presentan hábitos predatorios, y se alimentan de polen, néctar y “honeydew” (Nuñez, 1989, Valencia Luna *et al.* 2006; Lira & Batista, 2006).

Existen evidencias del daño ejercido por los pesticidas neonicotinoides en diversos aspectos biológicos de las diferentes especies de *Chrysoperla*. La azadiractina (insecticida botánico leimonoides) afecta la fecundidad de hembras de *C. carnea* (Stephens, 1836) pero no de los machos (Medina *et al.*, 2004). El acetamiprid (insecticida neonicotinoide) aplicado sobre huevos de *C. externa* produce reducción de la supervivencia principalmente en huevos y el primer estadio larvario (Rimoldi *et al.*, 2017). El etofenprox (insecticida piretroide) en huevos de *C. externa* produce reducciones de eclosión de huevos de más del 50% (Pasini *et al.*, 2018). La mezcla de imidacloprid + beta-ciflutrina (insecticida piretroide) provoca la reducción de fecundidad en adultos emergidos de pupas tratadas de *C. externa* pero no provoca cambios en la mortalidad de las mismas (Pasini *et al.*, 2018).

Producto de que el imidacloprid se utiliza para el control de las principales presas de *C. externa* sumado a su escasa selectividad del producto hacia otros artrópodos, el objetivo de esta sección fue evaluar la toxicidad indirecta del imidacloprid en el estado de pupa de *C. externa*.

Materiales y métodos

El material vivo se mantuvo como se detalló en la sección materiales y métodos generales.

Preparación del material vivo

Se extrajeron de la colonia, cartones con huevos de 24 h o menos de puesta y se criaron en contenedores plásticos alimentados con áfidos hasta el segundo estadio larval. En ese momento, 54 individuos fueron individualizados en cajas de Petri ventiladas, con alimentación diaria de áfidos y dieta artificial siguiendo el protocolo de Haramboure *et al.* (2016). Se realizó el seguimiento individual de los individuos hasta la formación del capullo. Cuando se observó la exuvia negra apical, momento en el cual se forma la pupa verdadera, siguiendo lo enunciado en la sección “4.1.3 Ontogenia pupal de *Chysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae)” se realizó el pesaje de los capullos y se realizó la aplicación de imidacloprid como se detalla más adelante.

Se registraron en ambos tratamientos tanto las pupas muertas como los preimagos muertos, es decir, los adultos emergidos que no lograron desplegar las alas ni el abdomen. Los adultos recién emergidos fueron sexados mediante el uso de una lupa binocular Ahecro modelo ZTX-EC2 y luego reunidos en parejas con el fin de determinar su fertilidad y fecundidad. Las parejas de adultos se conformaron de la siguiente manera:

- Parejas control: ninguno de los dos individuos fue sometido a ningún tipo de tratamiento.
- IMIDA H: los machos no estuvieron expuestos al producto comercial, mientras que las hembras sí lo estuvieron en el estado de pupa. Esto se realizó para determinar si existía una reducción de la fecundidad diferencial por sexo, como se ha observado con otros productos.

- IMIDAx2: tanto los machos como las hembras fueron tratados con el producto comercial en estado de pupa.

Se armaron seis parejas por tratamiento, que se colocaron en cajas cilíndricas de plástico (8,5 cm de diámetro × 9,0 cm de profundidad) para el apareamiento. Los contenedores se cubrieron internamente con cartón en los costados como soporte para la oviposición y para facilitar la identificación, conteo y extracción de los huevos. Las parejas se alimentaron con polen, dieta artificial indicada en Haramboure *et al.* (2016) y agua *ad libitum*. Se realizó un seguimiento de los huevos hasta emergencia de la F2, por ello se contabilizaron las primeras cinco puestas de las parejas. Se evaluó en la F2 la emergencia de las larvas. También se realizó el seguimiento de los adultos emergidos hasta su muerte para determinar longevidad.

Aplicación de insecticida

Para los ensayos se utilizó el producto comercial Matrero 35[®] de formulación líquida comercializado por la empresa Nufarm. El principio activo es Imidacloprid (35%). La concentración de campo utilizada fue 50 cm³/hl (350 cm³/ha) equivalente a una concentración de 175 mg i.a/l. Se realizaron aplicaciones tópicas mediante micro aplicador manual Burkard con gotas de 1 µl. Las pupas fueron aplicadas colocando la gota sobre el capullo. Todos los controles fueron tratados con acetona 80% (GA) siguiendo el procedimiento detallado en Schneider *et al.* (2020). El seguimiento de los individuos se realizó cada 24 h.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante software R. Los tiempos de desarrollo y longevidad se determinaron a partir del análisis de las curvas de Kaplan-Meier. Para los distintos análisis, se aplicaron pruebas de chi-cuadrado. Los datos de fecundidad y eclosión de la F2 se analizaron bajo un modelo de tipo GLMM para tipo de respuesta binomial negativa, con efectos aleatorios dados por la pareja con función de enlace logarítmico. Los modelos se validaron con análisis gráfico de residuos y también se calcularon los coeficientes de determinación marginal y condicional para dar cuenta de la varianza explicada por los efectos fijos y ambos efectos respectivamente (Anexo – Salidas de R para Diferentes Modelos). El modelo de fecundidad se consideró como:

$$Y_i = \text{\#huevos con } Y_i \sim \text{Neg Bin y } E(Y_i) = \eta_i$$

Se modeló $\log(\eta_i)$ con efecto fijo Tratamiento y efecto aleatorio dado por la pareja.

El modelo de eclosión se consideró como:

$$Y_i = \text{\#huevos con } Y_i \sim \text{Neg Bin y } E(Y_i) = \eta_i$$

Se modeló $\log(\eta_i)$ con efecto fijo tratamiento y efecto aleatorio dado por la pareja. Se considera $\log(\text{eclosión})$ como offset.

Resultados

La mortalidad de pupas y preimagos no presentaron diferencias entre los individuos tratados y el control ($X^2=0$; $df=1$; $p\text{-valor}=1$; $X^2=0$; $df=1$; $p\text{-valor}=0,94$ respectivamente). El control presentó una mortalidad de pupa de 14% ($de= 6,8$) y de imago de 21,78% ($de= 8,6$). Los individuos tratados presentaron una mortalidad en pupa del 11,1% ($de= 6$) y en imago de 16,7% ($de= 7,6$).

El tiempo de desarrollo pupal entre los individuos tratados y control fue diferente ($X^2= 15,8$, $df=1$, $p\text{-valor}= 7,189 \times 10^{-5}$). Los individuos tratados tardaron 10 días para emerger frente a los controles que tardaron entre 8 y 9 días (Gráfico 2).

De los individuos tratados que pudieron emerger, en tres casos puntuales se presentaron situaciones a mencionar:

En uno de los machos, 1 día después de la emergencia se comenzó a observar cómo salía líquido por la unión de la cabeza con el ojo compuesto, el insecto terminó con un volteo y posterior muerte.

Dos hembras presentaron protuberancias en abdomen, que a las 24 h comenzaron a necrosarse y a las 72 h concluyó con la muerte de los individuos (Figura 21).

Las parejas presentaron diferencias respecto a la oviposición (Tabla 1). Las primeras cinco parejas de parejas IMIDAx2 presentaron un valor medio de 18,8 huevos ($de= 14,8$) por postura. Las parejas del tratamiento IMIDA H, tuvieron un valor medio de 25,1 huevos ($de= 12,2$) por postura (Gráfico 3 y 4).

El modelo planteado para la eclosión de los huevos puestos por las parejas evaluadas (F2) presentó para el efecto aleatorio de la pareja una varianza de cero indicando que el efecto de la variable fue nulo. La eclosión de los huevos de la F2 no mostró diferencias para los diferentes tratamientos que fueron evaluados (Tabla 2). Los valores medios de eclosión estuvieron entre 70 y 80% de los huevos puestos por las parejas (Gráfico 5).

La longevidad de los adultos emergidos de las pupas tratadas con imidacloprid no presentó variación respecto a los individuos control ($X^2=0$, $df=1$, $p\text{-valor}=0,999$) (Gráfico 6).

Discusión

El imidacloprid ha sido identificado como un agente que ocasiona la mortalidad de huevos, reduce la fecundidad en hembras y provoca la muerte de larvas y adultos en *C. externa* (Godoy *et al.*, 2008; Pasini *et al.*, 2020). En este estudio, se observa que los individuos tratados con imidacloprid muestran tiempos de desarrollo pupal superiores en comparación con los individuos del grupo control. Estos resultados son congruentes con lo observado para la azadiractina, un insecticida de origen botánico (Iannaccone, 2002), pero difieren de los reportados por de Fátima *et al.* (2013), quienes no encontraron diferencias en los tiempos de emergencia al aplicar los insecticidas clorpirifós (insecticida organofosforado) y deltametrina (insecticida piretroide).

La ausencia de variaciones significativas en los cambios de mortalidad de las pupas respalda la hipótesis de que el capullo actúa como una protección para las pupas en su interior, en línea con investigaciones previas tanto sobre el imidacloprid como sobre otros productos comerciales para esta especie (Pasini *et al.*, 2018; Godoy *et al.*, 2004; Cosme *et al.*, 2009). De manera similar, esta situación se asemeja a lo observado en la especie *Ceraeochrysa cubana* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysipidae) expuesta al imidacloprid (Rugno *et al.*, 2015).

Hasta el momento, se han planteado dos hipótesis respecto a la acción del capullo frente a la presencia del insecticida. Pasini *et al.* (2018) sugiere que el capullo actúa como una barrera protectora para las pupas y que la exposición ocurre durante el proceso de emergencia. En contrapartida una segunda hipótesis plantea que el producto se infiltra a través de los poros de la red de hilos, los cuales tienen un diámetro de aproximadamente 6 μm y atraviesan el capullo, permitiendo que el insecto respire durante su etapa de pupa (de Fátima *et al.*, 2013).

La infiltración a través de los poros parece ser la explicación más aceptada, ya que existen insecticidas como el clorpirifós, deltametrina y teflubenzuron que causan la muerte de la pupa dentro del capullo (Cosme *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2020; de Fátima *et al.*, 2013). Siguiendo esta premisa, es posible que el imidacloprid no esté penetrando a través de los poros en una concentración suficiente para causar mortalidad en este estadio.

A pesar de que no se observaron diferencias en la mortalidad de pupas, algunos adultos presentaron malformaciones que les llevaron a la muerte a corto plazo, reduciendo así el número efectivo de adultos capaces de reproducirse.

La fecundidad de los adultos emergidos de pupas tratadas fue significativamente menor que la de las pupas del grupo control. Este hallazgo concuerda con los resultados obtenidos por Pasini *et al.* (2018) al aplicar imidacloprid junto con betaciflutrina, donde la fertilidad de los adultos emergidos de pupa tratada disminuyó por debajo de 30%. También se observó una reducción en el número de huevos puestos por las hembras tratadas en pupa al utilizar productos como azadiractina, etiprol y teflubenzuron (Souza *et al.*, 2020). En este trabajo, las parejas que mostraron una menor fecundidad fueron aquellas en las que tanto el macho como la hembra habían estado expuestos, lo que sugiere que se está produciendo un efecto negativo en ambos sexos, no solo en las hembras, como se demostró en los tratamientos con azadiractina sobre *C. carnea* (Medina *et al.*, 2004) y en tratamientos con imidacloprid sobre *Drosophila melanogaster* (Charpentier *et al.*, 2014).

A pesar de que los huevos puestos por las parejas tratadas resultaron significativamente menores en cantidad, eclosionaron de forma normal sin diferencias con respecto a los huevos de las parejas control, datos similares a los encontrados por Souza *et al.* (2020) para la azadiractina y el etiprol. La longevidad de los adultos emergidos de pupas tratadas no se vio afectada por los tratamientos, situación similar a la observada en *Ceraeochrysa cubana* (Rugno *et al.*, 2015).

En resumen, podemos concluir que el imidacloprid en su forma comercial Matrero 35®, aplicado sobre las pupas de *C. externa*, afectó únicamente la fertilidad de los adultos. Este efecto indirecto de la aplicación podría, a mediano plazo, resultar en una reducción en la población de este enemigo natural, lo que a su vez podría limitar el control biológico de las plagas agrícolas y restringir su uso en los programas de manejo integrado de plagas.

Bibliografía

- Buckingham, S. D., Lapiéd, B., Corronc, H. L., Grolleau, F., & Sattelle, D. B. (1997). Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *The Journal of Experimental Biology*, 200(21), 2685-2692. <https://doi.org/10.1242/jeb.200.21.2685>
- Charpentier, G., Louat, F., Bonmatin, J., Marchand, P. A., Vanier, F., Locker, D., & Decoville, M. (2014). Lethal and sublethal effects of imidacloprid, after chronic exposure, on the insect model *Drosophila melanogaster*. *Environmental Science & Technology*, 48(7), 4096-4102. <https://doi.org/10.1021/es405331c>
- Cosme, L. V., Carvalho, G. A., De Moura, A. P. B. L., & Parreira, D. S. (2009). Toxicidade de óleo de nim para pupas e adultos de *Chrysoperla externa* (hagen) (neuroptera: chrysopidae). *Arquivos Do Instituto Biológico*, 76(2), 233-238. <https://doi.org/10.1590/1808-1657v76p2332009>
- de Fátima T., Andrea, Andrade C., Gerardo, Costa, Lenira Viana, & Fonseca M., Valéria. (2013). Selectivity of seven insecticides against pupae and adults of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 39(1), 34-39. Retrieved July 18, 2023, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882013000100006&lng=en&tlng=
- Godoy, M. S., Carvalho, C. F., & Carvalho, G. A. (2008, October). Selectivity of phytosanitary products used on citrus orchards to *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861)(Neuroptera: Chrysopidae). In 7th IOBC conference on Integrated Fruit Production at Avignon in 2008. (p. 233).
- Godoy, M. S., Carvalho, G. A., Moraes, J. C., Cosme, L. V., Goussain, M. M., Carvalho, C. F., & De Moraes, A. A. (2004). Seletividade de seis inseticidas utilizados em citros a pupas e adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). *Neotropical Entomology*, 33(3). <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2004000300014>
- Haramboure, M., Mirande, L., & Schneider, M.I. (2016) Improvement of the mass rearing of larvae of the neotropical lacewing *Chrysoperla externa* through the incorporation of a new semiliquid artificial diet. *BioControl*, 61, 69-78. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9699-7>
- Haramboure, M., Reguilón, C., Alzogaray, R., & Schneider, M. I. (2014). First Record of *Chrysoperla asoralis* And *C. argentina* (Neuroptera: Chrysopidae) In Horticultural Fields Of La Plata Associated With The Sweet Pepper (*Capsicum annum* L.). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 73 (3-4), 187-190. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0373-56802014000200013&lng=es&tlng=en
- Iannacone, J. (2002). Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/6100>
- Lira, R., & Batista, J. (2006). Aspectos biológicos de *Chrysoperla externa* alimentados com pulgões da erva-doce. *Revista De Biologia E Ciências Da Terra*, 6(2).
- Medina, P., Budia, F., del Estal, P., & Viñuela, E. (2004). Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chrysoperla carnea* (Stephens) reproduction: toxicity and ultrastructural approach. *Journal of economic entomology*, 97(1), 43-50. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-97.1.43>
- Ndakidemi, B., Mtei, K., & Ndakidemi, P. A. (2016). Impacts of synthetic and botanical pesticides on beneficial insects. *Agricultural Sciences*, 07(06), 364-372. <https://doi.org/10.4236/as.2016.76038>
- Núñez Z., E. (1989). Ciclo biológico y crianza de *Chrysoperla externa* y *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera, Chrysopidae). *Revista Peruana De Entomología*, 31(1), 76-82. Recuperado a partir de <https://www.revperuentomol.com.pe/index.php/rev-peruentomol/article/view/904>
- Pasini, R. A., Grützmacher, A. D., De Bastos Pazini, J., De Armas, F. S., Bueno, F. A., & Pires, S. N. (2018). Side effects of insecticides used in wheat crop on eggs and pupae of *Chrysoperla externa* and *Eriopis connexa*. *Phytoparasitica*, 46(1), 115-125. <https://doi.org/10.1007/s12600-018-0639-9>
- Pasini, R. A., Rakes, M., Castilhos, R. V., Silva de Armas, F., de Bastos Pazini, J., Zantedeschi, R., & Grützmacher, A. D. (2020). Residual action of five insecticides on larvae and adults of the neotropical predators *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) and *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ecotoxicology*, 30, 44-56.
- Rugno, G. R., Zanardi, O. Z., & Yamamoto, P. T. (2015). Are the Pupae and Eggs of the Lacewing *Ceraeochrysa cubana* (Neuroptera: Chrysopidae) Tolerant to Insecticides? *Journal of Economic Entomology*, 108(6), 2630-2639. <https://doi.org/10.1093/jee/fov263>
- Schneider, Marcela Inés; Adorno, Andrea; Fogel, Marilina N.; Rimoldi, Federico; Lopez, Silvia N. (2020). Compatibilidad entre el Control Químico y el Biológico. Evaluación de la toxicidad de plaguicidas sobre enemigos naturales. *Control biológico de plagas en horticultura: experiencias argentinas de las últimas tres décadas*. p. 140 - 186
- Souza, J. R., Moreira, L. A., Lima, L. R. C., Da Silva, T. D., Braga, P., & Carvalho, G. A. (2020). Susceptibility of *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) to insecticides used in coffee crops. *Ecotoxicology*, 29(9), 1306-1314. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02261-w>
- Tišler, T., Jemec, A., Mozetič, B., & Trebše, P. (2009). Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere*, 76(7), 907-914. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.05.002>
- Valencia Luna, Luis Aurelio, Romero Nápoles, Jesús, Valdez Carrasco, Jorge, Carrillo Sánchez, José Luis, & López Martínez, Víctor. (2006). Taxonomía y registros de Chrysopidae (Insecta: Neuroptera) en el estado de Morelos, México. *Acta zoológica mexicana*, 22(1), 17-61. Recuperado en 24 de julio de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372006000100003&lng=es&tlng=es.
- Wamhoff, H., & Schneider, V. S. (1999). Photodegradation of imidacloprid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1730-1734. <https://doi.org/10.1021/jf980820j>

Imágenes de la sección



Figura 21: Hembras de *Chrysoperla externa* tratadas con imidacloprid en estado de pupa. Concentración utilizada: 175 mg de i.a/l. Luego de la emergencia de los individuos, los especímenes comenzaron a presentar protuberancias en el abdomen que concluyó con una necrosis y posterior la muerte de los mismos.

Tabla 3: Random effects y Fixed effects del modelo de fecundidad; $Y_i = \text{\#huevo}$ s con $Y_i \sim \text{NegBin}$ y $E(Y_i) = \eta_i$ de parejas de *Chrysoperla externa* provenientes de pupas tratadas con imidacloprid con concentración de 175 mg de i.a/l. Se modela $\log(\eta_i)$ con efecto fijo Tratamiento y efecto aleatorio dado por la pareja.

RANDOM EFFECTS

GROUPS	Variance	Std.Dev.		
PAREJA (INTERCEPT)	0.0382	0.195		
NUMBER OF OBS: 85, GROUPS: PAREJA, 6				
FIXED EFFECTS				
	Estimate	Std.error	z value	Pr (> z)
(INTERCEPT)	3.2107	0.0902	35.62	< 2e-16
TRATAMIENTO IMIDA H	-0.1471	0.0574	-2.56	0.01
TRATAMIENTO IMIDA X2	-0.2952	0.0595	-4.96	6.9e-07

Tabla 2: Fixed effects del modelo de eclosión; Y_i =#huevos con $Y_i \sim \text{NegBin}$ y $E(Y_i)=\eta_i$ de huevos puestos por parejas de *Chrysoperla externa* provenientes de pupas tratadas con imidacloprid con concentración de 175 mg de i.a/l. Se modela $\log(\eta_i)$ con efecto fijo Tratamiento y efecto aleatorio dado por la pareja. Se considera $\log(\text{eclosión})$ como offset.

	ESTIMATE	STD.ERROR	Z VALUE	PR (> Z)
(INTERCEPT)	-0.2842	0.0905	-3.14	0.0017
TRATAMIENTOIMIDA H	0.0445	0.1248	0.36	0.7214
TRATAMIENTOIMIDA X2	0.0212	0.1297	0.16	0.8702

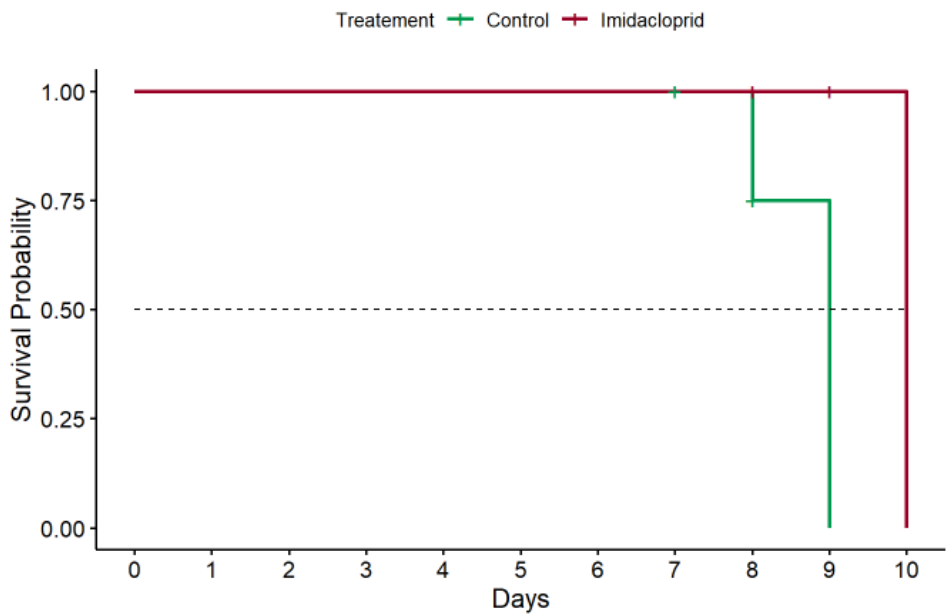


Gráfico 2: Análisis de tiempo de emergencia (prueba de Kaplan-Meier) de pupas de *Chrysoperla externa* tratadas con imidacloprid. La concentración utilizada fue 175 mg i.a/l. Control tratado con acetona 80% (GA). Se encuentran diferencias en las curvas de supervivencia ($X^2= 15.8$, $df=1$, $p\text{-value}=7.189\times10^{-3}$).

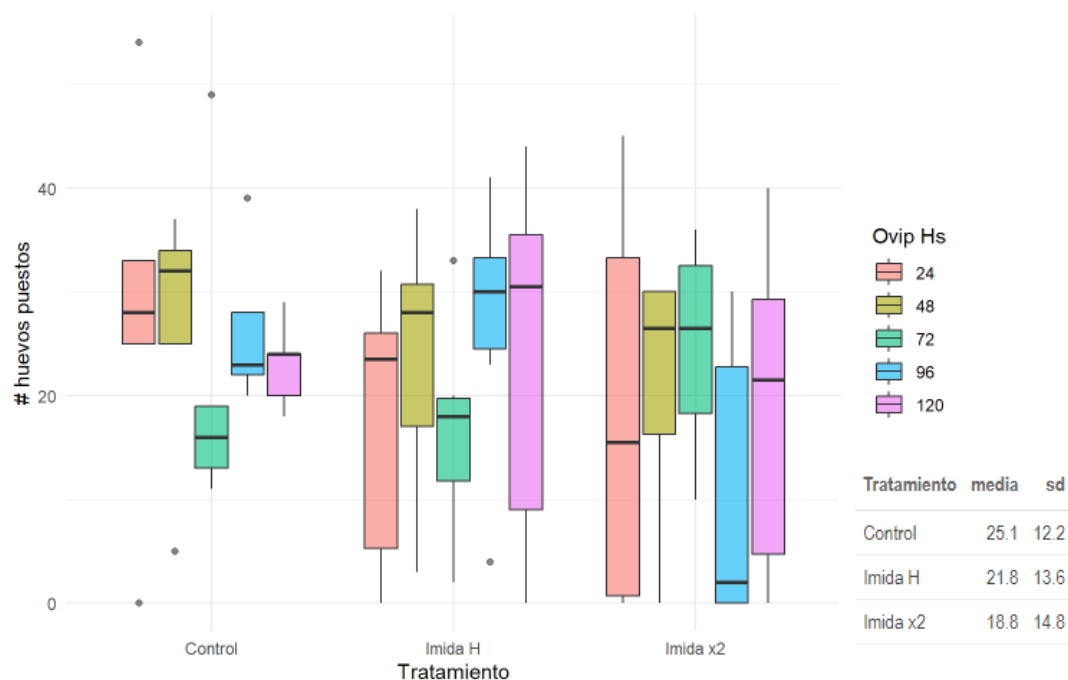


Gráfico 3: Resumen de fecundidad de las parejas evaluadas de *Chrysoperla externa*. Los individuos fueron tratados en estado de pupa con imidacloprid. Numero de huevos puestos por pareja a las diferentes h de evaluación. Línea de caja indica valor medio de número de huevos. Asterisco indica valores extremos. Control: pareja sin tratar. Imida H: solo la hembra fue tratada con imidacloprid. Imida x2: Macho y hembra tratados.

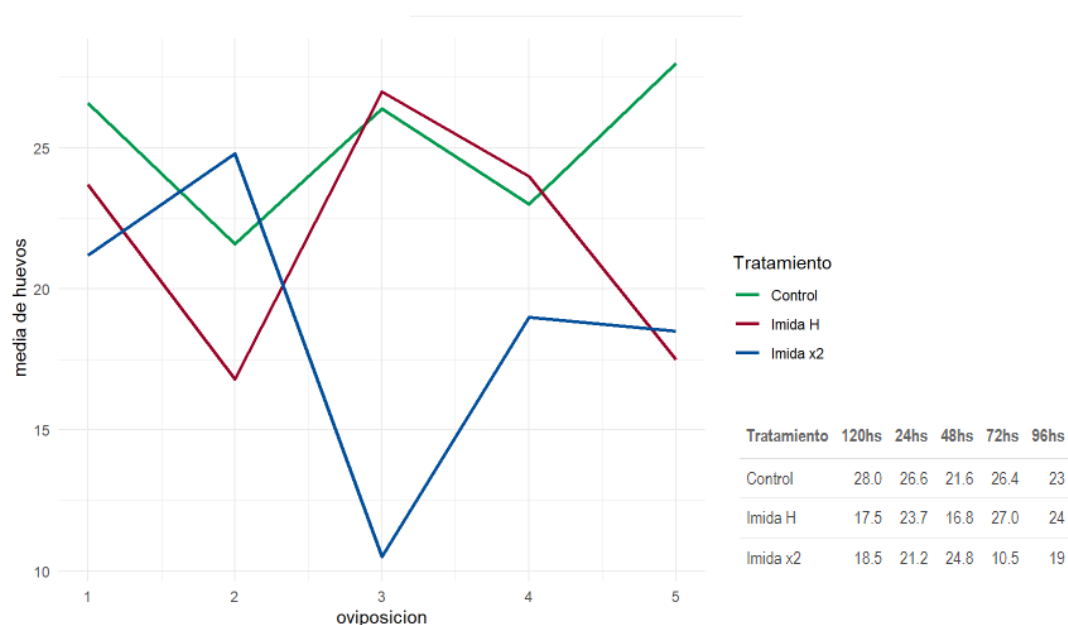


Gráfico 41: Resumen de fecundidad de las parejas de *Chrysoperla externa*. Los individuos fueron tratados en estado de pupa con imidacloprid. Valores medios de huevos puestos cada 24 h analizados por los tres tratamientos realizados. Control: pareja sin tratar. Imida H: solo la hembra fue tratada con imidacloprid. Imida x2: Macho y hembra tratados.

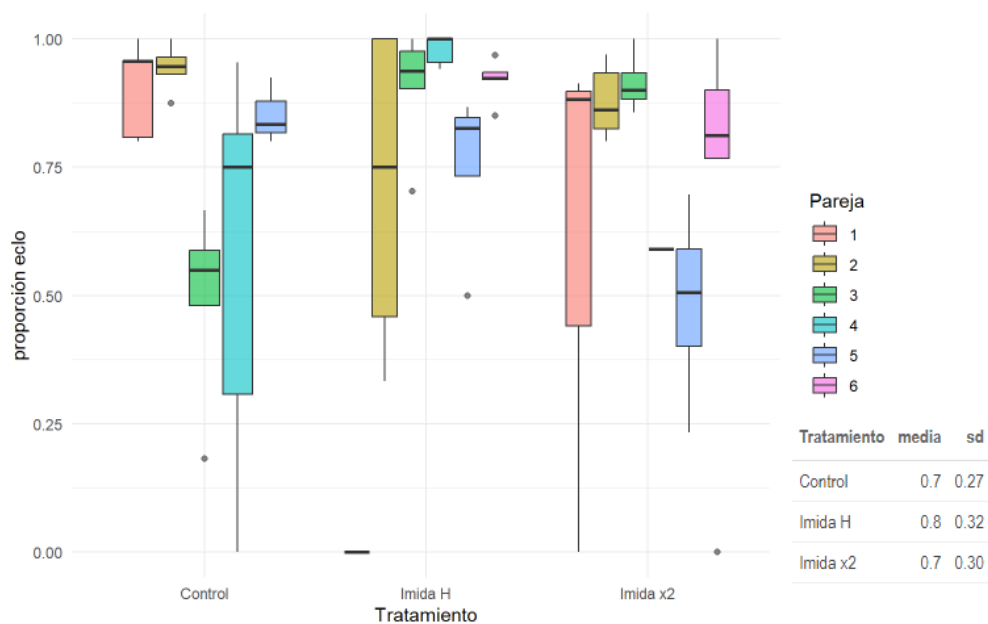


Gráfico 5: Resumen de eclosión de huevos de la F2 por tratamientos y parejas evaluadas de *Chrysoperla externa*. Los individuos fueron tratados en estado de pupa con imidacloprid. Se evaluó la proporción de huevos erosionados sobre los huevos puestos por las parejas. Línea de caja indica valor medio de número de huevos. Asterisco indica valores extremos. Control: pareja sin tratar. Imida H: solo la hembra fue tratada con imidacloprid. Imida x2: Macho y hembra tratados.

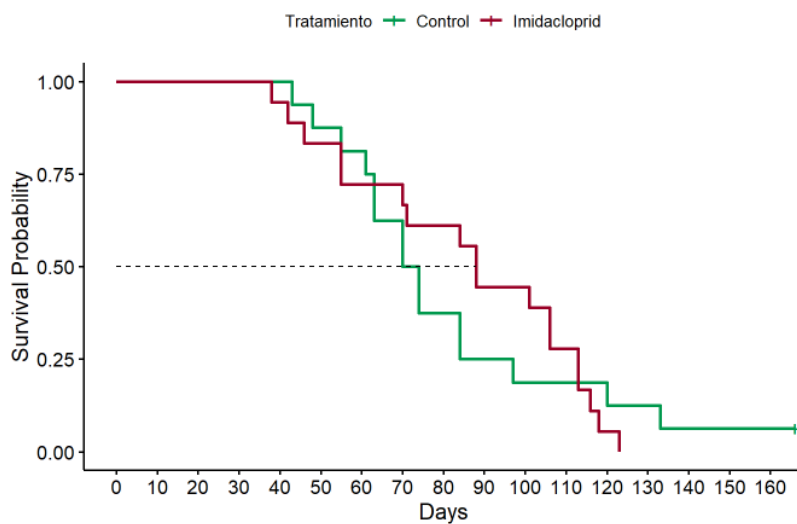


Gráfico 6: Análisis de longevidad (prueba de Kaplan-Meier) de individuos de *Chrysoperla externa* expuestos en el estado de pupas al imidacloprid. La concentración utilizada fue 175 mg i.a/l. Control tratado con acetona 80% (GA). No se encuentran diferencias entre las curvas ($\chi^2 = 0$, $df = 1$, $p\text{-value} = 0.999$).

4.2.2 Toxicidad del imidacloprid (Matrero 35®) sobre tercer estadio larval y estadio prepupa de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae)

Introducción

Chrysoperla externa es ampliamente reconocida por su alto potencial en el control biológico de plagas debido a su destacada capacidad de adaptación, facilidad de producción a gran escala y su distribución en diversos ecosistemas (Giffoni *et al.*, 2007; Valencia Luna *et al.*, 2006). La etapa larval de esta especie constituye su estadio depredador, en el cual las larvas atraviesan tres estadios de desarrollo, aumentando progresivamente su ingesta de alimento. Al finalizar el tercer estadio larval, las larvas suspenden la alimentación, permanecen inmóviles y comienzan a tejer un capullo. Este capullo, compuesto por finos hilos de una sustancia mucoprotéica secretada por los tubos de Malpighi que emergen por la abertura anal, marca el inicio del estadio de prepupa. Después de tres días, las larvas se transforman en pupas de color verde.

El imidacloprid, un neonicotinoide ampliamente utilizado en el control de plagas succionadoras como pulgones y cochinillas, ejerce su acción al unirse agonísticamente a los receptores nicotínicos de acetilcolina postsinápticos (nAChR) en el sistema nervioso central de los invertebrados, compitiendo con el neurotransmisor natural acetilcolina (ACh) (Morrissey *et al.*, 2015). Estudios en abejas han demostrado que la exposición al imidacloprid durante el estadio larval puede afectar la capacidad asociativa de las abejas obreras adultas, con posibles implicaciones a corto plazo en la colonia (Yang *et al.*, 2012). Además, su uso se ha asociado a cambios en el movimiento larval de insectos como *Diaprepes abbreviatus* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae) (Quintela & McCoy, 1998) y a la reducción de poblaciones de *Sympetrum infuscatum* (Selys, 1883) (Odonata: Libellulidae) en arrozales (Jinguji *et al.*, 2012).

En este contexto, algunos estudios realizados en estadios de prepupa de insectos, como *Pemphredon fabricii* (Müller, 1911) (Hymenoptera: Aculeata), han revelado que la exposición al imidacloprid puede afectar la supervivencia individual y conducir al fracaso en la metamorfosis cuando se aplica en este estadio (Heneberg *et al.*, 2020).

Por lo tanto, el objetivo de esta sección es evaluar el impacto del imidacloprid en las larvas del tercer estadio y prepupas de *Chrysoperla externa*.

Materiales y métodos

El material vivo se mantuvo como se detalló en la sección materiales y métodos.

Preparación del material vivo

Se extrajeron de la colonia cartones con huevos de 24 h o menos de puesta, los cuales fueron criados en contenedores plásticos alimentados con áfidos hasta alcanzar el segundo estadio larval. En ese momento, 153 individuos fueron individualizados en cajas de Petri ventiladas, con alimentación diaria de áfidos y dieta artificial, siguiendo el protocolo de Haramboure *et al.* (2016).

Ochenta y nueve individuos fueron separados para el tratamiento en el tercer estadio larval. La aplicación se llevó a cabo a las 48 h de haber mudado, precedida por el pesaje de las larvas. Se realizó un seguimiento hasta la emergencia de los adultos.

Los 64 individuos restantes se separaron para el tratamiento en prepupa. La aplicación tuvo lugar 24 h después de la formación completa del capullo, previo pesaje de los capullos. 24 adultos emergidos fueron sexados bajo la lupa binocular Ahecro modelo ZTX-EC2 y agrupados en parejas para determinar su fertilidad y fecundidad.

Se pudieron completar doce parejas, las cuales se colocaron en cajas cilíndricas de plástico (8,5 cm de diámetro × 9,0 cm de profundidad) para el apareamiento. Los contenedores se cubrieron internamente con cartón oscuro en los costados y con una red en la parte superior para facilitar la identificación, conteo y extracción de los huevos. Los adultos se alimentaron con polen, dieta artificial y agua *ad libitum*. Se realizó un seguimiento de los huevos hasta emergencia de la F2, por ello se contabilizaron las primeras cinco puestas de las parejas.

Los huevos de la F2 con apariencia diferente al patrón normal se deshidrataron siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.1.1 y se montaron en portaobjetos para su mejor observación.

Aplicación de insecticida

Para los ensayos, se empleó el producto comercial Matrero 35®, una formulación líquida de la empresa Nufarm. El principio activo presente es Imidacloprid (35%). La concentración de campo seleccionada fue de 50 cm³/hl (350 cm³/ha) (equivalente a una concentración de 175 mg i.a/l). Las aplicaciones se llevaron a cabo mediante un micro aplicador manual Burkard con gotas de 1 µl. Las larvas se trataron aplicando la gota sobre el dorso, mientras que los capullos recibieron una gota colocada sobre los hilos de seda sin una ubicación específica. Todos los controles fueron tratados con acetona al 80% (GA) siguiendo lo detallado en Schneider *et al.* (2020).

El seguimiento de los individuos se realizó a intervalos de 24 h, evaluando aspectos como la mortalidad, cambios en el comportamiento y posibles problemas en el desarrollo. Se determinó mediante observación directa problemas en las patas al caminar, tanto tics nerviosos, falta de coordinación o inmovilidad. También, por observación directa se determinó la capacidad de las larvas de formar un capullo normal.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron sometidos a análisis mediante el software R. Las evaluaciones de supervivencia se llevaron a cabo mediante pruebas de Kaplan-Meier y test de logrank (Kleinbaum - Klein, 2012). Para los distintos análisis, se aplicaron pruebas de chi-cuadrado con corrección de Yates en aquellos casos que fue necesario.

En cuanto a los análisis de fecundidad y eclosión de la F2, se emplearon modelos GLMM para respuestas de tipo binomial negativa. Estos modelos incluyeron efectos aleatorios definidos por la pareja, utilizando la función de enlace logarítmico. La validación de los modelos se realizó a través de análisis gráfico de residuos la normalidad de los residuos se evaluó con Q-Q plot y se chequeó, mediante distancias de Cook y leverage, la presencia de puntos influyentes (Fox, 2016). (Anexo – Salidas de R para diferentes los modelos). Además, se calcularon los coeficientes de determinación marginal y condicional para evaluar la proporción de varianza explicada por los efectos fijos y ambos efectos, respectivamente.

Para el análisis de fecundidad se considera la respuesta:

$$Y_i = \# \text{huevos con } Y_i \sim \text{Neg Bin y } E(Y_i) = \eta_i$$

Se modela $\log(\eta_i)$ con efecto fijo Tratamiento y efecto aleatorio dado por la pareja.

Para el análisis de eclosión se considera la respuesta:

$$Y_i = \text{\#huevos con } Y_i \sim \text{Neg Bin y } E(Y_i) = \eta_i$$

Se modela $\log(\eta_i)$ con efecto fijo Tratamiento y efecto aleatorio dado por la pareja. Se considera $\log(\text{eclosión})$ como offset.

Se estableció un nivel de significación de referencia del 5% para todos los análisis.

Resultados

Larvas en tercer estadio larval

El peso medio de las larvas fue de 3,56 mg por larva ($de = 0,022$ mg). En el momento de la aplicación del imidacloprid, las larvas exhibieron movimientos erráticos y descoordinación en el movimiento de las patas. En algunos casos, las patas se extendieron por completo, resultando en que las larvas quedaran caídas de costado (Figura 22: A). A las 24 h postaplicación, 45,5% de las larvas tratadas mostraron tics nerviosos en las patas ($X^2 = 8,8$; $df = 1$; $p\text{-valor} = 0,003$). A las 48 h, este valor disminuyó a 36,4% ($X^2 = 10,1$; $df = 1$; $p\text{-valor} = 0,001$), lo que llevó a que solo 40% de las larvas se recuperaran (Gráfico 7). También, pasada las 48h, las larvas comenzaron a mostrar estados de hipoactividad y quietud.

La mortalidad en el estadio larval no presentó diferencias significativas en comparación con las larvas de control ($X^2 = 3,5$; $df = 1$; $p\text{-valor} = 0,062$). La duración del estadio larval tampoco mostró diferencias significativas ($X^2 = 0,5$; $df = 1$; $p\text{-valor} = 0,463$) (Gráfico 8). Las larvas de control tuvieron una media de 3,8 días ($de = 2,51$) en el tercer estadio larval, mientras que las larvas tratadas presentaron valores medios de 5,3 días ($de = 5,45$).

Entre las 48 y 72 h después de la aplicación, los individuos comenzaron a empupar. El 96,9% de los individuos murió en el estado de pupa ($X^2 = 22,9$; $df = 1$; $p\text{-valor} = 1,673 \times 10^{-6}$) (Gráfico 9). En el grupo de control, las larvas formaron capullos normales; sin embargo, en los tratamientos 85% de las larvas exhibieron movimientos erráticos, hilos desordenados, y apelmazados, lo que resultó en la incapacidad de formar un capullo normal en la mayoría de los casos ($X^2 = 26,3$; $df = 1$; $p\text{-valor} = 2,95 \times 10^{-7}$) (Figura 22: C; Gráfico 10). Esto llevó a que, aunque las larvas continuaron su proceso de metamorfosis, el tejido se deshidratara,

adquiriendo la apariencia de una larva seca. Los tejidos comenzaron a necrosarse, culminando en la muerte del individuo.

Aquellos individuos que no experimentaron deshidratación presentaron una metamorfosis incompleta y perecieron en ese estadio. En algunos casos, donde los individuos permanecieron en estado de larva en el lugar de contacto con la gota, se observó una necrosis del tejido (Figura 22: B). Las larvas que lograron formar un capullo, pero no emergieron, fueron abiertas. En algunas muestras, se observaron individuos con el mismo nivel de metamorfosis que las larvas que carecían de capullo. En dos réplicas, se notó la presencia de individuos con cuerpo de larva, pero con los ojos de adulto en el dorso del cuerpo larval (Figura 23 y Figura 24). A través de la guía de estados pupales de la sección 4.1.3 (Ontogenia pupal de *Chysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae)), se determinó que la muerte se produjo durante el cambio de desarrollo de prepupa a pupa, ocurrido en el día 5.

La duración del estado pupal de las larvas tratadas no se vio afectado ($X^2=1,1$; $df=1$; $p\text{-valor} = 0,294$) (Gráfico 11).

Prepupas

El peso medio de los capullos fue 8,2 mg ($de= 0,02mg$). Las prepupas tratadas presentaron la misma tasa de mortalidad que las prepupas control ($X^2=0,2$; $df=1$; $p\text{-valor}= 0,654$). No hubo diferencias significativas en la mortalidad para el estado de preimago ($X^2=0$; $df=1$; $p\text{-valor}= 1$).

Al abrir los capullos de las pupas no emergidas y verificar el estado de los individuos, se observó, según la guía de la sección 4.1.3 (Ontogenia pupal de *Chysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae)), que los individuos murieron en los días 5 y 6 del estado de pupa, presentando una apariencia de adulto y, en algunos casos, ojos compuestos totalmente desarrollados con un aspecto metálico. Las pupas exhibieron necrosis y desintegración de los capullos, sin mostrar signos de deshidratación en los tejidos, los cuales tenían una apariencia acuosa (Figura 22: E y Figura 22: F).

El modelo de fecundidad de las parejas evaluadas reveló diferencias en comparación con el control (Tabla 3). La cantidad media de huevos de las parejas tratadas fue de 3,8 huevos ($de= 7,25$), inferior a la de las parejas control con una media de 9,3 huevos ($de= 7,25$) (Gráfico 12 y Gráfico 13). A lo largo de las cinco puestas evaluadas de diferentes parejas, los controles mostraron un aumento en el número de huevos a medida que avanzaban las horas, a

diferencia de las parejas tratadas, donde la cantidad de huevos se estabilizó y se produjo una disminución en las puestas.

A siempre vista, los huevos de las parejas tratadas presentaron una apariencia deshidratada, bajo lupa se constató que los coriones se encontraban rasgados o rotos y tejidos nutricios reducidos. Además, en algunos casos, los huevos carecían de pedicelo y estaban dispuestos directamente sobre el sustrato (Figura 25).

En cuanto a los huevos viables de la F2, el modelo matemático evaluado indicó diferencias significativas a favor del control. La varianza fue casi nula, por lo que se descartó el efecto aleatorio de la pareja (Tabla 4). Las parejas tratadas depositaron un número inferior de huevos en comparación con los controles y, a su vez, un número muy reducido de esos huevos logró eclosionar. La proporción de huevos eclosionados del control tuvo una media de 0,8 huevos ($de= 0,28$), mientras que en las parejas tratadas esta media fue de 0,2 huevos ($de= 0,42$) (Gráfico 14).

Discusión

El imidacloprid produjo un efecto tóxico significativo en los dos estadios evaluados. En primer lugar, se observan movimientos descoordinados, principalmente en las patas, seguidos de una hipoactividad en las larvas tratadas, datos que concuerdan con hallazgos previamente reportados en abejas por Suchail *et al.* (2004) y Quintela & McCoy (1998). Estos resultados son consistentes con el modo de acción del imidacloprid, que actúa sobre el sistema nervioso.

Aunque la mortalidad en el estadio larval no es elevada, 85% de los individuos enfrentó dificultades para tejer el capullo de protección pupal, lo cual resultó en la muerte. Estos hallazgos son similares a los informados por Gao *et al.* (2018) para el gusano de seda (*Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae)), donde los tratamientos con imidacloprid conducen a una menor producción de seda y capullos más pequeños. Asimismo, se observa un efecto neurotóxico en las arañas tratadas con imidacloprid, manifestado por impedimentos en la coordinación del tejido de la telaraña y cambios en la textura del hilo (Řezáč *et al.*, 2019).

De la totalidad de larvas tratadas, 96.9% muere en dicho estadio o en el subsiguiente, con muy pocos individuos alcanzando la etapa adulta. Este índice de mortalidad coincide con los resultados obtenidos por Serratos-Tejeda *et al.* (2023) en *Chrysoperla carnea* (Stephens, 1836) (Neuroptera: Chrysopidae), donde la aplicación tópica en la larva en el tercer estadio resulta

en una mortalidad de 100% a las 72 h. Nuestros datos coinciden con los informados para larvas de abejas alimentadas con imidacloprid, donde se observa una disminución en la tasa de pupaciones exitosas (Li *et al.*, 2023).

La mortalidad se evidencia tanto en el estadio de larva como en el de prepupa, específicamente en el quinto día, coincidiendo con el periodo normal de metamorfosis de la pupa mediada por la hormona ecdisona. Investigaciones previas han confirmado el deterioro de los tejidos cerebrales en insectos como *Ctenocephalides felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae) (Mehlhorn *et al.*, 1999). En este estudio, como se detalla en la sección 4.2.5, se demuestra que el imidacloprid causa daños en dichos tejidos debido a diversas reacciones desencadenadas por la liberación de especies reactivas de oxígeno. Además, Li *et al.* (2023) han comprobado que en abejas hay una reducción de 20-hidroxiecdisona cuando las larvas se exponen a imidacloprid. Como propuesta para investigaciones futuras, se plantea la hipótesis de que el imidacloprid podría influir en las secreciones de la región posterior del cerebro, conocida como cuerpo cardíaco, afectando la hormona protoracicotrópica (HPTT), precursora de la ecdisona.

El estadio de prepupa facilitó el desarrollo de un mayor número de individuos hasta la etapa adulta en comparación con la larva del tercer estadio, lo que evidencia que el capullo desempeña un papel crucial como barrera contra los pesticidas. El producto pareciera infiltrar por los poros del capullo como lo señala de Fátima *et al.* (2013) pero en concentraciones menos letales que no produjeron la muerte pero sí un daño en la reproducción y en la generación posterior.

El imidacloprid provoca una disminución tanto en la fecundidad como en la fertilidad de las hembras, resultando en huevos carentes de viabilidad. Esta reducción en la fertilidad guarda similitud con los resultados previamente documentados por Garzón *et al.* (2015) en larvas de *C. carnea* expuestas a residuos de flubendiamida y sulfoxaflor.

En resumen, se puede concluir que las larvas expuestas al imidacloprid sufren daños neuronales que resultan en la mortalidad a corto plazo. Cuando el producto se aplica durante el estado de prepupa, donde el capullo brinda protección a la larva inmóvil, se observa un mayor éxito de supervivencia. Sin embargo, esta exposición también conlleva una disminución en la fecundidad, impactando la población en el mediano plazo.

Bibliografía

- de Fátima T., Andrea, Andrade C., Gerardo, Costa, Lenira Viana, & Fonseca M., Valéria. (2013). Selectivity of seven insecticides against pupae and adults of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 39(1), 34-39. Retrieved July 18, 2023, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882013000100006&lng=en&tlng=.
- Fox, J. (2016). **Applied Regression Analysis and Generalized Linear Models**. Third Edition. SAGE Publications.
- Gao, H., Sun, Y., Song, G., Su, B., Zhang, M., Ren, C., & Wang, Y. (2018). Preventive effects of N -acetyl-L -cysteine against imidacloprid intoxication on *Bombyx mori* larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 99(2). <https://doi.org/10.1002/arch.21497>
- Garzón, A., Medina, P., Amor, F., Viñuela, E., & Budia, F. (2015). Toxicity and sublethal effects of six insecticides to last instar larvae and adults of the biocontrol agents *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: chrysopidae) and *Adalia bipunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae). *Chemosphere*, 132, 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.016>
- Giffoni, Jennifer, Valera, Neicy, Díaz, Francisco, & Vásquez, Carlos. (2007). Nota técnica. Ciclo biológico de *Chrysoperla externa* (hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada con diferentes presas. *Bioagro*, 19(2), 109-113. Recuperado en 10 de agosto de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612007000200007&lng=es&tlng=es
- Haramboure, M., Mirande, L., & Schneider, M.I. (2016) Improvement of the mass rearing of larvae of the neotropical lacewing *Chrysoperla externa* through the incorporation of a new semiliquid artificial diet. *BioControl*, 61, 69-78. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9699-7>
- Heneberg, P., Bogusch, P., Astapenkova, A., & Řezáč, M. (2020). Neonicotinoid insecticides hinder the pupation and metamorphosis into adults in a crabronid wasp. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63958-w>
- Jinguji, H., Thuyet, D. Q., Ueda, T., & Watanabe, H. (2012). Effect of imidacloprid and fipronil pesticide application on *Sympetrum infuscatum* (Libellulidae: Odonata) larvae and adults. *Paddy and Water Environment*, 11(1-4), 277-284. <https://doi.org/10.1007/s10333-012-0317-3>
- Kleinbaum, D. , Klein, M. (2012). *Survival Analysis - A Self Learning Text* (Third Edition). Springer.
- Li, Z., Wang, Y., Qin, Q., Chen, L., Dang, X., Ma, Z., & Zhou, Z. (2023). Imidacloprid disrupts larval molting regulation and nutrient energy metabolism, causing developmental delay in honey bee *Apis mellifera*. *eLife*, 12. <https://doi.org/10.7554/elife.88772.2>
- Mehlhorn, H., Mencke, N., & Hansen, O. (1999). Effects of imidacloprid on adult and larval stages of the flea *Ctenocephalides felis* after in vivo and in vitro application: a light- and electron-microscopy study. *Parasitology Research*, 85(8-9), 625-637. <https://doi.org/10.1007/s004360050607>
- Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J. H., Sánchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C., & Liber, K. (2015). Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environment International*, 74, 291-303. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.024>
- Núñez Z., E. (1989). Ciclo biológico y crianza de *Chrysoperla externa* y *Ceraeochrysa cincta*, (Neuroptera, Chrysopidae). *Revista Peruana De Entomología*, 31(1), 76-82. Recuperado a partir de <https://www.revperuentomol.com.pe/index.php/rev-peru-entomol/article/view/904>
- Quintela, E. D., & McCoy, C. W. (1998). Synergistic Effect of Imidacloprid and Two Entomopathogenic Fungi on the Behavior and Survival of Larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Soil. *Journal of Economic Entomology*, 91(1), 110-122. <https://doi.org/10.1093/jee/91.1.110>
- Řezáč, M., Řezáčová, V., & Heneberg, P. (2019). Neonicotinoid insecticides limit the potential of spiders to re-colonize disturbed agroecosystems when using silk-mediated dispersal. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48729-6>
- Serratos-Tejeda, C., Peña, A., Villanueva-Jiménez, J. A., & Aragón-García, A. (2023). TOXICITY OF *Argemone Mexicana* (L.) EXTRACTS AND IMIDACLOPRID ON *Chrysoperla Carnea* (Stephens). *Agrociencia*. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v57i5.2494>
- Schneider, Marcela Inés; Adorno, Andrea; Fogel, Marilina N.; Rimoldi, Federico; Lopez, Silvia N. (2020). Compatibilidad entre el Control Químico y el Biológico. Evaluación de la toxicidad de plaguicidas sobre enemigos naturales. *Control biológico de plagas en horticultura: experiencias argentinas de las últimas tres décadas*. p. 140 - 186
- Suchail, S., Debrauwer, L. and Belzunces, L.P. (2004), Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest. Manag. Sci.*, 60: 291-296. <https://doi.org/10.1002/ps.772>
- Valencia Luna, Luis Aurelio, Romero Nápoles, Jesús, Valdez Carrasco, Jorge, Carrillo Sánchez, José Luis, & López Martínez, Víctor. (2006). Taxonomía y registros de Chrysopidae (Insecta: Neuroptera) en el estado de Morelos, México. *Acta zoológica mexicana*, 22(1), 17-61.
- Yang, E., Chang, H., Wen, W., & Chen, Y. (2012). Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *Plos One*, 7(11), e49472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049472>

Imágenes de la sección

Tabla 3: Random effects y Fixed effects del modelo de fecundidad; $Y_i = \text{\#huevos}$ con $Y_i \sim \text{NegBin}$ y $E(Y_i) = \eta_i$ de huevos puestos por parejas de *Chrysoperla externa* provenientes de prepupas tratadas con imidacloprid con concentración de 175 mg i.a/l. Se modela $\log(\eta_i)$ con efecto fijo tratamiento y efecto aleatorio dado por la pareja.

RANDOM EFFECTS

GROUPS	Variance	Std.Dev.
PAREJA (INTERCEPT)	0.302	0.549
NUMBER OF OBS: 60, GROUPS: PAREJA, 7		

	Estimate	Std.error	z value	Pr (> z)
(INTERCEPT)	2.227	0.319	6.98	3e-12
TRATAMIENTOIMIDA	-1.439	0.490	-2.94	0.0033

Tabla 4: Fixed effects del modelo de eclosión; $Y_i = \text{\#huevos}$ con $Y_i \sim \text{NegBin}$ y $E(Y_i) = \eta_i$ de huevos puestos por parejas de *Chrysoperla externa* provenientes de prepupas tratadas con imidacloprid con concentración de 175 mg i.a/l. Se modela $\log(\eta_i)$ con efecto fijo tratamiento y efecto aleatorio dado por la pareja. Se considera $\log(\text{eclosión})$ como offset.

	ESTIMATE	STD.ERROR	Z VALUE	PR (> Z)
(INTERCEPT)	-0.177	0.066	-2.66	0.0078
TRATAMIENTOIMIDA	-0.462	0.144	-3.19	0.0014

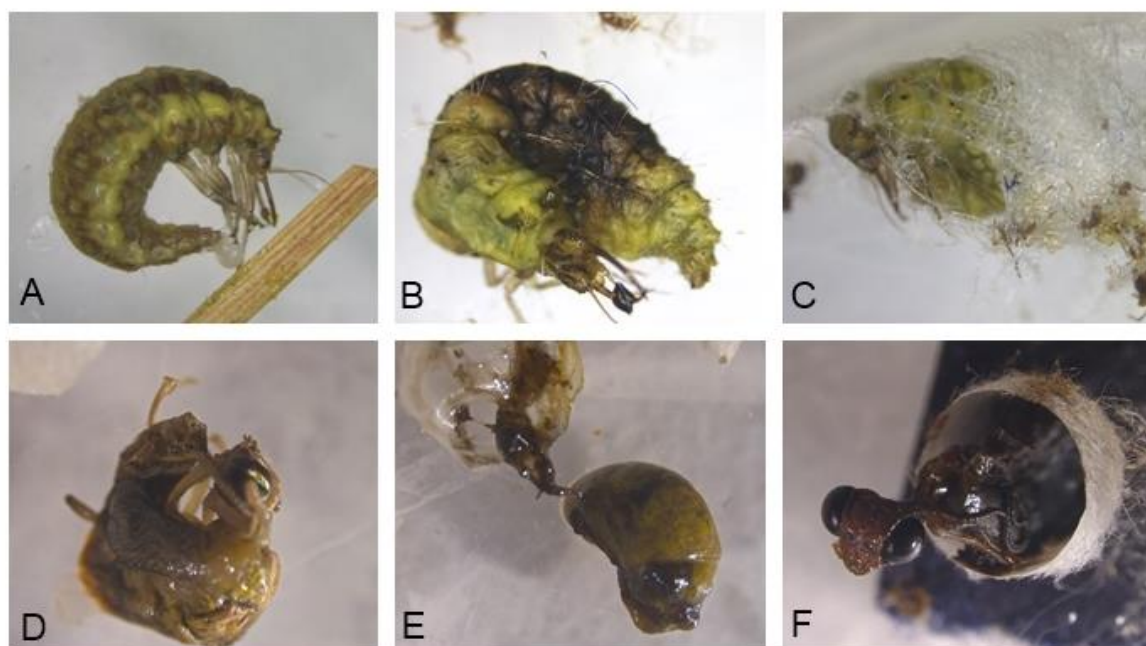


Figura 22. Larvas y pupas de *Chrysoperla externa* tratadas con imidacloprid formula comercial (Matrero 35®). Concentración utilizada: 175 mg i.a/l. A: Larva a 1 h de exposición al imidacloprid. La larva se encontraba viva pero incapaz de movilizarse. B: Larva a las 96 h de aplicación de imidacloprid. C: Larva de 96 h de la aplicación. D: Pupas abiertas a fin de ensayo, imago con tejido necrótico. E: Pupa abierta con imago sin metamorfosis completa a fin de ensayo. F: Pupa abierta imago con metamorfosis completa y necrosado.



Figura 23: Larva de *Chrysoperla externa* tratada con imidacloprid en tercer estadio larval con metamorfosis incompleta, obtenida al abrir el capullo luego de la muerte. El individuo presenta cuerpo de larva y ojos compuestos junto con tórax de adulto. Concentración utilizada: 175 mg i.a/l.

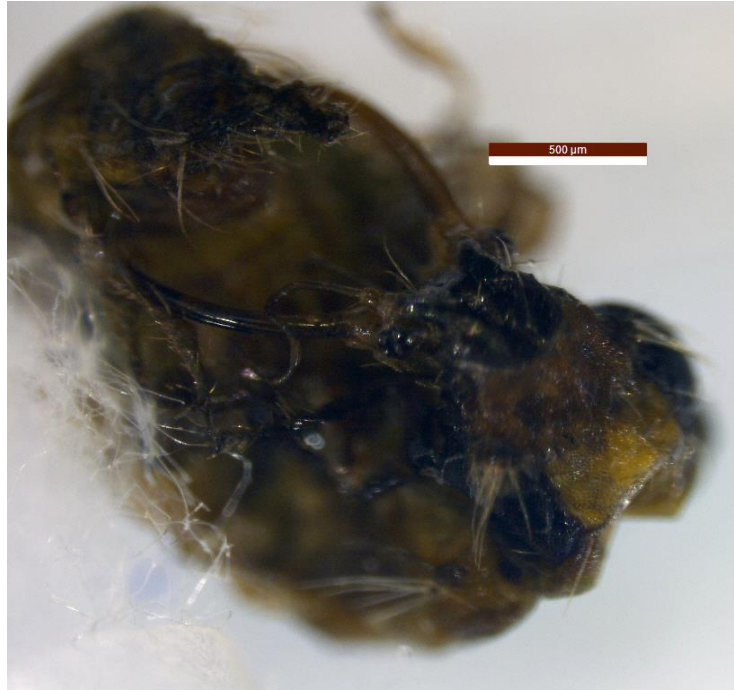


Figura 24: Larva de *Chrysoperla externa* con metamorfosis incompleta tratada con imidacloprid en tercer estadio larval, obtenida al abrir el capullo luego de la muerte. Concentración utilizada: 175 mg i.a/l. El individuo presenta cuerpo y restos de cabeza de larva y parte de cabeza con ojos compuestos de adulto.

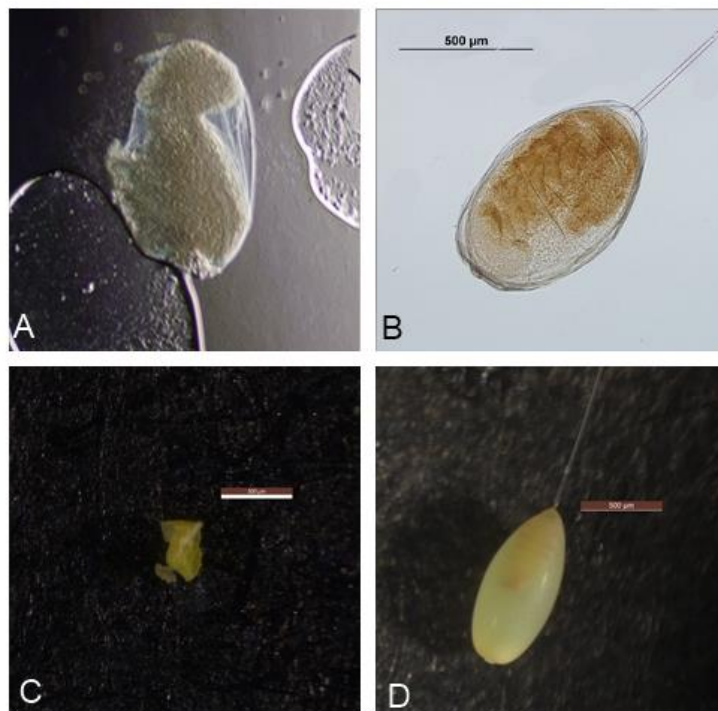


Figura 25: Huevos de F2 obtenidos de adultos de *Chrysoperla externa* tratados con imidacloprid en estadio de prepupa. Concentración utilizada: 175 mg i.a/l. Observación de los huevos a 48 h de la puesta. A: Preparado de microscopia de huevo tratado. B: Preparado de microscopia de huevo control (Igual tamaño de regla para ambas fotografías de microscopia). C: Observación bajo lupa de huevo tratado ovipuesto sobre el sustrato sin pedicelo. D: Observación bajo lupa de huevo control.

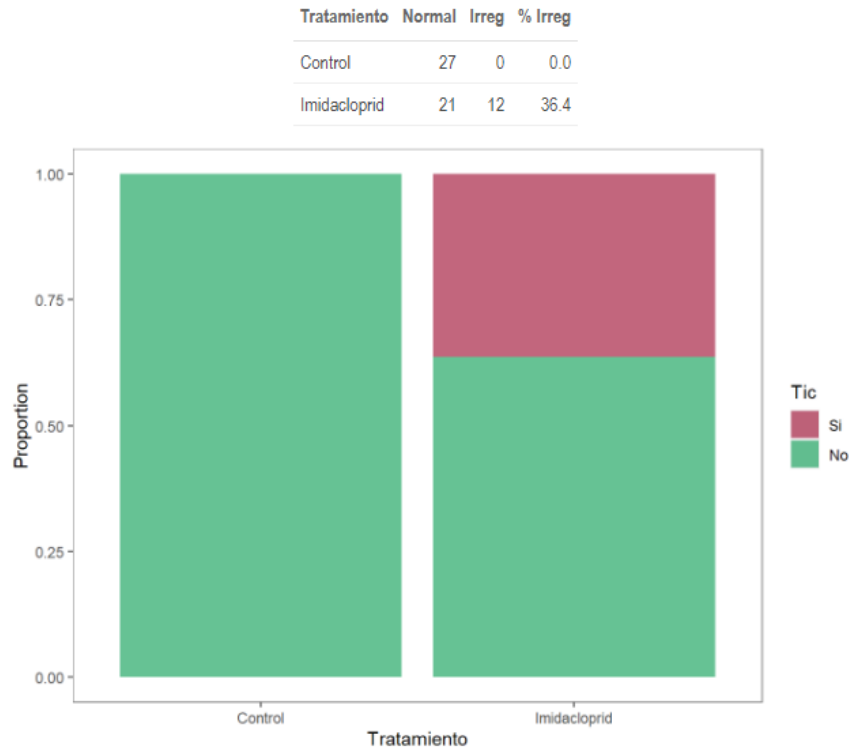


Gráfico 7: Proporción de larvas en tercer estadio de *Chrysoperla externa* que a las 48 h de ser aplicadas con imidacloprid se recuperaron del tic nervioso en patas. Control tratado con agua destilada. Imidacloprid: La Concentración utilizada fue 175 mg i.a/l. Se encuentran diferencias entre tratamientos ($X^2=10.1$; $df=1$; $p\text{-value}=0.001$).

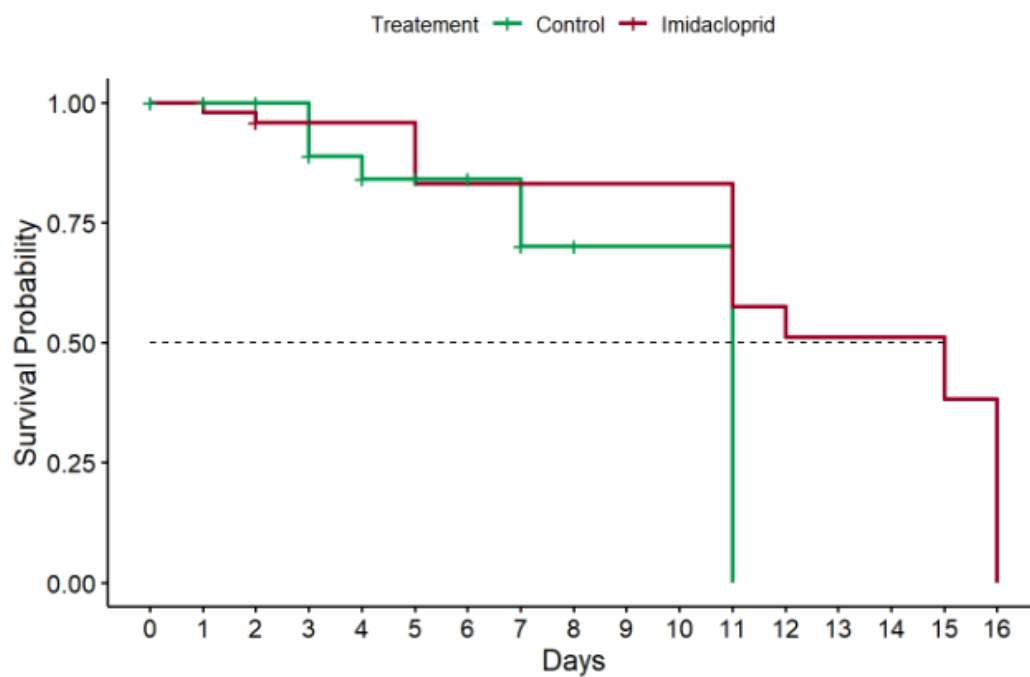
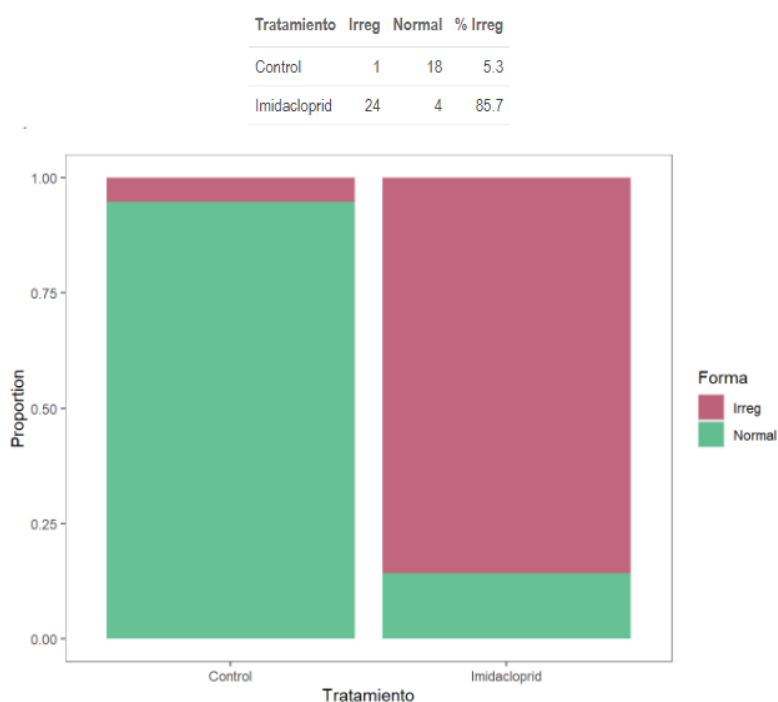
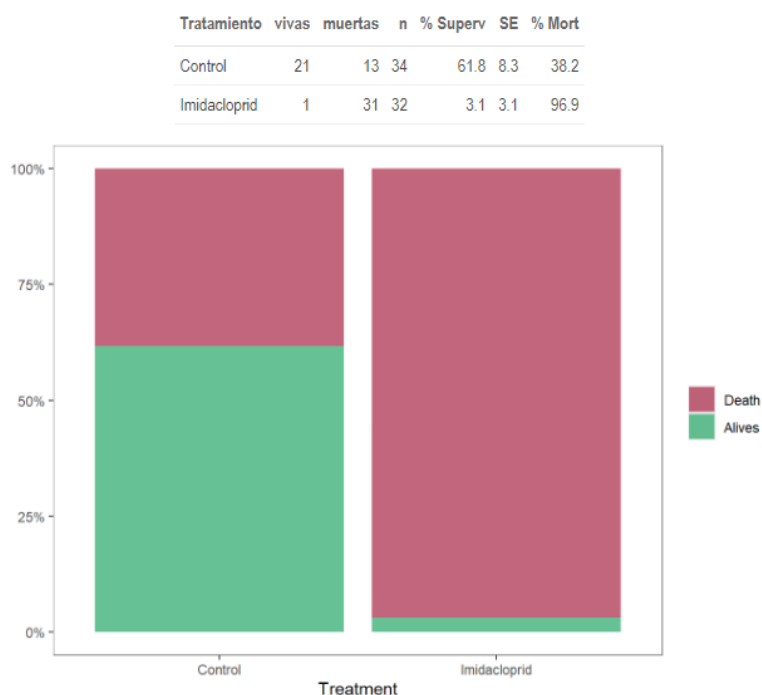


Gráfico 8. Curva de supervivencia (prueba de Kaplan-Meier) de *Chrysoperla externa* en tercer estadio larval cuando las larvas fueron aplicadas con imidacloprid comercial. Control tratado con agua destilada. Imidacloprid: La Concentración utilizada fue 175 mg i.a/l. No existen diferencias significativas entre curvas ($X^2=0.5$; $df=1$; $p\text{-value}=0.463$).



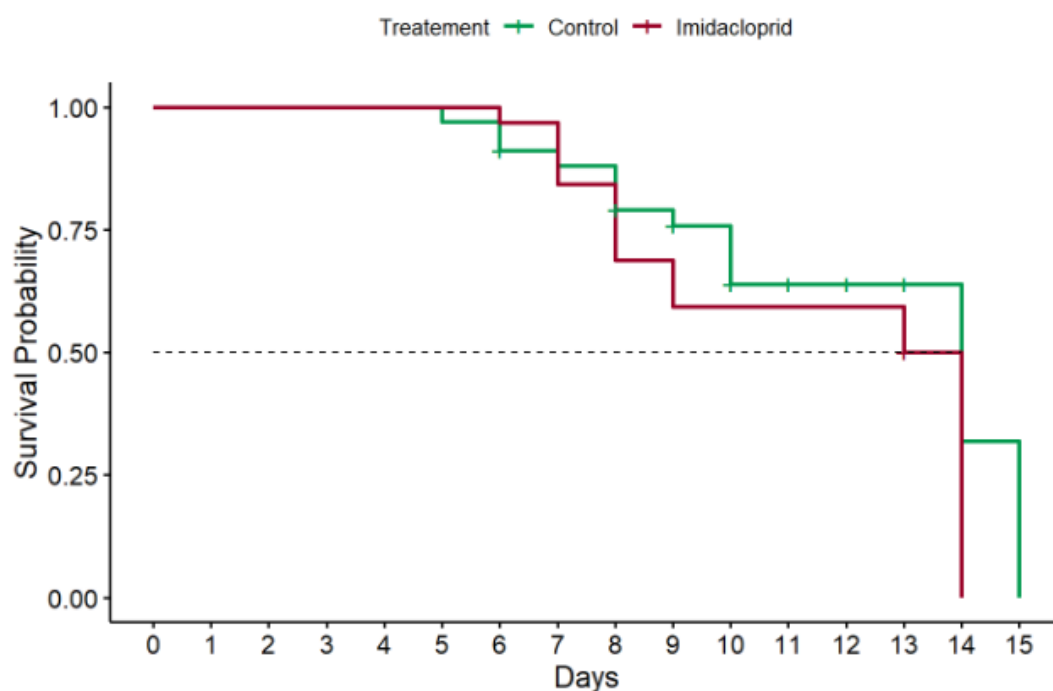


Gráfico 11: Curva de supervivencia (prueba de Kaplan - Meier) de *Chrysoperla externa* en estadio de pupa cuando fue aplicada en tercer estadio larval con imidacloprid. Control tratado con agua. Imidacloprid: la concentración utilizada fue 175 mg i.a/l. No existen diferencias significativas entre curvas ($\chi^2=1.1$; $df=1$; $p\text{-value}=0.294$).

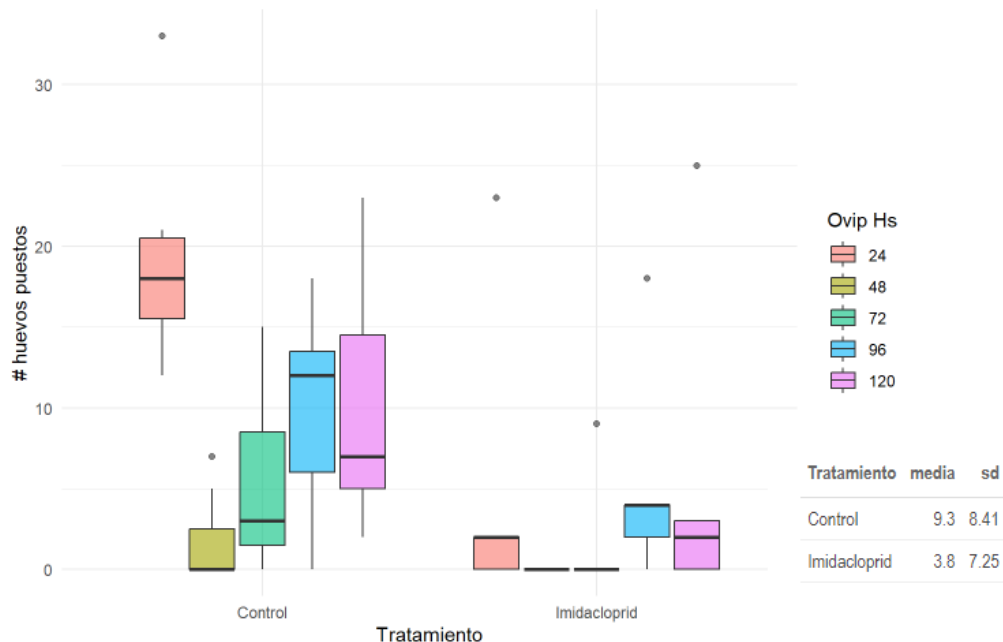


Gráfico 12: Valores medios de huevos puestos por adultos de *Chrysoperla externa* emergidos de prepupas tratadas, separados por tratamiento y hora de evaluación. Control tratado con agua destilada. Imidacloprid: ambos adultos tratados con la concentración de 175 mg i.a/l. Línea de caja indican valor medio de número de huevos. Asterisco indica valores extremos.

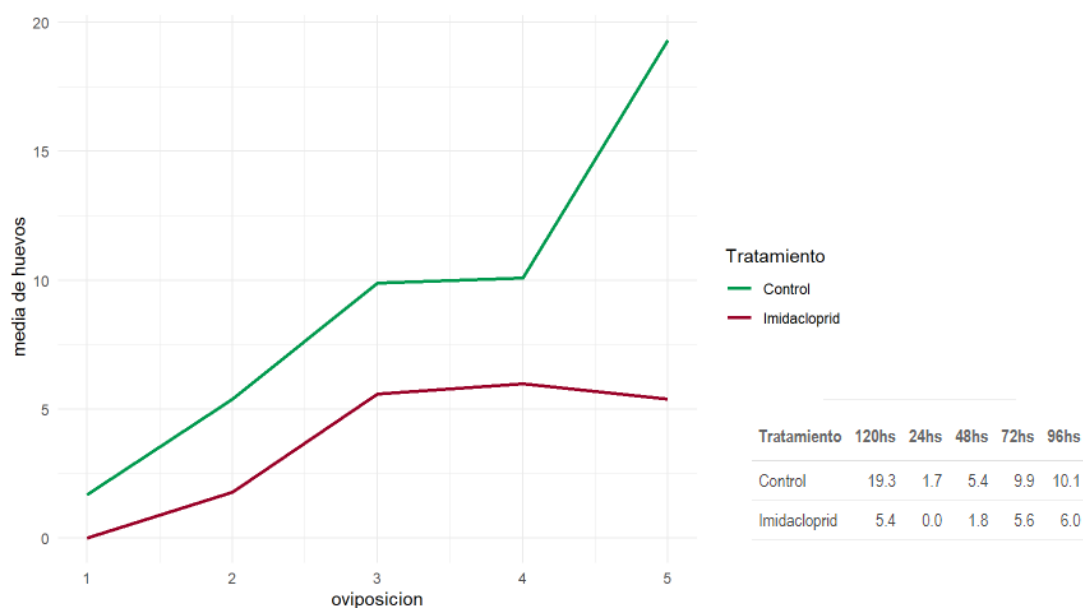


Gráfico 13: Valores medios de huevos puestos por los adultos de *Chrysoperla externa* emergidos de prepupas tratadas con imidacloprid. Control tratado con agua. La concentración utilizada fue 175 mg i.a/l.

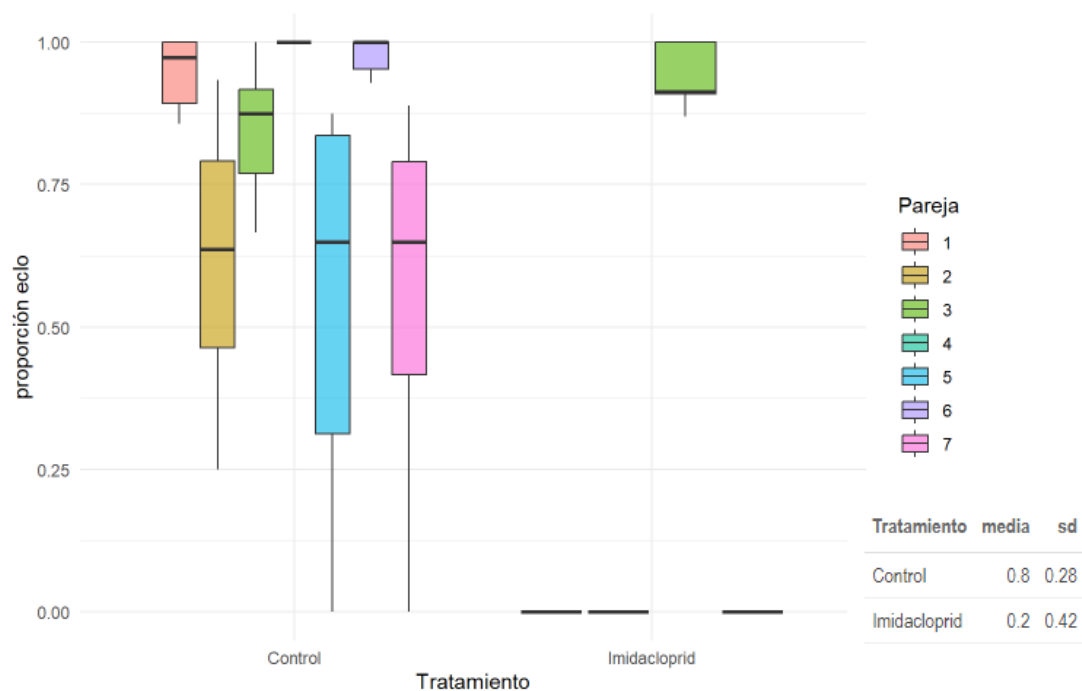


Gráfico 14. Resumen de eclosión de huevos puestos por adultos de *Chrysoperla externa* aplicados en estado de prepupa con imidacloprid, separados por tratamientos y parejas evaluadas. Control tratado con agua. La concentración utilizada fue 175 mg i.a/l. Se evaluó la proporción de huevos eclosionados sobre los huevos puestos por las parejas. Línea de caja indica valor medio de número de huevos. Asterisco indica valores extremos.

4.2.3 Toxicidad del imidacloprid (Confidor OD®) y spirotetramat (Movento®) sobre larvas de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) alimentadas con presas tratadas

Introducción

Chrysoperla externa es un neuróptero de gran importancia en los cultivos agrícolas. Sus estadios inmaduros son activos depredadores de las principales plagas agrícolas, ya que su alimentación comprende áfidos, cóccidos, huevos de lepidópteros e insectos de cuerpo blando (Giffoni *et al.*, 2007; Valencia Luna *et al.*, 2006). Los adultos en cambio presentan una alimentación basada en néctar, polen y melazas (Valencia Luna *et al.*, 2006).

Dadas sus características, se le puede emplear especialmente en sistemas de manejo integrado de plagas (MIP). Dentro del MIP pueden utilizarse diferentes técnicas para el control especies plagas inclusive el uso de pesticidas. Al combinar el uso de depredadores biológicos y aplicaciones químicas, los controladores pueden estar expuestos no solo de forma directa sino alimentarse de individuos que fueron expuestos a los diferentes productos.

El imidacloprid es un insecticida neonicotinoide de amplio espectro que actúa a nivel de sistema nervioso central. Ensayos sobre larvas de *Chrysoperla carnea* a las cuales se alimentaba con presas contaminadas con imidacloprid, determinaron que el 13,89% no pudo pupar y que su periodo larval se acortó (Adane *et al.*, 2023). Existen evidencias de que el consumo de imidacloprid produce impactos a nivel tisular, en diferentes organismos como se ha evidenciado en cortes cerebrales y sistemas digestivos de abejas y peces (Li *et al.*, 2023; Kochetkov *et al.*, 2023).

El spirotetramat es un insecticida de nueva generación el cual es mucho más selectivo que los neonicotinoides. La efectividad del spirotetramat se manifiesta principalmente en los estadios inmaduros, donde se observa una ecdisis incompleta, lo que impide que el insecto pueda desprenderse por completo de su exoesqueleto, obstaculizando, de esta manera, su crecimiento. Se comprobó que las larvas de *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae) mueren en la transición de los estadios larvales por desecaciones en la cutícula lo que favorece a su vez la entrada de otros xenobióticos (Yang *et al.*, 2023).

El objetivo de esta sección fue evaluar supervivencia, desarrollo y fecundidad de larvas de *C. externa* alimentadas con presas (áfidos) tratadas con imidacloprid y spirotetramat.

Materiales y métodos

El material vivo se mantuvo como se detalló en la sección materiales y métodos generales.

Preparación del material vivo y aplicación de insecticidas

En un conjunto de 60 cajas de Petri ventiladas, se ubicó un huevo de *C. externa*, y se llevó a cabo el seguimiento de su desarrollo desde la emergencia hasta alcanzar el segundo estadio larval. Diariamente, se proporcionó alimento compuesto por áfidos y pasas de uva. A las 24 h o menos desde la muda al segundo estadio larval, se procedió a la alimentación con presas tratadas.

Para la experimentación, se escogieron nueve plantas de trigo (*Triticum aestivum* (Linnaeus, 1753) (Poales: Poaceae)) infestadas con áfidos de la especie *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852) (Hemiptera: Aphididae). Se prepararon soluciones de Confidor OD® (principio activo imidacloprid 20%), a una concentración de campo recomendada para cultivos de fruto de 90 cm³/hl (630 cm³/ha) equivalente a una concentración de 180 mg i. a/l; y Movento® (principio activo spirotetramat 15%), a concentración de campo recomendada de 60 ml/hl (420 cm³/ha) equivalente a una concentración de 90 mg i.a/l. Tres plantas fueron rociadas hasta el goteo con cada producto, mientras que otras tres plantas control se asperjaron con agua. Las plantas se mantuvieron bajo campana hasta que los productos se secaron.

Posteriormente, se extrajo de la caja de Petri, los áfidos sin tratar y las pasas de uva, con el fin de garantizar que las larvas se alimentasen solamente de las presas tratadas y se colocaron aproximadamente 20 áfidos tratados por cada caja de Petri. Después de 24 h, se retiraron los restos que pudieron quedar, y se reintrodujo pulgón sin tratar y pasas de uva.

El seguimiento continuo incluyó el registro diario del tiempo de desarrollo y la mortalidad. Al alcanzar el estado adulto, los individuos fueron sexados bajo lupa binocular y emparejados, colocándolos en cajas cilíndricas de plástico (8,5 cm de diámetro × 9,0 cm de profundidad)

para el apareamiento. Los contenedores fueron revestidos internamente con cartón en los costados, sirviendo como soporte para la oviposición y facilitando la identificación, conteo y extracción de los huevos. Los adultos se alimentaron con polen y una dieta artificial según lo indicado por Haramboure *et al.* (2016), además de tener acceso a agua *ad libitum*. Se realizó un seguimiento de la fertilidad, contabilizando las primeras cinco puestas de cada pareja.

Finalmente, los individuos que alcanzaron el estado adulto fueron sacrificados y se llevó a cabo la técnica para la observación histológica detallada en la sección “3.4 Cortes histológicos” de materiales y métodos generales, con el fin de determinar si existían cambios a nivel tisular producto de los tratamientos.

Análisis estadístico

Se llevaron a cabo todos los análisis utilizando el software R. Para evaluar las diferencias globales en proporciones, se aplicaron pruebas de chi-cuadrado. En caso de detectar diferencias significativas, se realizaron comparaciones múltiples entre las proporciones mediante ajuste de Benjamini-Hochberg para el control de los valores p . En situaciones donde la corrección de Yates no fue aplicable, se recurrió a la prueba de Fisher a nivel global, y los análisis post hoc correspondientes también se llevaron a cabo con la prueba de Fisher, aplicando el ajuste de Benjamini-Hochberg a los valores p (Benjamini-Hochberg, 1995).

Para evaluar los tiempos de supervivencia, se empleó curvas de Kaplan - Meier y el test de logrank (Kleinbaum - Klein, 2012). En casos de encontrar diferencias significativas, se realizaron comparaciones múltiples entre pares de grupos mediante el ajuste de Benjamini-Hochberg para controlar los valores p .

En cuanto al tiempo de desarrollo del período inmaduro, se excluyeron los individuos del tratamiento con imidacloprid, ya que solo 3 de ellos sobrevivieron para ser analizados. La comparación entre el grupo de control y el grupo de spirotetramat se llevó a cabo mediante una prueba t .

En modelos con respuesta binomial negativa y un efecto aleatorio atribuido a la hembra, se realizaron comparaciones múltiples utilizando el método de Tukey en caso de que el tratamiento presentara un efecto significativo. Se estableció un nivel de significación de referencia del 5% para todos los análisis.

Resultados

La evaluación del impacto de los tratamientos en el periodo inmaduro de desarrollo reveló diferencias significativas en la mortalidad entre los grupos ($\chi^2 = 17,8$, $df = 2$, $p\text{-valor} = 0,396 \times 10^{-4}$). El tratamiento con imidacloprid exhibió tasas de mortalidad más elevadas en comparación con los individuos tratados con spirotetramat ($p\text{-valor} = 0,013$) y con el grupo de control ($p\text{-valor} < 1 \times 10^{-7}$) (Gráfico 15). En contraste, el spirotetramat mostró tasas de mortalidad similares al grupo de control ($p\text{-valor} = 0,301$). El tiempo de desarrollo medio del periodo inmaduro completo solo pudo ser calculado para los tratamientos control y spirotetramat, dado que solo tres individuos del grupo tratado con imidacloprid llegaron a la etapa adulta. En este caso, no se observaron diferencias significativas en el tiempo medio entre los dos tratamientos evaluados ($T = 0,4$, $df = 26$, $p = 0,719$) (Gráfico 16).

En cuanto al análisis detallado por estadio, la mortalidad en el segundo estadio larval fue similar entre todos los tratamientos (*prueba de Fisher* $p = 0,129$). No obstante, en el tercer estadio larval, el tratamiento con imidacloprid presentó una mayor mortalidad en comparación con el control ($p\text{-valor} = 0,026$), pero tasas similares al spirotetramat ($p\text{-valor} = 0,233$). Este último tratamiento no mostró diferencias significativas con respecto al control ($p\text{-valor} = 0,326$), indicando una mortalidad intermedia entre los tratamientos. En el caso del estadio pupa, solo quedaron ocho individuos en el grupo tratado con imidacloprid, lo que impidió un análisis estadísticamente fiable.

La evaluación de la fecundidad solo pudo realizarse entre el grupo de control y el tratamiento con spirotetramat. Los valores medios de huevos puestos fueron de 19,4 huevos ($de = 4,86$) en las parejas del grupo de control y 7,7 huevos ($de = 7,74$) para las parejas tratadas con spirotetramat (Gráfico 17), revelando diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 5).

En ninguno de los casos se observaron diferencias a nivel histológico entre los organismos tratados. Los ganglios cerebrales de los organismos no mostraron disparidades respecto al grupo de control (Figura 26). Las hembras tratadas con spirotetramat no presentaron diferencias en oocitos ni cuerpos grasos abdominales (Figura 27).

Discusión

La ingestión de larvas contaminadas con imidacloprid induce una elevada tasa de mortalidad. Aunque, en la mayoría de los casos, las larvas del segundo estadio logran mudar, se observa que aquellas alimentadas con presas tratadas con imidacloprid presentan la mayor mortalidad en el tercer estadio larval. Este patrón es coherente con hallazgos previos en *C. carnea*, donde las larvas alimentadas con presas tratadas demostraron valores de mortalidad del 20% en el tercer estadio y tasas de pupación cercanas al 22% (Serratos-Tejeda *et al.*, 2023).

En contraste, las larvas alimentadas con presas tratadas con spirotetramat logran mudar y alcanzar la etapa adulta sin mayores cambios. Este compuesto no revela diferencias significativas ni en la mortalidad ni en el tiempo de desarrollo en ninguno de los estadios. Estos datos, son similares a lo reportado para larvas de *C. carnea* alimentadas con presas contaminada con el insecticida que afecta la muda, tebufenozida, donde no se afectó la mortalidad pero si el tiempo de desarrollo (Suárez-López *et al.*, 2023). Además, estos resultados difieren de estudios sobre *Eretmocerus mundus* (Mercet, 1931) (Hymenoptera: Aphelinidae), donde se observaron reducciones en la longevidad y mortalidad en diferentes etapas (Francesena *et al.*, 2017).

En cuanto a *C. externa* expuesta a spirotetramat, se observan cambios en la fecundidad, contrastando con los resultados en *E. mundus* (Francesena *et al.*, 2017) y *Episyrphus balteatus* (De Geer, 1776) (Diptera: Syrphidae) (Moens *et al.*, 2010). Las variaciones en la cantidad y estado de los huevos concuerdan con hallazgos reportados en *Drosophila melanogaster*; hembras alimentadas con spirotetramat colocaron menos huevos, similar a las reducciones de hasta el 90% en huevos de algunas moscas blancas (Salazar-López *et al.*, 2016)

En *D. melanogaster*, la administración de spirotetramat durante el estado larval resultó una alta mortalidad y dificultades en el desarrollo, a diferencia de los resultados en este estudio.

Los cortes histológicos no revelan daños a nivel del ganglio cefálico en ninguno de los tratamientos, sugiriendo que durante la metamorfosis se produce una reconstrucción total de los posibles tejidos dañados. Además, no se observan diferencias histológicas significativas en los oocitos de las hembras tratadas con spirotetramat, como podría sospecharse en productos de este tipo que actúan a nivel de síntesis de lípidos.

Este estudio establece que el imidacloprid provoca la mortalidad de las larvas que se alimentan de presas tratadas, impidiéndoles completar su desarrollo hasta la etapa adulta. Por otro lado,

las larvas alimentadas con presas tratadas con spirotetramat logran seguir su desarrollo habitual, aunque muestran una disminución en su capacidad reproductiva. En ninguno de los casos se detectan daños histológicos en los adultos.

Bibliografía

- Adane Tesfaye, RD Gautam y Bishwajeet Paul. (2023). Efecto de tres insecticidas sobre la biología de la crisopa verde, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Revista de manejo de plagas de Etiopía*, 9, 63–69. Obtenido de <https://ppseonlinejournal.org/index.php/PMJE/article/view/261>
- Benjamini, Y., Hochberg Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, Vol 57, N°1, 289-300
- Francesena, N., Desneux, N., De Campos, M. R., & Schneider, M. I. (2017). Side effects of spirotetramat on pupae and adults of a neotropical strain of *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Aphelinidae): effects on the life parameters and demography. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(21), 17719-17730. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9400-z>
- Giffoni, Jennifer, Valera, Neicy, Díaz, Francisco, & Vásquez, Carlos. (2007). Nota técnica. Ciclo biológico de *Chrysoperla externa* (hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada con diferentes presas. *Bioagro*, 19(2), 109-113. Recuperado en 10 de agosto de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612007000200007&lng=es&tlng=es
- Haramboure, M., Mirande, L., & Schneider, M.I. (2016) Improvement of the mass rearing of larvae of the neotropical lacewing *Chrysoperla externa* through the incorporation of a new semiliquid artificial diet. *BioControl*, 61, 69-78. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9699-7>
- Kleinbaum, D. Klein, M. (2012). *Survival Analysis - A Self Learning Text* (Third Edition). Springer.
- Kochetkov, N., Smorodinskaya, S., Vatlin, A. A., Nikiforov-Nikishin, D., Nikiforov-Nikishin, A., Даниленко, В. Н., Anastasia, K., Reznikova, D., Grishina, Y. V., Antipov, S., & Марцова, М. В. (2023). Ability of *Lactobacillus brevis* 47f to Alleviate the Toxic Effects of Imidacloprid Low Concentration on the Histological Parameters and Cytokine Profile of Zebrafish (Danio rerio).
- Li, Z., Wang, Y., Qin, Q., Chen, L., Dang, X., Ma, Z., & Zhou, Z. (2023). Imidacloprid disrupts larval molting regulation and nutrient energy metabolism, causing developmental delay in honey bee *Apis mellifera*. *eLife*, 12. <https://doi.org/10.7554/elife.88772.2>
- Moens, J., De Clercq, P., & Tirry, L. (2010). Side effects of pesticides on the larvae of the hoverfly *Episyrphus balteatus* in the laboratory. *Phytoparasitica*, 39(1), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s12600-010-0127-3>
- Salazar-López, N. J., Aldana-Madrid, M. L., Silveira-Gramont, M. I., & Aguiar, J. (2016). Spirotetramat — an alternative for the control of parasitic sucking insects and its fate in the environment. En *InTech eBooks*. <https://doi.org/10.5772/61322>
- Serratos-Tejeda, C., Peña, A., Villanueva-Jiménez, J. A., & Aragón-García, A. (2023). TOXICITY OF *Argemone Mexicana* (L.) EXTRACTS AND IMIDACLOPRID ON *Chrysoperla Carnea* (Stephens). *Agrociencia*. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v57i5.2494>
- Suárez-López, Y. A., Hatem, A. E., Aldebis, H. K., & Osuna, E. V. (2023). Effects of tebufenozide on eggs, larvae and adults of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: chrysopidae). *Insects*, 14(6), 521. <https://doi.org/10.3390/insects14060521>
- Valencia Luna, Luis Aurelio, Romero Nápoles, Jesús, Valdez Carrasco, Jorge, Carrillo Sánchez, José Luis, & López Martínez, Víctor. (2006). Taxonomía y registros de Chrysopidae (Insecta: Neuroptera) en el estado de Morelos, México. *Acta zoológica mexicana*, 22(1), 17-61.
- Yang, J., Flaven-Pouchon, J., Yang, Y., Gehring, N., & Moussian, B. (2023). The greenhouse and field insecticide Spirotetramat differentially affects the surface barrier efficiency in non-target *Drosophila melanogaster*. *Entomologia Generalis*, 43(2), 433–440. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2022/1732>

Imágenes de la sección

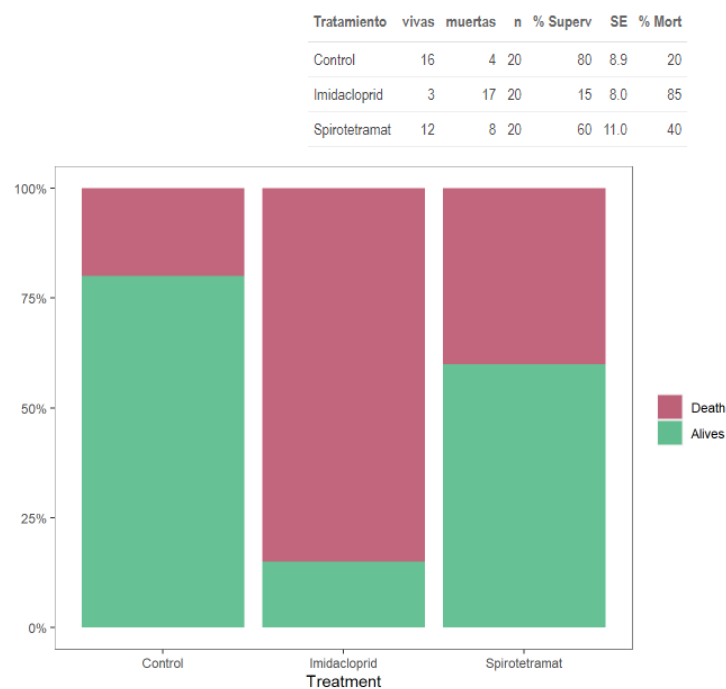


Gráfico 152: Mortalidad a lo largo del desarrollo juvenil de individuos inmaduros de *Chrysoperla externa* alimentados en el segundo estadio larval con presas tratadas. Control: agua destilada. Imidacloprid: concentración 180 mg i.a/l. Spirotetramat: concentración de 90 mg i.a/l. Se diferenciaron por tratamiento ($\chi^2= 17.8$, $df = 2$, $p\text{-value} = 1.396\times10^{-4}$).

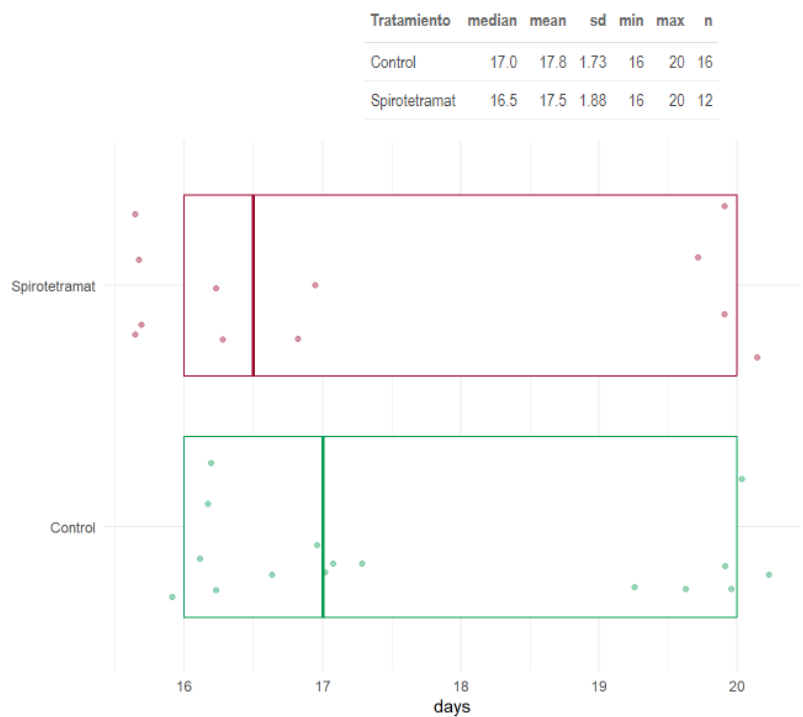


Gráfico 16: Tiempo de desarrollo medio de los estados inmaduros de *Chrysoperla externa* alimentada en el segundo estadio larval con presas tratadas con Spirotetramat. Control: agua destilada. Spirotetramat: 90 mg i.a/l ($T = 0.4$, $df = 26$, $p\text{-value} = 0.719$).

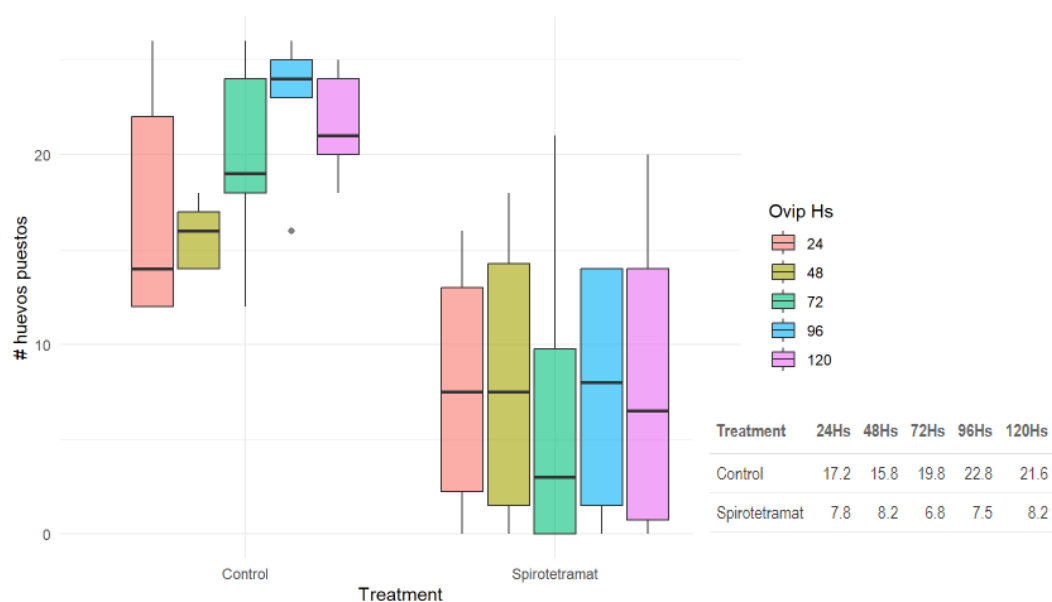


Gráfico 173: Valores de oviposición de adultos de *Chrysoperla externa*, que fueron alimentados con presas tratadas en el segundo estadio larval, separados por tratamiento y hora de evaluación. Control: agua destilada. Spirotetramat: 90 mg i.a/l. Ambos individuos de la pareja fueron tratados. Línea de caja indica valor medio de número de huevos. Asterisco indica valores extremos.

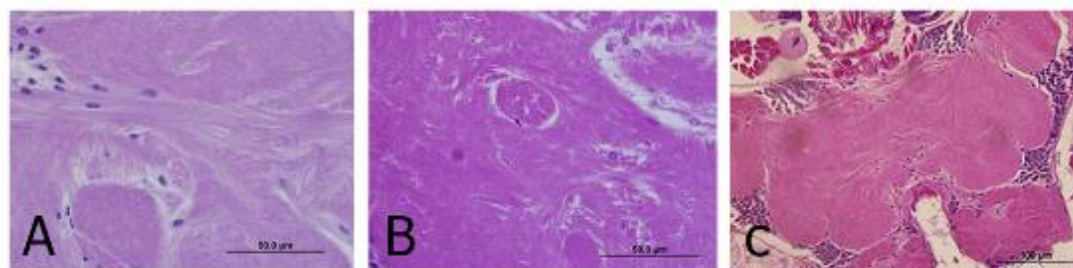


Figura 26: Cortes histológicos de ganglio cefálico de adultos de *Chrysoperla externa*. A: control B: Individuos alimentados en el segundo estadio larval con presas tratadas con spirotetramat a 90 mg i.a/l. C: Individuos alimentados en el segundo estadio larval con presas tratadas con Imidacloprid a 180 mg i.a/l.

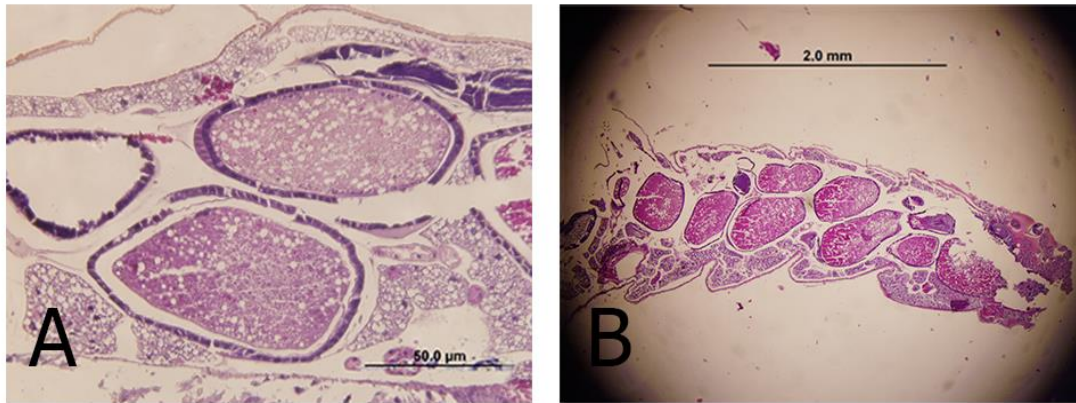


Figura 27: Cortes histológicos de ovarios de hembras adultas de *Chrysoperla externa*. A: control. B: Individuos alimentados en el segundo estadio larval con presas tratadas de spirotetramat a 90 mg i.a/l.

Tabla 5: Random effects y Fixed effects del modelo de fecundidad; $Y_i = \text{\#huevos}$ con $Y_i \sim \text{NegBin}$ y $E(Y_i) = \eta_i$ de huevos puestos por parejas de *Chrysoperla externa* provenientes de larvas alimentas con presas tratadas por spirotetramat a concentración de 90 mg i.a/l. Se modela $\log(\eta_i)$ con efecto fijo Tratamiento y efecto aleatorio dado por la pareja.

RANDOM EFFECTS

GROUPS	Variance	Std.Dev.
PAREJA (INTERCEPT)	0.165	0.406
NUMBER OF OBS: 45, GROUPS: PAREJA, 5		

	Estimate	Std.error	z value	Pr (> z)
(INTERCEPT)	2.999	0.218	13.74	<2e-16
TRATAMIENTOIMIDA	-1.233	0.221	-5.58	2.4e-08

4.2.4 Toxicidad del imidacloprid (Confidor OD®) y del spirotetramat (Movento®) sobre el ciclo de vida de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae)

Introducción

El manejo integrado de plagas se fundamenta en la utilización de diversas estrategias de control, procurando que sean compatibles entre sí. Esta práctica se sustenta en el conocimiento de las interacciones biológicas, así como en información detallada sobre el cultivo y su entorno circundante (Da Costa *et al.*, 2019). A pesar de que el control químico ha sido la técnica principal a nivel global, el control biológico ha ido ganando terreno en años recientes. Su efectividad depende en gran medida de su compatibilidad con otros métodos de control.

Chrysoperla externa, es una especie del orden Neuroptera, reconocida en el ámbito agrícola por su alta eficacia en el control biológico. Sus etapas juveniles se alimentan de plagas como áfidos, cochinillas y moscas blancas, mostrando una notable capacidad de adaptación, facilidad para su cría a gran escala y una amplia distribución en distintos ecosistemas (Giffoni *et al.*, 2007; Valencia Luna *et al.*, 2006).

Para controlar estas plagas, se recurre a productos químicos como el imidacloprid y el spirotetramat. El imidacloprid, un insecticida neonicotinoide, actúa a nivel del sistema nervioso central, mientras que el spirotetramat se dirige a los estados inmaduros, interfiriendo en la ecdisis y evitando que el insecto mude completamente su exoesqueleto, lo que restringe su crecimiento.

Estudios previos en *Chrysoperla carnea* realizados por Serratos-Tejeda *et al.* (2023) y Ayubi *et al.* (2013) demostraron que el imidacloprid afecta la eclosión de huevos, generando elevadas tasas de mortalidad. En cambio, respecto al spirotetramat, aunque no existen informes específicos sobre huevos de *Chrysoperla sp.*, estudios en otras especies indican resultados contrapuestos ya que para especies como *Frankliniella occidentalis* (Pergande, 1895) (Thysanoptera: Thripidae) existen modificaciones en el huevo que afectan la eclosión (Yang *et al.*, 2021) en otras como *Bemisia Tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae) y *Panonychus citri* (McGregor, 1916) (Trombidiformes: Tetranychidae) no se presentan diferencias significativas (Ouyang *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2017).

El objetivo de esta sección fue analizar el efecto del imidacloprid y el spirotetramat sobre los huevos de *Chrysoperla externa*, evaluando no solo la mortalidad, sino también los tiempos de desarrollo en distintos estadios y la fertilidad en etapas adultas.

Materiales y métodos

El material vivo se mantuvo como se detalló en la sección materiales y métodos generales.

Preparación del material vivo y aplicación de insecticidas

Para los bioensayos se utilizó el producto comercial formulado líquido Confidor OD® (imidacloprid 20%) a una concentración de campo recomendada para cultivos de fruto de 90 cm³/hl (630 cm³/ha) equivalente a una concentración de 180 mg i.a/l; y Movento® (principio activo spirotetramat 15%), a concentración recomendada de campo de 60 ml/hl (420 cm³/ha) equivalente a una concentración de 90 mg i.a /l.

Se extrajeron cartones de la colonia que contenían huevos con menos de 24 h de edad. Se asignaron 32 huevos para el grupo de control y 32 más para el tratamiento con spirotetramat. En el caso del imidacloprid, se utilizaron 35 huevos para el grupo control y 95 para el tratamiento, basándose en experiencias previas que evidenciaron una alta mortalidad en los diferentes estadios larvarios al emplear este compuesto.

Los huevos fueron sumergidos durante 15 segundos en 100 ml del producto a la concentración mencionada, mientras que el grupo de control fue sumergido en agua destilada. Posteriormente, se dejaron secar bajo campana de ventilación hasta que estuvieron completamente secos, lo cual tomó aproximadamente 20 min. Luego, fueron colocados en cajas de Petri ventiladas dentro de un bioterio con condiciones controladas. Se llevó a cabo un seguimiento diario de los individuos desde su etapa larval hasta alcanzar la adultez, alimentándolos con áfidos y pasas de uva.

En el caso de aquellos que llegaron a la etapa adulta, fueron sexados bajo una lupa binocular y se emparejaron para la reproducción. Estas parejas se alojaron en cajas cilíndricas de plástico (8,5 cm de diámetro × 9,0 cm de profundidad) designadas para el apareamiento. Dichos contenedores estaban revestidos internamente con cartón oscuro en los costados para facilitar

la observación de la oviposición y permitir la identificación, conteo y recolección de los huevos. Los adultos se alimentaron con polen y una dieta artificial siguiendo los protocolos indicados por Haramboure *et al.* (2016), además de tener acceso ilimitado al agua. Se realizó un seguimiento de la fecundidad de los individuos, incluyendo el conteo de las primeras cinco puestas de cada pareja como parte del estudio.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados mediante software R. Para las evaluaciones de supervivencia se realizaron pruebas de Kaplan-Meier y test de logrank (Kleinbaum - Klein, 2012). Los diferentes análisis se realizaron la prueba de chi-cuadrado con corrección de Yates en aquellos casos que fue necesario. Para los análisis de fecundidad y eclosión de la F2 se realizaron modelos GLMM para tipo de respuesta binomial negativa, con efectos aleatorios dados por la pareja con función de enlace logaritmo. Los modelos se validaron con análisis gráfico de residuos y también se calcularon los coeficientes de determinación marginal y condicional para dar cuenta de la varianza explicada por los efectos fijos y ambos efectos respectivamente.

Para el análisis de fecundidad se considera la respuesta:

$$Y_i = \# \text{huevos con } Y_i \sim \text{Neg Bin y } E(Y_i) = \eta_i$$

Se modela $\log(\eta_i)$ con efecto fijo Tratamiento y efecto aleatorio dado por la pareja.

Para el análisis de eclosión se considera la respuesta:

$$Y_i = \# \text{huevos con } Y_i \sim \text{Neg Bin y } E(Y_i) = \eta_i$$

Se modela $\log(\eta_i)$ con efecto fijo Tratamiento y efecto aleatorio dado por la pareja. Se considera $\log(\text{eclosión})$ como offset.

Resultados

Imidaclopid

Los huevos tratados exhibieron una mortalidad de 54.7%, en comparación con el grupo de control, que registró 8.6% ($\chi^2 = 20.5$, $df = 1$, $p\text{-valor} = 6.021 \times 10^{-6}$). A las 48 h de desarrollo, los huevos mostraron embriones desintegrados o con un aspecto gelatinoso (Figura 28). Esta

situación se repitió en el primer estadio larval, donde el tratamiento presentó una mortalidad significativamente superior al control ($\chi^2= 10,1$, $df = 1$, $p\text{-valor}= 0,001$). En este estadio, los organismos tratados mostraron una supervivencia de 58.1%, en comparación con 93.8% del control. Las curvas de supervivencia en este estadio también presentaron diferencias ($\chi^2= 8,8$, $df = 1$, $p\text{-valor}= 0,003$) (Gráfico 18). Sin embargo, tanto para el segundo estadio larval como para el tercer estadio larval, no se observaron diferencias en la mortalidad con respecto a los datos del control ($\chi^2= 0$, $df= 1$, $p\text{-valor} = 1$ y $\chi^2 = 0,1$, $df = 1$, $p\text{-valor}= 0,727$, respectivamente).

En el estadio pupal, se evidenciaron diferencias de mortalidad entre los tratamientos ($\chi^2= 4,4$, $df = 1$, $p\text{-valor}= 0,036$). Los individuos tratados con imidacloprid presentaron una mortalidad de 57,1%, en comparación con 21,7% del control. Aunque los tiempos de supervivencia no presentaron diferencias significativas ($\chi^2= 0,6$, $df = 1$, $p\text{-valor} 0,444$), el control tuvo una media de 10,4 días (de= 2,925) y los tratamientos de 12,2 días (de= 2,36). De los 95 individuos iniciales tratados, solo 9 emergieron a estado adulto (9,47%) y no se pudieron formar parejas para continuar el análisis.

Spirotetramat

Los huevos tratados con spirotetramat no mostraron diferencias significativas en la mortalidad en comparación con el control ($\chi^2=0$, $df = 1$, $p\text{-valor} = 1$). En el primer estadio larval, las larvas presentaron supervivencias de 93,5% para el control y 78,1% para el tratamiento de spirotetramat, pero las diferencias no fueron significativas ($\chi^2= 1,9$, $df = 1$, $p\text{-valor} = 0,165$). Tanto el segundo estadio larval como el tercer estadio larval no presentaron diferencias en la mortalidad ($\chi^2 = 0$, $df = 1$, $p\text{-valor}= 1$, y $\chi^2= 0,4$, $df = 1$, $p\text{-valor}= 0,532$ respectivamente) respecto al control, ni tuvieron diferencias en los tiempos de desarrollo ($\chi^2= 3,9$, $df = 1$, $p\text{-valor} = 0,048$ y $\chi^2= 1,6$, $df = 1$, $p\text{-valor}= 0,202$, respectivamente).

El estadio pupal, al igual que los anteriores, no presentó diferencias significativas en la mortalidad entre los tratamientos ($\chi^2= 1,3$, $df = 1$, $p\text{-valor} = 0,248$) y variaciones en el tiempo de desarrollo ($\chi^2= 1,8$, $df = 1$, $p\text{-valor} = 0,18$). En este caso, se pudieron formar parejas para evaluar la fecundidad. A lo largo de las primeras 5 puestas, se observaron diferencias significativas entre la cantidad de huevos (Tabla 6). Las parejas control presentaron medias de 18,5 huevos (de= 8,3), y las parejas tratadas 6,0 huevos (de= 7,28) (Gráfico 19).

Discusión

Los resultados señalan que los huevos de *C. externa* tratados con imidacloprid exhibieron una elevada tasa de mortalidad tanto en el estadio de huevo como en el primer estadio larval, en consonancia con lo observado por Rimoldi *et al.* (2017). Estos investigadores también observaron una notable mortalidad entre estos dos estadios en individuos tratados con acetamiprid y piriproxifeno. En cambio, en el caso de endosulfan y cipermetrina, la mortalidad parece concentrarse principalmente en el primer estadio larval, sin afectar la eclosión de los huevos (Rimoldi *et al.*, 2008), a diferencia del imidacloprid, tanto como se informa en este estudio como lo descrito por Serratos-Tejeda *et al.* (2023) y Ayubi *et al.* (2013) sobre *C. carnea*.

Los individuos tratados en estado de huevo que lograron avanzar hasta el estadio de larval tres, experimentaron una alta tasa de mortalidad al intentar alcanzar el estado pupal en comparación con el grupo de control. De hecho, de la población total, solo un reducido número llegó a la etapa adulta.

La aplicación de spirotetramat sobre los huevos no tuvo ningún efecto significativo en cuanto a la longevidad ni la mortalidad, datos similares a los encontrados para la tebufenozida, un insecticida que actúa sobre la muda, sobre los huevos de *C. carnea* (Suárez-López *et al.*, 2023). Esto contrasta con los resultados presentados por Francesena *et al.* (2012) para *Eretmocerus mundus*, donde se observó una disminución en la supervivencia de los adultos bajo esta misma condición de tratamiento. Sin embargo, se registró una alteración en la fecundidad cuando se aplicó spirotetramat a los huevos, situación que difiere de lo observado con spinosad o metoxifenoza, donde no se observaron disparidades significativas (Rimoldi *et al.*, 2008).

En otras palabras, la aplicación de spirotetramat en el estado huevo no interfiere con el desarrollo de los organismos hasta alcanzar la etapa adulta. Sin embargo, al afectar la fecundidad, resulta en una menor producción de huevos y, por ende, una menor cantidad de individuos en la F2.

Ambos productos, al ser aplicados en huevos de *C. externa*, provocan una disminución en el número de individuos. El imidacloprid afecta directamente el desarrollo de la generación F1, mientras que el spirotetramat impacta a los individuos futuros de la generación F2. Además, el spirotetramat permite que los organismos de la F1 se alimenten, lo que resulta en un control biológico más efectivo en comparación con el imidacloprid, que causa una mortalidad inmediata en los primeros estadios. Por lo tanto, los individuos tratados con spirotetramat

tendrían mayores probabilidades de sobrevivir y reproducirse, ya que podrían interactuar con organismos no tratados, aumentando así su fecundidad y éxito reproductivo.

Bibliografía

- Ayubi, A., Moravvej, G., Karimi, J., & Jooyandeh, A. (2013). Lethal effects of four insecticides on immature stages of *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) in laboratory conditions. *Türk. entomol. derg.*, 37(4), 399-407.
- Da Costa, C. A., Guiné, R., Costa, D., Correia, H. E., & Nave, A. (2019). *Pest control in organic farming*. En Elsevier eBooks (pp. 41-90). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813272-2.00003-3>
- Francesena, N., Haramboure, M., Smagghe, G., Stadler, T., & Schneider, M. I. (2012). Preliminary studies of effectiveness and selectivity of Movento on *Bemisia tabaci* and its parasitoid *Eretmocerus mundus*. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 77(4), 727-733.
- Giffoni, Jennifer, Valera, Neicy, Díaz, Francisco, & Vásquez, Carlos. (2007). Nota técnica. Ciclo biológico de *Chrysoperla externa* (hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada con diferentes presas. *Bioagro*, 19(2), 109-113. Recuperado en 10 de agosto de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612007000200007&lng=es&tlng=es
- Kleinbaum, D. , Klein, M. (2012). *Survival Analysis - A Self Learning Text* (Third Edition). Springer.
- Ouyang, Y., Montez, G. H., Liu, L., & Grafton-Cardwell, E. E. (2011). Spirodiclofen and spirotetramat bioassays for monitoring resistance in citrus red mite, *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae). *Pest Management Science*, 68(5), 781-787. <https://doi.org/10.1002/ps.2326>
- Peng, Z., Zheng, H., Xie, W., Wang, S., Wu, Q., & Zhang, Y. (2017). Field resistance monitoring of the immature stages of the whitefly *Bemisia Tabaci* to spirotetramat in China. *Crop Protection*, 98, 243-247. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.04.009>
- Rimoldi, F., Fogel, M. N., Ronco, A. E., & Schneider, M. I. (2017). Comparative susceptibility of two neotropical predators, *Eriopis connexa* and *Chrysoperla externa*, to acetamiprid and pyriproxyfen: short and long-term effects after egg exposure. *Environmental Pollution*, 231, 1042-1050. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.097>
- Rimoldi, F., Schneider, M. I., & Ronco, A. E. (2008). Susceptibility of *Chrysoperla externa* eggs (Neuroptera: chrysopidae) to conventional and biorational insecticides. *Environmental Entomology*. [https://doi.org/10.1603/0046-225x\(2008\)37](https://doi.org/10.1603/0046-225x(2008)37)
- Serratos-Tejeda, C., Peña, A., Villanueva-Jiménez, J. A., & Aragón-García, A. (2023). Toxicity of *Argemone Mexicana* (L.) extracts and imidacloprid on *Chrysoperla Carnea* (Stephens). *Agrociencia*. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v57i5.2494>
- Suárez-López, Y. A., Hatem, A. E., Aldebis, H. K., & Osuna, E. V. (2023). Effects of tebufenozide on eggs, larvae and adults of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: chrysopidae). *Insects*, 14(6), 521. <https://doi.org/10.3390/insects14060521>
- Valencia Luna, Luis Aurelio, Romero Nápoles, Jesús, Valdez Carrasco, Jorge, Carrillo Sánchez, José Luis, & López Martínez, Víctor. (2006). Taxonomía y registros de Chrysopidae (Insecta: Neuroptera) en el estado de Morelos, México. *Acta zoológica mexicana*, 22(1), 17-61.
- Yang, X., GuiYing, Z., Sun, L., & Zheng, C. (2021b). Ovicidal activity of spirotetramat and its effect on hatching, development and formation of *Frankliniella occidentalis* egg. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00160-6>

Imágenes de la sección

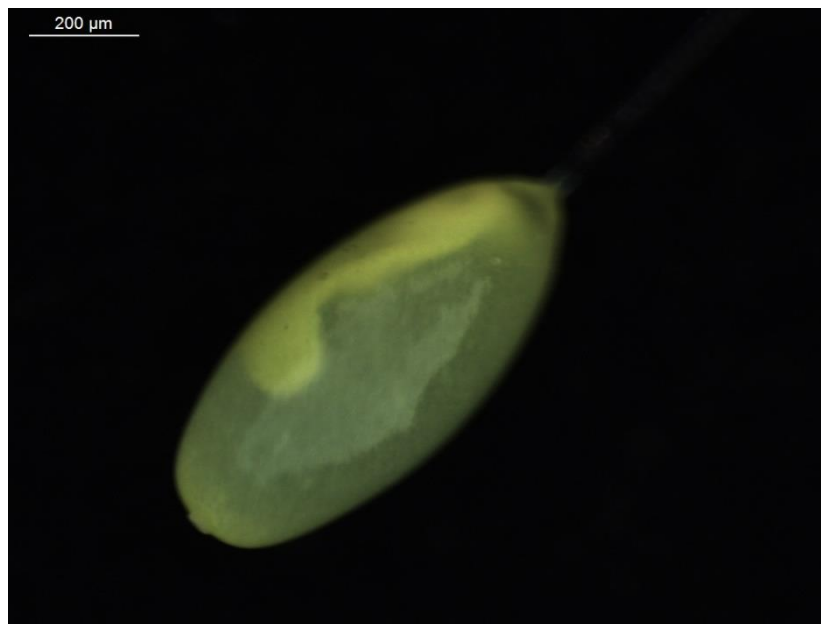


Figura 28: Huevo de *Chrysoperla externa* luego de 24 h de aplicación de imidacloprid. La aplicación se realizó por inmersión. Concentración utilizada 180 mg i.a/l. El huevo presenta 48 h de desarrollo.

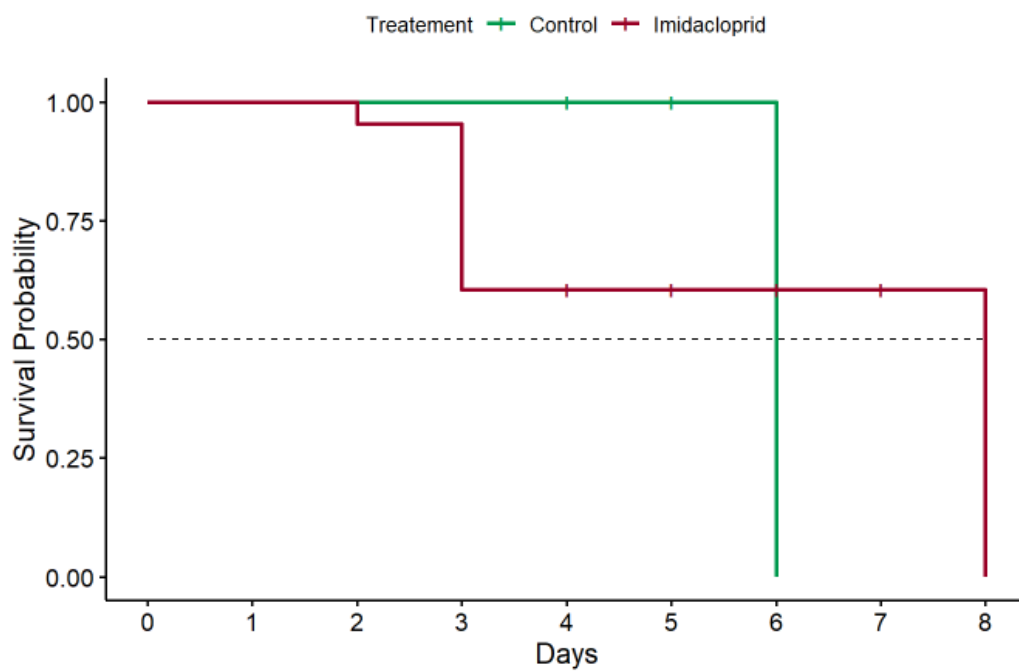


Gráfico 184: Curva de supervivencia (prueba Kaplan - Meier) de *Chrysoperla externa* en primer estadio larval cuando los huevos fueron aplicados a las 24 h con imidacloprid. Control: agua destilada. Imidacloprid: Concentración utilizada 180 mg i.a/l. Existen diferencias significativas entre curvas ($\chi^2 = 8.8$, $df = 1$, $p\text{-value} = 0.003$).

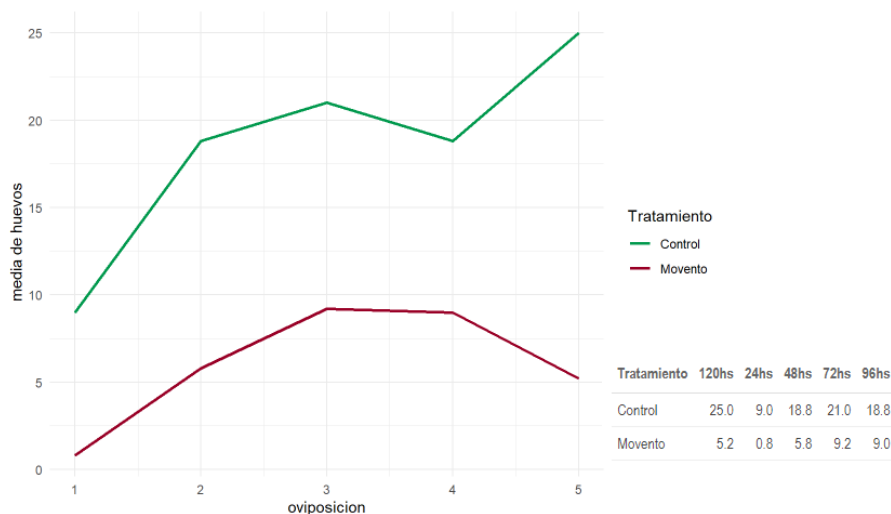


Gráfico 195: Resumen de fecundidad de las parejas evaluadas de *Chrysoperla externa* cuando fueron tratadas en estado de huevo con spirotetramat (Movento). Control: agua destilada. Spirotetramat: 90 mg i.a/l. Ambos individuos de la pareja fueron tratados. Valores medios de huevos puestos cada 24 h analizados por tratamientos.

Tabla 6: Random effects y Fixed effects del modelo de fecundidad; $Y_i = \# \text{huevos}$ con $Y_i \sim \text{NegBin}$ y $E(Y_i) = \eta_i$ de huevos puestos por adultos de *Chrysoperla externa* que fueron tratados con spirotetramat en el estado de huevo a una concentración de 90 mg i.a/l. Se modela $\log(\eta_i)$ con efecto fijo Tratamiento y efecto aleatorio dado por la pareja.

RANDOM EFFECTS

GROUPS	Variance	Std.Dev.
PAREJA (INTERCEPT)	0.047	0.211
NUMBER OF OBS: 45, GROUPS: PAREJA, 5		

	Estimate	Std.error	z value	Pr (> z)
(INTERCEPT)	2.924	0.215	13.58	<2e-16
TRATAMIENTOIMIDA	-1.217	0.354	-3.44	0.00059

4.2.5 Toxicidad del imidacloprid (Confidor OD®) y del spirotetramat (Movento®) por ingestión en adultos *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae)

Introducción

Chrysoperla externa, un neuróptero depredador clave en el control de plagas agrícolas, se caracteriza por su papel depredador durante sus etapas juveniles dentro de su ciclo de metamorfosis completa (Giffoni *et al.*, 2007; Valencia Luna *et al.*, 2006). Los adultos, por otro lado, se alimentan principalmente de néctar, polen y melazas (Valencia Luna *et al.*, 2006).

La variabilidad en su dieta a lo largo de su ciclo de vida resalta la importancia de estrategias agronómicas que, en el marco de un enfoque de manejo integrado de plagas, proporcionen múltiples fuentes de alimentación para prevenir la migración de los adultos fuera de los cultivos. Además, es esencial comprender cómo los métodos de control químico interactúan con los estadios adultos de estos depredadores.

En el contexto del control químico de plagas succionadoras, se utilizan productos como los neonicotinoides, ejemplificado por el imidacloprid, que actúa sobre el sistema nervioso central; y recientemente, se han introducido al mercado productos que afectan las metamorfosis, como el spirotetramat.

El imidacloprid ha sido ampliamente estudiado y se ha documentado que puede causar una mortalidad de hasta 66% en jóvenes adultos de *Chrysoperla carnea* expuestos a sus residuos (Huerta *et al.*, 2003). Incluso en concentraciones menores, aplicadas tópicamente, se ha observado afectación en la ovoposición (Golmohammadi & Hejazi, 2014). Estudios en abejas sugieren que el imidacloprid produce efectos negativos como neurotoxicidad, cambios en el comportamiento, reducción de la inmunidad y esperanza de vida más corta, acompañados de estrés oxidativo (Li *et al.*, 2023). Además, se ha observado en *Chironomus dilutus* (Shobanov, Kiknadze & Butler, 1999) (Diptera: Chironomidae) un aumento intracelular de iones Ca^{+2} inducido por el imidacloprid, lo que lleva a disfunciones en la neurotransmisión normal, alteraciones en el comportamiento y eventual muerte (Wei *et al.*, 2020). Estos impactos se reflejan a nivel tisular, como se ha evidenciado en cortes cerebrales y sistemas digestivos (Li *et al.*, 2023; Kochetkov *et al.*, 2023).

En contraste, aunque existen menos estudios sobre el spirotetramat debido a su reciente introducción en el mercado, se ha observado una reducción en la fecundidad de hembras de insectos como *Drosophila suzukii* (Yang *et al.*, 2023). Sin embargo, investigaciones residuales en adultos de *Chrysoperla carnea* no han revelado modificaciones significativas en mortalidad o fecundidad (Garzón *et al.*, 2015).

Por tanto, esta sección tiene como objetivo evaluar los efectos del imidacloprid y el spirotetramat en adultos de *Chrysoperla externa* cuando se administran por vía ingestión.

Materiales y métodos

El material vivo se mantuvo como se detalló en la sección materiales y métodos generales.

Preparación del material vivo y aplicación de insecticidas

Para los bioensayos se utilizó el producto comercial formulado líquido Confidor OD® (imidacloprid 20%) a dos concentraciones de campo recomendadas de 50 cm³/hl (350 cm³/ha) y 90 cm³/hl (630 cm³/ha), equivalentes a una concentración de 100 mg i.a/l y 180 mg i.a/l, respectivamente; y Movento® (principio activo spirotetramat 15%), a concentración de campo recomendada de 60 ml/hl (420 cm³/ha) equivalente a concentración de 90 mg i.a/l.

Se eligieron 20 individuos por tratamiento, los cuales fueron individualizados cuando tenían 24 h de emergencia y se ubicaron en contenedores cilíndricos de plástico (8,5 cm de diámetro × 9,0 cm de profundidad). Se dispuso un bebedero con el producto a evaluar, mientras que en los controles se utilizó agua destilada. A las 24 h, se retiró el bebedero y se sustituyó por bebederos con acceso ilimitado a agua, junto con la adición de polen y la dieta artificial recomendada por Haramboure *et al.* (2016). Se efectuó un seguimiento de los individuos cada 24 h.

Después de la muerte los individuos que fueron tratados con imidacloprid, se procedió a la extracción de sus cabezas, las cuales se sometieron al proceso de inclusión en parafina de acuerdo con el protocolo detallado en el capítulo titulado "Materiales y Métodos Generales: 3.4 Cortes Histológicos". Este procedimiento se llevó a cabo con el propósito de investigar el daño histológico, el cual había sido previamente documentado en otras especies.

Todos los análisis fueron realizados con software R. Para evaluar las diferencias globales en proporciones, se emplearon pruebas de chi-cuadrado. En situaciones en las que no fue posible aplicar la corrección de Yates, se utilizó la prueba de Fisher a nivel global. En caso de encontrar diferencias significativas, se realizaron comparaciones múltiples de a pares entre las proporciones con el mismo tipo de test que fue usado en el test global aplicando control de false discovery rate (FDR) por método de Benjamini - Hochberg (1995). Los tiempos de supervivencia fueron analizados con curvas de Kaplan - Meier y test de logrank (Kleinbaum - Klein, 2012). En caso de encontrar diferencias en el test global, para el post-hoc se hicieron todas las comparaciones de a pares con control de False Discovery Rate por método de Benjamini - Hochberg (1995).

Resultados

La mortalidad entre los tratamientos mostró diferencias significativas ($\chi^2 = 46,2$, $df = 3$, $p\text{-valor} = 5,192 \times 10^{-10}$). En ambas concentraciones de imidacloprid evaluadas, la mortalidad alcanzó 100% (Gráfico 20), presentando diferencias con el control ($p\text{-valor} < 1 \times 10^{-8}$) y con el spirotetramat ($p\text{-valor} = 0,001$). Por otro lado, aunque el spirotetramat tuvo una mortalidad de 40%, no presentó diferencias respecto al control ($p\text{-valor} = 0,199$).

Estas disparidades se reflejaron también en los tiempos de supervivencia (Gráfico 21), donde se evidenció una marcada diferencia entre las curvas de supervivencia ($\chi^2 = 50,6$, $df = 3$, $p\text{-valor} = 5,889 \times 10^{-11}$). La curva correspondiente a la concentración más alta de imidacloprid mostró diferencias con respecto al control ($p\text{-valor} < 1 \times 10^{-8}$), a la mitad de la concentración de imidacloprid ($p\text{-valor} = 0,003$) y al spirotetramat ($p\text{-valor} = 0,001$), presentando una supervivencia más baja. La supervivencia del spirotetramat no presentó diferencias respecto al control ($p\text{-valor} = 0,078$), pero sí con la mitad de la concentración de imidacloprid ($p\text{-valor} = 0,005$).

Los individuos expuestos al imidacloprid comienzan a manifestar síntomas a las 3 h de la aplicación, como temblores en las patas y alas, inactividad, movimientos lentos y una disminución en la actividad de vuelo, síntomas que persisten hasta el momento de la muerte.

Los cortes histológicos revelaron notables disparidades en comparación con los organismos de control. En las cabezas de los individuos que habían consumido imidacloprid, se observaron diferencias significativas en la textura del ganglio cefálico. El tejido mostró una elevada cantidad de vacuolas en la región continua del ganglio, lo que le confirió una apariencia similar a la del polietileno expandido (Figura 29). Todos los organismos evaluados presentaron el mismo tipo de apariencia en toda la extensión del ganglio.

Discusión

El impacto del imidacloprid en los individuos adultos fue notable por su alta tasa de mortalidad. Informes anteriores también han señalado una alta mortalidad en *C. carnea* cuando la exposición es por ingestión (Serratos-Tejeda *et al.*, 2023).

Los síntomas de neurotoxicidad, manifestados rápidamente y extendidos hasta 96 h, reflejan hallazgos consistentes con informes previos sobre este compuesto en abejas. En el caso de las abejas, se observa una fase inicial de intoxicación marcada por temblores, los cuales gradualmente disminuyen, dejando a las abejas en un estado de actividad reducida. Esta secuencia sugiere que los primeros indicios de neurotoxicidad están principalmente asociados al imidacloprid, mientras que, tanto el compuesto como sus metabolitos tóxicos pueden contribuir a la mortalidad de las abejas, ya sea con o sin presencia residual de imidacloprid (Suchail *et al.*, 2004). Además, el imidacloprid también redujo la actividad de los tipúlidos (*Tipula* sp. (Linnaeus, 1758) (Diptera: Tipulidae)), lo que en entornos naturales puede resultar en un aumento de la mortalidad debido a la depredación o la susceptibilidad al arrastre por corrientes (Kreutzweiser *et al.*, 2008). También se observó un impacto en la actividad y comportamiento de *Chironomus dilutus*, atribuido a desequilibrios en los niveles de calcio (Wei *et al.*, 2020). En nuestros ensayos, algunos individuos exhibieron un comportamiento similar a las abejas, y reducción de actividad como los tipúlidos, mientras que otros tuvieron temblores que persistieron hasta la muerte.

Los daños observados en el ganglio cerebral fueron similares a los encontrados por Mehlhorn *et al.* (1999) en *Ctenocephalides felis* con un aumento notables de vacuolas y pueden estar vinculados al daño mitocondrial inducido por el imidacloprid. Este daño resulta en un aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, conllevando a la acumulación de especies reactivas de oxígeno, generando no solo daño al ADN, sino también la activación de procesos de apoptosis

y, en última instancia, la muerte celular (Wei *et al.*, 2020). Asimismo, se han observado daños cerebrales relacionados con el imidacloprid en ratas expuestas a concentraciones bajas y de manera continua, lo que provoca la muerte celular y la formación de gránulos en el cerebro (Abdelhafez *et al.*, 2023).

Es importante resaltar que en el estudio titulado en la sección 4.2.3 “Toxicidad del imidacloprid (Confidor OD®) y spirotetramat (Movento®) sobre larvas de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) alimentadas con presas tratadas” se observó que en los cortes cerebrales de los adultos que sobrevivieron tras la exposición de imidacloprid durante su estado larvario no mostraron daños significativos en comparación con el grupo de control. Estos resultados fueron notoriamente diferentes de los hallazgos presentados en los cortes cerebrales de los adultos que fueron alimentados con imidacloprid. Esto sugiere que durante el proceso de metamorfosis de los insectos que sobrevivieron, el sistema nervioso podría experimentar una regeneración completa, contrarrestando así los posibles daños previamente causados por las especies reactivas de oxígeno mencionadas.

Por otro lado, la ingesta de spirotetramat no tuvo efecto en la mortalidad de los individuos, lo cual concuerda con los hallazgos de Yang *et al.* (2023) para *Drosophila melanogaster*, que sugiere que los adultos podrían presentar mecanismos de detoxificación de este principio activo. Estos resultados contrastan con los hallazgos reportados por Francesena *et al.* (2012) para *Eretmocerus mundus*, donde se observó una disminución en la supervivencia de los adultos cuando el tratamiento se aplicaba en este estadio.

En resumen, se puede afirmar que la ingestión de imidacloprid por parte de los adultos de *C. externa* resulta en daños internos rápidos e irreversibles, afectando tejidos como el ganglio cefálico, y provocando temblores e inactividad que conducen rápidamente a la muerte. Por otro lado, las ingestiones de spirotetramat no parecen tener efectos mortales a corto plazo.

Bibliografía

Abdelhafez, H. E. D. H., Hammam, F. M., El-Dahshan, A. A., AboDallam, H., & Guo, J. (2023). Imidacloprid induces neurotoxicity in albino male rats by inhibiting acetylcholinesterase activity, altering antioxidant status, and primary DNA damage. *Journal of Toxicology*, 2023, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2023/4267469>

Benjamini, Y., Hochberg Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, Vol 57, N°1, 289-300.

Francesena, N., Haramboure, M., Smagghe, G., Stadler, T., & Schneider, M. I. (2012). Preliminary studies of effectiveness and selectivity of Movento on Bemisia tabaci and its parasitoid Eretmocerus mundus. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 77(4), 727-733.

Garzón, A., Medina, P., Amor, F., Viñuela, E., & Budia, F. (2015). Toxicity and sublethal effects of six insecticides to last instar larvae and adults of the biocontrol agents *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) and *Adalia bipunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae).

Chemosphere, 132, 87–93.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.016>

Giffoni, Jennifer, Valera, Neicy, Díaz, Francisco, & Vásquez, Carlos. (2007). Nota técnica. Ciclo biológico de *Chrysoperla externa* (hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada con diferentes presas. *Bioagro*, 19(2), 109-113. Recuperado en 10 de agosto de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612007000200007&lng=es&tlng=es

Golmohammadi, G., & Hejazi, M. J. (2014). Toxicity and side effects of three insecticides on adult *Chrysoperla carnea* (Neu.: Chrysopidae) under laboratory conditions. *Journal of Entomological Society of Iran*, 33(4), 23-28.

Huerta, A., Medina, P., Castañera, P., & Viñuela, E. (2003). Residual effects of three modern pesticides on adult *Chrysoperla carnea* (Stephens) adults under laboratory conditions. *IOBC wprs Bulletin*, 26(10), 165-170.

Kleinbaum, D. , Klein, M. (2012). *Survival Analysis - A Self Learning Text*. Third Edition. Springer.

Kochetkov, N., Smorodinskaya, S., Vatlin, A. A., Nikiforov-Nikishin, D., Nikiforov-Nikishin, A., Даниленко, B. H., Anastasia, K., Reznikova, D., Grishina, Y. V., Antipov, S., & Марцова, M. B. (2023). Ability of *Lactobacillus brevis* 47f to Alleviate the Toxic Effects of Imidacloprid Low Concentration on the Histological Parameters and Cytokine Profile of Zebrafish (*Danio rerio*). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12290. <https://doi.org/10.3390/ijms241512290>

Kreutzweiser, D.P., Good, K.P., Chartrand, D.T. *et al.* Toxicity of the Systemic Insecticide, Imidacloprid, to Forest Stream Insects and Microbial Communities. *Bull Environ Contam Toxicol* 80, 211–214 (2008). <https://doi.org/10.1007/s00128-007-9347-8>

Li, Z., Wang, Y., Qin, Q., Chen, L., Dang, X., Ma, Z., & Zhou, Z. (2023). Imidacloprid disrupts larval molting regulation and nutrient energy metabolism, causing developmental delay in honey bee *Apis mellifera*. *eLife*, 12. <https://doi.org/10.7554/elife.88772.2>

Mehlhorn, H., Mencke, N., & Hansen, O. (1999). Effects of imidacloprid on adult and larval stages of the flea *Ctenocephalides felis* after in vivo and in vitro application: a light- and electron-microscopy study. *Parasitology Research*, 85(8-9), 625-637. <https://doi.org/10.1007/s004360050607>

Serratos-Tejeda, C., Peña, A., Villanueva-Jiménez, J. A., & Aragón-García, A. (2023). Toxicity of Argemone Mexicana (L.) extracts and imidacloprid on *Chrysoperla Carnea* (Stephens). *Agrociencia*. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v57i5.2494>

Suchail, S., Debrauwer, L. and Belzunces, L.P. (2004), Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest. Manag. Sci.*, 60: 291-296. <https://doi.org/10.1002/ps.772>

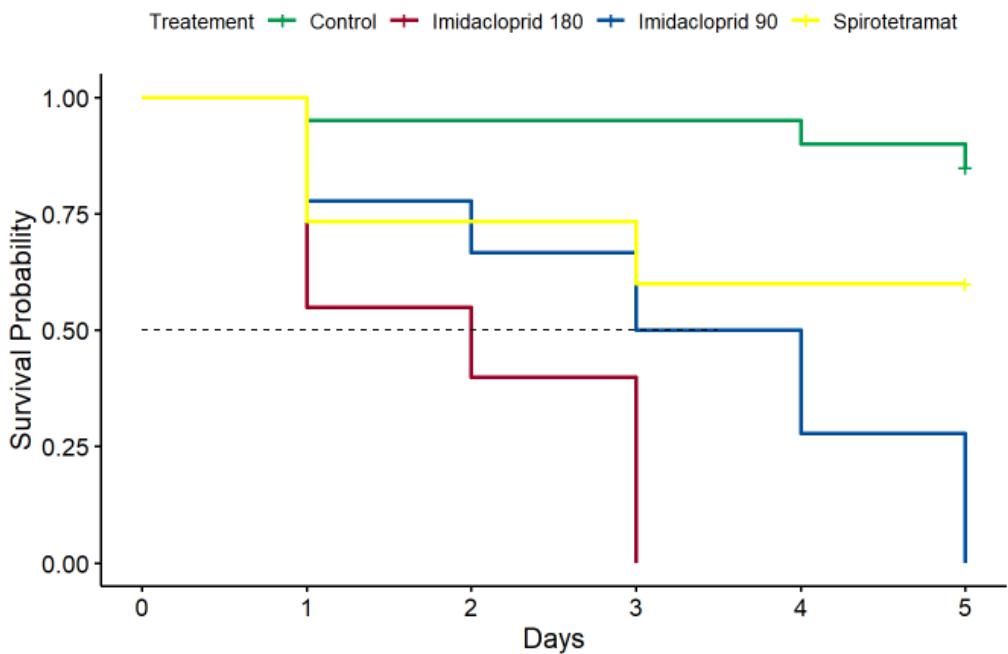
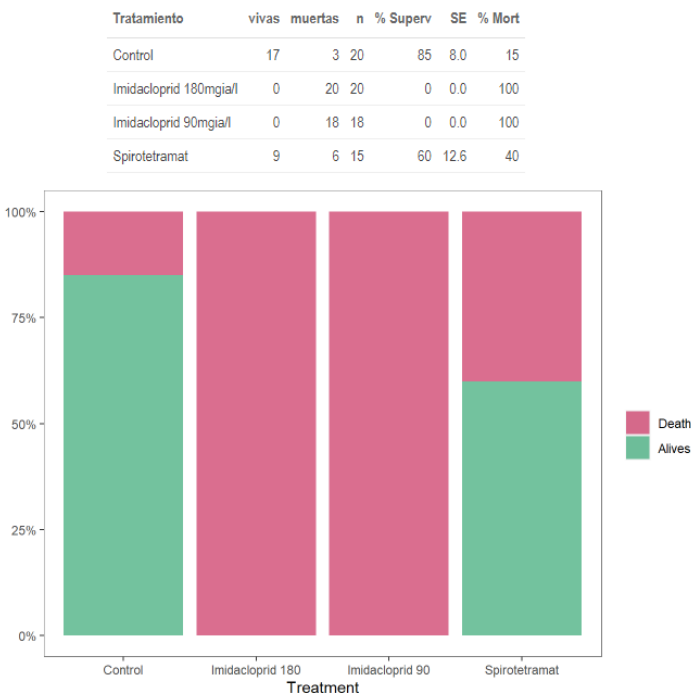
Valencia Luna, Luis Aurelio, Romero Nápoles, Jesús, Valdez Carrasco, Jorge, Carrillo Sánchez, José Luis, & López Martínez, Víctor. (2006). Taxonomía y registros de Chrysopidae (Insecta: Neuroptera) en el estado de Morelos, México. *Acta zoológica mexicana*, 22(1), 17-61.

Wei, F., Wang, D., Li, H., Xia, P., Ran, Y., & You, J. (2020). Toxicogenomics provides insights to toxicity pathways of neonicotinoids to aquatic insect, chironomus dilutus. *Environmental Pollution*, 260, 114011. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114011>

Yang, J., Flaven-Pouchon, J., Wang, Y., & Moussian, B. (2023). Spirotetramat reduces fitness of the spotted-wing *Drosophila*, *Drosophila suzukii*. *Insect Science*. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13283>

Yang, J., Flaven-Pouchon, J., Yang, Y., Gehring, N., & Moussian, B. (2023). The greenhouse and field insecticide Spirotetramat differentially affects the surface barrier efficiency in non-target *Drosophila melanogaster*. *Entomologia Generalis*, 43(2), 433–440. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2022/1732>

Imágenes de la sección



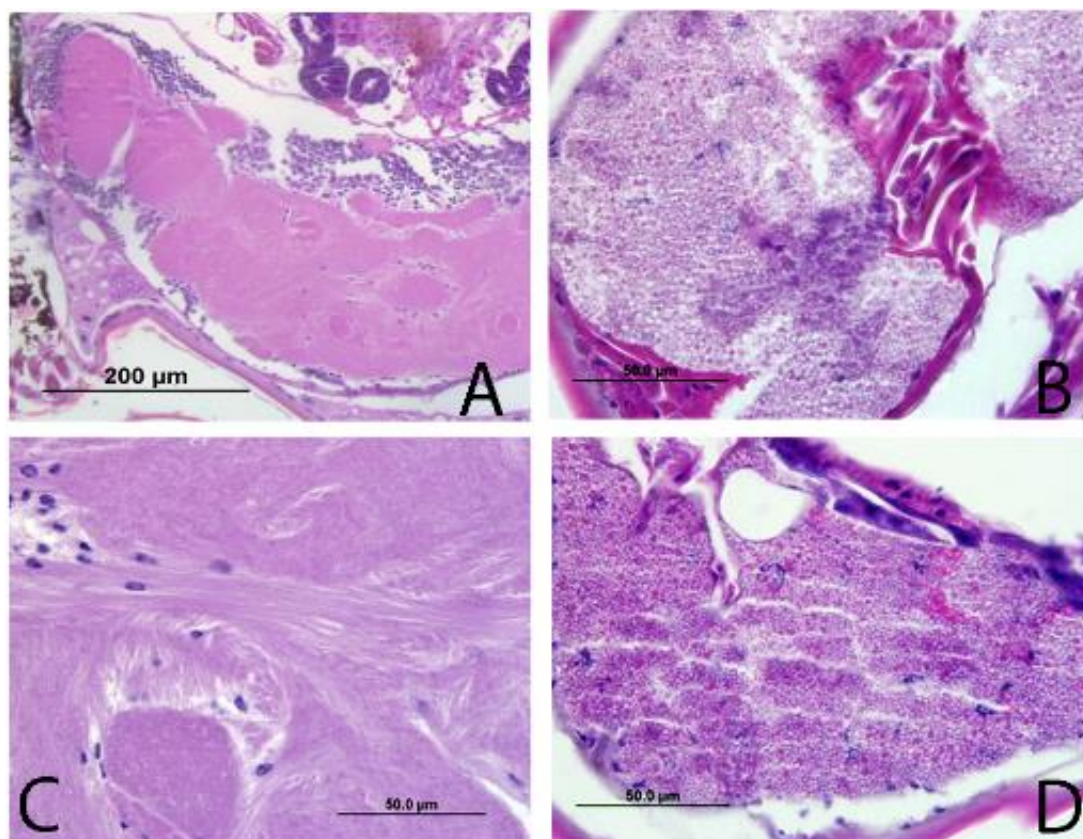


Figura 29: Cortes histológicos de cerebros de adultos de *Chrysoperla externa*. A: vista general del ganglio cefálico control. C: vista en detalle del ganglio cefálico control. B: vista en detalle de ganglio cefálico de adultos de *Chrysoperla externa* expuestos a los insecticidas a través del agua de beber en estado adulto a concentración de 180 mg i.a./l. D: detalle de lóbulo óptico de cerebro de adulto de *Chrysoperla* que ingirieron imidacloprid en estado adulto a concentración de 180 mg i.a./l.

4.3 Resultados De Estudios Genotóxicos



En este capítulo se plantea la resolución de los objetivos específicos:

- Estudiar la citotoxicidad y genotoxicidad del imidacloprid y spirotetramat sobre *C. externa*.
- Utilizar el ensayo cometa como herramienta de diagnóstico para evaluar la genotoxicidad de los insecticidas comerciales con imidacloprid y spirotetramat en células provenientes de huevos de la especie *C. externa*.

En los ensayos que involucraron insecticidas, se utilizaron exclusivamente formulaciones comerciales en todos los casos. En este texto se nombra la molécula activa como sinónimo del formulado analizado con el fin de hacer más llevadera la redacción. Sin embargo, es relevante destacar que en ninguno de los ensayos se empleó la molécula pura.

4.3.1 Evaluación de la toxicidad de imidacloprid (Confidor OD®) en *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) mediante ensayo cometa

Introducción

El ensayo cometa es una herramienta que permite analizar el daño que produce en el ADN los diferentes genotóxicos tanto *in vivo* como *in vitro* (López *et al.*, 2012). Este ensayo, en el último tiempo ha tomado interés por la facilidad del estudio de interacciones de la acción de los xenobióticos sobre diferentes organismos (Augustyniak *et al.*, 2016).

Chrysoperla externa es una especie de gran relevancia económica, por ser en su estado larval depredador de las principales plagas agrícolas. Presenta una distribución neotropical y de alta aparición espontánea en los cultivos de Argentina. Por su facilidad de cría controlada, se producen muy bien en biofábricas (Souza & Souza Bezerra, 2019).

Una de las presas principales son los áfidos, los cuales son insectos succionadores que atacan todo tipo de plantas, principalmente en la zona templada causando daños físicos y transmisiones de virus de alta importancia en las plantas cultivadas (Loxdale *et al.*, 2020). Las

plagas succionadores tienen un manejo convencional apoyado por el uso de neonicotinoides, los cuales representan el 25% del mercado mundial de insecticidas (Bass *et al.*, 2015).

Los neonicotinoides son la clase química de insecticidas que actúan a nivel del sistema nervioso central, activando de manera persistente los receptores nicotínicos provocando la sobreestimulación de la sinapsis. Esto origina una hiperexcitación, parálisis y posterior muerte (Puricelli & Arregui, 2008). Dado que su sitio de acción no es especie-específica su uso en el ambiente produce que la presencia de ciertos enemigos naturales, como las crisopas puedan verse afectado directa e indirectamente.

El daño sobre el ADN inducido por imidacloprid analizado con ensayo cometa ya fue determinado para el pez tilapia de río, y la lombriz colorada (*Eisenia fetida*) (Ansoar-Rodríguez *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016) pero no existen ensayos de este tipo para pruebas en controladores biológicos de plagas. Estos organismos son de suma importancia en el agroecosistema por su rol ecológico.

El objetivo de este estudio fue analizar la genotoxicidad del imidacloprid sobre el agente de control biológico *C. externa* a nivel de ADN utilizando el ensayo cometa como biomarcador ecotoxicológico. Es relevante resaltar que esta técnica fue utilizada por primera vez para este organismo bajo exposición a insecticidas en laboratorio.

Materiales y métodos

El material vivo se mantuvo como se describió en la sección materiales y métodos generales.

La puesta a punto del ensayo cometa se realizó como se describió en la sección materiales y métodos generales.

Aplicación de insecticida

Para los bioensayos se utilizó el producto comercial formulado Confidor OD® (imidacloprid 20% ia, LS, Bayer CropScience, S.L Argentina). Se utilizaron las dos concentraciones de campo más recomendadas de este insecticida para el control de plagas en cultivos de hortalizas en Argentina (CASAFA, 2023).

Para los bioensayos, se seleccionaron concentraciones de campo de 50 cm³/hl (350 cm³/ha) y 90 cm³/hl (630 cm³/ha), equivalentes a una concentración de 100 mg i.a/l y 180 mg i.a/l, respectivamente. Además, se empleó agua destilada como solvente para la preparación de las soluciones de insecticida. Se extrajeron de los recipientes plásticos de las colonias de *C. externa* cartones con huevos de crisopa de menos de 24 h, eligiendo al azar cartones para cada tratamiento. Los huevos seleccionados se sumergieron en soluciones Confidor OD® durante 15 s, mientras que los controles se trataron únicamente con agua destilada.

Posterior a la aplicación, los cartones con huevos se mantuvieron bajo campana hasta su total secado y se dispusieron en cajas de petri ventiladas en un bioterio a 25 ± 5°C, 70% ± 5% de humedad relativa y bajo fotoperiodo L:O 16:8 hasta la preparación de las pruebas de cometas.

Variables evaluadas

Los huevos fueron tratados únicamente a las 24 h de edad, lo que significa que se realizó una sola aplicación. Las evaluaciones se llevaron a cabo a las 48 h de desarrollo del huevo (24 h después de la aplicación), ya que es el momento en que el embrión comienza a manifestarse dentro del huevo. La segunda evaluación se realizó a las 96 h de desarrollo (72 h después de la aplicación), momento en el cual el embrión ya está completamente formado (Fernández Acevedo *et al.*, 2022 y Capítulo 4, Sección 4.1.1). Los tratamientos fueron clasificados según la edad de desarrollo y la concentración de aplicación a la que fueron expuestos.

Análisis de imágenes y estadístico

El cálculo del índice de daño (ID) se llevó a cabo de manera manual, siguiendo el procedimiento detallado por Collins (2004). Se realizaron 10 observaciones por tratamiento, y en cada una se contabilizaron 100 nucleoides, lo que resultó en un total de 1000 nucleoides por tratamiento. Los nucleoides fueron categorizados en cinco grados según el nivel de daño, como se ilustra en la Figura 30. A cada cometa se le asignó un valor entre 0 y 4, y el cálculo del DI se realizó mediante la fórmula (Collins, 2004):

$$ID = \frac{(1xNd1 + 2xNd2 + 3xNd3 + 4xNd4)}{\text{Total de cometas observados}}$$

Donde Nd representa el número de cometas de cada grado.

En cuanto al cálculo del porcentaje de daño de ADN (%DNA damage), se empleó la relación de áreas entre la cola y la cabeza del cometa (Figura 31), utilizando la fórmula adaptada de *OpenComet* (2013):

$$\% DNA damage = \frac{\text{Área de cola}}{(\text{Área de cola} + \text{área de cabeza})} \times 100$$

Para el cálculo de longitud de cola en μm se realizaron mediciones directas con software.

Las mediciones de ambas variables fueron contabilizadas en 100 nucleoides por tratamiento y medidas mediante el software ImageJ.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R. Para evaluar las medidas propuestas, aunque cada medida tuvo un diseño bifactorial, la cantidad de muestra en cada celda no fue la misma. Además, encontramos datos heterocedásticos; por lo tanto, se aplicó un modelo de permutación ANOVA (Kabacoff, 2022). Se utilizó eta cuadrado (η^2) como medida del tamaño del efecto. Los análisis post hoc se realizaron mediante comparaciones por pares, con valores de p ajustados mediante el método de Sidak ($p < 0.05$).

Resultados

El índice de daño (ID) no mostró interacciones estadísticas entre las variables evaluadas. El ID en las muestras tratadas para ambos tiempos de desarrollo fue muy superior al del control (Gráfico 22). Estas diferencias estuvieron marcadas por el tratamiento ($F=67,11$; $Df=2$; $p\text{-valor} < 1 \times 10^{-8}$) y no por el tiempo de desarrollo del huevo ($F=0,01$; $Df=1$; $p\text{-valor} = 0,905$). El η^2 para el tratamiento llega a 0,63, es decir, el 63% de la diferencia en el ID se explica por el producto aplicado.

En las comparaciones entre diferentes tratamientos, el control mostró diferencias tanto con la concentración más baja como la más alta ($p\text{-valor} < 1 \times 10^{-8}$). El ID tendió a tener mayor diferencia que el control a menor concentración, influenciado por la alta proporción de daño a las 48 h de desarrollo. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las concentraciones con respecto al daño causado ($p\text{-valor} = 0,62$).

El porcentaje de daño presentó valores medios crecientes con respecto a la concentración independientemente del tiempo de desarrollo, siendo el valor más alto los huevos a las 96 h de desarrollo que corresponde a la concentración más alta de imidacloprid (75,8%, $de=27,70$) (Gráfico 23).

Hubo interacción entre el tratamiento y la edad de desarrollo en cuanto al porcentaje de daño ($F=13,53$; $Df=2$; $p\text{-valor}= 2,1 \times 10^{-6}$). Al igual que en los parámetros anteriores, el porcentaje de daño estuvo influenciado principalmente por el tratamiento con imidacloprid ($\eta^2 =0,52$) y no por la edad de desarrollo del huevo ($\eta^2 =0,03$).

Los huevos de 48 h de edad presentan un mayor porcentaje de daño en ambos tratamientos con imidacloprid respecto a los huevos control ($p\text{-valor} < 1 \times 10^{-8}$) pero no entre la concentración evaluada ($p\text{-valor}= 0,266$). Los huevos de 96 h de desarrollo no sólo presentaron mayor porcentaje de daño en los tratados con imidacloprid ($p\text{-valor} < 1 \times 10^{-8}$), sino que además, entre concentraciones a mayor principio activo, el daño aumenta ($p\text{-valor} < 1 \times 10^{-8}$). Los 180 mg/l de imidacloprid producen un mayor porcentaje de daño en huevos con 96 h de desarrollo que en huevos con 48 h de desarrollo ($p\text{-valor}= 1,3 \times 10^{-4}$), es decir, la variable aumentó con el tiempo.

El parámetro de longitud de la cola de los cometas presenta una interacción entre las variables evaluadas. La evaluación del daño en el ADN a través de la longitud de la cola de los cometas mostró que tanto las concentraciones de imidacloprid analizadas como los tiempos de desarrollo de los huevos causaron variaciones en la longitud de la cola ($F = 33,93$; $df = 2$; $p\text{-valor} < 1 \times 10^{-8}$) (Gráfico 24).

A la concentración más baja analizada, la longitud de la cola fue mayor en los huevos a las 48 h de desarrollo, con una media de 35,2 μm ($de= 8,81 \mu m$) (siguiendo el patrón C de la Figura 30) que en los huevos a las 96 h de desarrollo con 18,7 μm ($de= 12,17 \mu m$) (siguiendo un patrón B de la Figura 30) (Gráfico 2). A la concentración más alta de imidacloprid, los huevos a las 96 h de desarrollo tenían una longitud media de cola mayor, con valores medios de 115,3 μm ($de= 54,33 \mu m$) correspondientes a cometas grado E (Figura 30) que los huevos a las 48 h de desarrollo, con valores medios de 84,9 μm ($de= 0,29 \mu m$) (cometas grado F de la Figura 30) (Gráfico 25). Además, al medir el tamaño del efecto, el tratamiento ($\eta^2 = 0,61$) fue el factor que más influyó en la variabilidad, y su efecto fue mucho mayor que el del tiempo de desarrollo ($\eta^2 = 0,05$).

A las 48 h de desarrollo, la cola más larga estuvo presente en la concentración más alta evaluada ($p\text{-valor} < 1 \times 10^{-8}$), un valor intermedio en la concentración más baja y el valor más

bajo en el control. Misma situación que ocurrió en los huevos de 96 h de desarrollo (p -valor $< 1 \times 10^{-8}$). Es decir, cuanto mayor es la concentración, mayor es la longitud de la cola del cometa (Gráfico 24).

Al comparar las diferentes concentraciones, los huevos sumergidos en 100 mg/l ia de imidacloprid tuvieron una cola más larga a las 48 h de desarrollo que a las 96 h de desarrollo (p -valor = 0,0027) y los huevos sumergidos en 180 mg/l ia de imidacloprid tuvo una cola más larga a las 96 h que a las 48 h de desarrollo (p -valor $< 1 \times 10^{-8}$).

Discusión

El análisis del ensayo cometa protocolizado por primera vez para huevos de *C. externa* es útil para corroborar el daño en el ADN debido a la exposición a imidacloprid bajo la formulación comercial de Confidor OD® en ambas concentraciones estudiadas. La concentración más baja evaluada corresponde a una de las concentraciones de campo más bajas recomendadas para el control de plagas en agroecosistemas en Argentina. Estos resultados indican que el uso de estas concentraciones fue perjudicial para *C. externa*, que es un organismo no blanco.

En primer lugar, es importante resaltar que análisis cometa estandarizado en otros animales se realiza en células de un tejido específico, y en este caso se utilizaron huevos completos, lo cual implica la participación de células de diferentes tejidos. Esta diferencia en la técnica, muestra un índice basal de daño electroforético que representa la suma de la ruptura de las células diferentes-como las de la blástula o gástrula.

Los ensayos ecotoxicológicos en animales suelen mostrar una amplia variabilidad en los resultados. Algunos estudios indican una relación directa entre la concentración del imidacloprid y el daño observado, mientras que otros no lo hacen. Los eritrocitos de *Rana nigromaculata* (Hallowell, 1861) (Anura: Ranidae), por ejemplo, mostraron una relación directa entre el grado del cometa (clasificación de ID) y la concentración de imidacloprid (Feng *et al.*, 2005), pero no en estudios sobre *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Perciformes: Cichlidae) y *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor, 1842) (Cypriniformes: Cobitidae) expuestos a imidacloprid, en el que el daño al ADN fue independiente de la concentración utilizada (Ansoar-Rodríguez *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2016). En nuestro estudio, el índice de daño no mostró diferencias significativas para las diferentes concentraciones, pero las diferencias sí fueron marcadas para la longitud de la cola, porque a concentraciones más altas de

imidacloprid, se produjeron mayores roturas simples o dobles en la cadena de ADN, o sitios álcali-lábiles y/o sitios de reparación retrasados, lo que produce una desespiralización de las hebras y el movimiento en el gel, similar al informado por Xia *et al.* (2016).

Con una sola exposición a la concentración más baja, el ADN de las células analizadas a las 48 h y 96 h de desarrollo mostraron el mismo daño (% de daño); es decir, no tenían capacidad de recuperación. Además, las células analizadas a las 48 h presentaron mayores desespiralización de las hebras de ADN que las analizadas a las 96 h, producto de las roturas. Para futuras investigaciones queda evaluar si este decrecimiento del tamaño de la cola del cometa se debe a que una gran cantidad de células entraron en apoptosis a las 48 h.

Estudios ecológicos realizados en lombrices de tierra (*Eisenia fetida*) con exposición subcrónica a imidacloprid grado analítico mostraron daño no sólo a nivel del ADN sino también de peroxidación lipídica debido al aumento de especies reactivas de oxígeno y la participación de enzimas antioxidantes (Wang *et al.*, 2016). Los estudios han concluido que el imidacloprid favorece la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel celular (Abdel-Halim & Osman, 2020; Duzguner & Erdogan, 2012; EL-Gendy *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2015).

Por los estudios mencionados, la principal hipótesis sobre el daño a los huevos de *C. externa* es que la exposición a bajas concentraciones de imidacloprid produzca un aumento en la cantidad de ROS, y parece que el sistema antioxidante no logre compensar este aumento, provocando un desequilibrio que conduzca a un aumento de las roturas del ADN que se mantengan durante todo el desarrollo.

La principal diferencia en el aumento del daño a las 48 h respecto a la concentración más baja es que, en este momento, se produce la mayor tasa de división celular durante todo el periodo de desarrollo de la etapa de huevo, lo que implica un mayor número de fragmentos de okazaki. En consecuencia, se podría postular que la cola del cometa está compuesta por bucles de ADN dañado y fragmentos de okazaki dispersos. Por ellos, el daño en el ADN del cometa de control en este momento también fue mayor que en las otras evaluaciones.

Además, a medida que avanzaba el desarrollo del huevo, se observó un mayor daño en el ADN con concentraciones más altas. La tasa de producción de ROS parece ser tan alta que con el tiempo debilita progresivamente el complejo antioxidante. Esto daría lugar a un desequilibrio, y las ROS desequilibradas provocarían roturas generalizadas en las células y el ADN.

Como conclusión se puede decir que el uso de imidacloprid en insectos no sólo causa daño directo a nivel del sistema nervioso central, sino que también causa daño a nivel celular,

dañando moléculas biológicas de suma importancia. Aplicaciones específicas de huevos de *C. externa* producen roturas a nivel del ADN, que provocan daños irreparables en los organismos a corto y medio plazo. Esta situación podría repetirse en otros organismos no blanco provocando daños ambientales en campos agrícolas que no se están teniendo en cuenta. Es de suma importancia conocer qué se producen estas moléculas sintéticas en el medio ambiente, para estimar el daño ambiental que provoca su liberación, no sólo en la vida silvestre, sino también su implicación en la salud y nutrición humana.

Bibliografía

- Abdel-Halim, K. Y., & Osman, S. R. (2020). Cytotoxicity and Oxidative Stress Responses of Imidacloprid and Glyphosate in Human Prostate Epithelial WPM-Y.1 Cell Line. *Journal of Toxicology*, 2020, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2020/4364650>
- Ansoar-Rodríguez, Y., Christofolletti, C. A., Marcato, A. C., Correia, J. E., Bueno, O. C., Malaspina, O., & Fontanetti, C. S. (2015). Genotoxic Potential of the Insecticide Imidacloprid in a Non-Target Organism (*Oreochromis niloticus*-Pisces). *Journal of Environmental Protection*, 06(12), 1360–1367. <https://doi.org/10.4236/jep.2015.612118>
- Augustyniak, M., Gladysz, M. & Dziwiecka, M. (2016). The Comet assay in insects—Status, prospects and benefits for science. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 767, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.09.001>
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S., & Nauen, R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>
- CASAFE. (2023). *Guía online de productos fitosanitarios*. Recuperado 5 de junio de 2023, de <https://www.casafe.org/publicaciones/guia-de-productos-fitosanitarios/>
- Collins, A. R. (2004). The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261. <https://doi.org/10.1385/mb:26:3:249>
- Duzguner, V., & Erdogan, S. (2012). Chronic exposure to imidacloprid induces inflammation and oxidative stress in the liver & central nervous system of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(1), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.06.011>
- EL-Gendy, K. S., Aly, N. M., Mahmoud, F. H., Kenawy, A., & El-Sebae, A. K. H. (2010). The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.10.003>
- Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Peng, P., & Zeng, E. Y. (2005). Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(2), 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.10.005>
- Fernandez Acevedo, V., Rodríguez Gil, S., & Schneider, M. (2022). Morpho-colorimetric characterization of the embryonic development of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Approach for its use for biological control strategy. *Revista De La Sociedad Entomológica Argentina*, 81(4). <https://doi.org/10.25085/rsea.810401>
- Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., & Wang, J. (2015). Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Imidacloprid in Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(6), 1856–1862. <https://doi.org/10.1021/jf504895h>
- Kabacoff, R. (2022). Resampling statistics and bootstrapping. In *R in Action* (3.a ed.). Manning, Shelter Island.
- López, S. L., Aiassa, D., Benítez-Leite, S., Lajmanovich, R., Mañas, F., Poletta, G., Sánchez, N., Simoniello, M. F., & Carrasco, A. E. (2012). Pesticides Used in South American GMO-Based Agriculture. *Advances in Molecular Toxicology Volume 6*, 41–75. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59389-4.00002-1>
- Loxdale, H. D., Balog, A., & Biron, D. G. (2020). Aphids in focus: unravelling their complex ecology and evolution using genetic and molecular approaches. *Biological Journal of the Linnean Society*, 129(3), 507–531. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blz194>
- OpenComet (General Public License version 3.0). (2013). [Software]. https://cometbio.org/documentation.html#analysis_options

Puricelli, E. C., & Arregui, M. C. (2008). *Mecanismos de acción de plaguicidas* (1st ed.).

Souza, B., & Souza Bezerra, C. (2019) Predatory Insects. Natural Enemies of Insect Pests in Neotropical Agroecosystems (ed. Souza, B.), pp. 175–187. Springer Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-24733-1_15

Wang, J., Wang, J., Wang, G., Zhu, L., & Wang, J. (2016). DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid

exposure in the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 144, 510–517. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.004>

Xia, X., Xia, X., Huo, W., Dong, H., Zhang, L., & Chang, Z. (2016). Toxic effects of imidacloprid on adult loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 45, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.05.030>

Imágenes de la sección

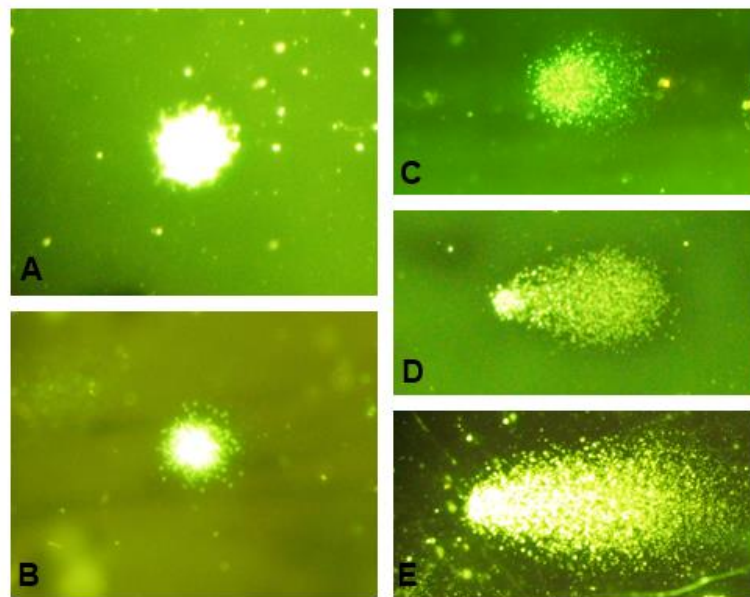


Figura 30: Grados de clasificación de los cometas. A: grado 0. Nucleoides sin ningún tipo de halo a su alrededor. B: grado 1. Nucleoides con cola menor al diámetro del núcleo. C: Grado 2. Nucleoides con cola de largo entre 1 y 2 diámetros del núcleo. D: Grado 3. Nucleoides con cola entre 2 y 3 veces el diámetro del núcleo. E: Grado 4: Nucleoides con una cola de tamaño superior a 3 diámetros del núcleo amplia dispersión del ADN.

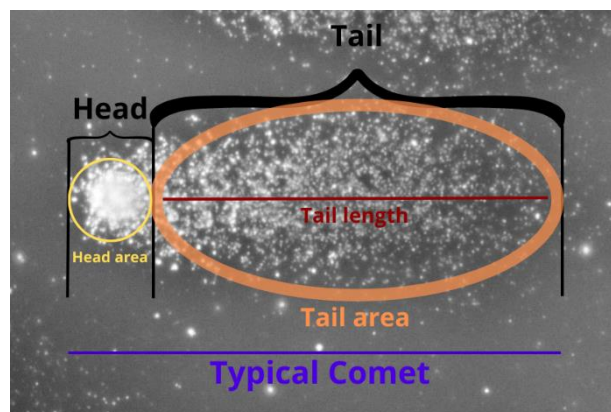


Figura 31: Cometa típico. Nuceloide donde se observa la cabeza y la cola. Variables analizadas para determinar el daño del ADN. Largo de cola de cometa (rojo), área de cola de cometa (naranja), área de cabeza del cometa (amarillo).

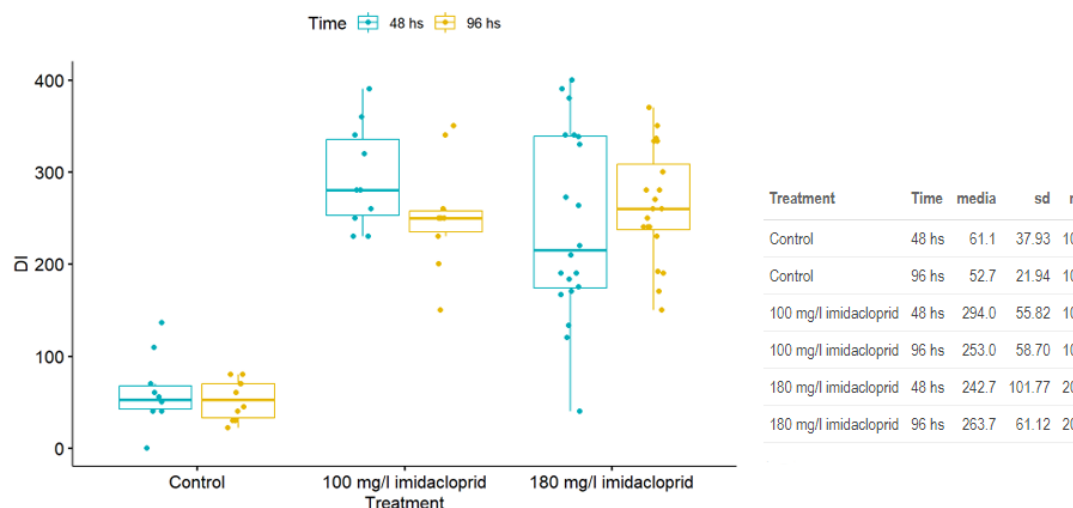


Gráfico 22: Genotoxicidad del imidacloprid en huevos de *Chrysoperla externa*. Índice de daños (DI) medido en unidades arbitrarias. Los tiempos de evaluación del Índice de Daño fueron 48 h (azul) y 96 h (amarillo) de desarrollo embrionario dentro del huevo. Las concentraciones de los tratamientos fueron 0 (controles), 100 y 180 mg i.a/l. Los cuadros indican valores medios y desviaciones estándar (sd). Los puntos representan todas las muestras analizadas.

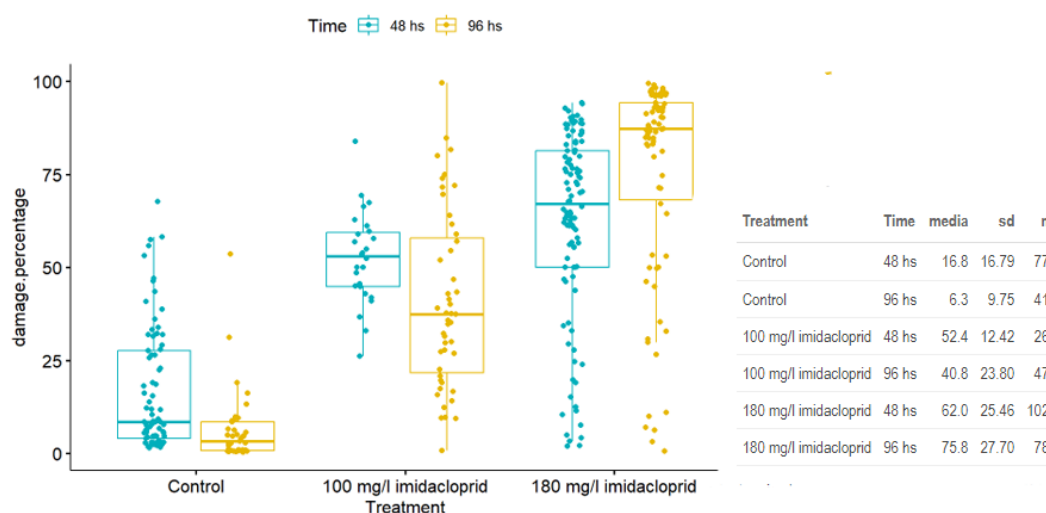


Gráfico 23: Genotoxicidad del imidacloprid en huevos de *Chrysoperla externa*. Porcentaje de daño (Damage percentage) medido en porcentaje. Los tiempos de evaluación del porcentaje de daño fueron 48 h (azul) y 96 h (amarillo) de desarrollo embrionario dentro del huevo. Las concentraciones de los tratamientos fueron 0 (controles), 100 y 180 mg i.a/l. Los cuadros indican valores medios y desviaciones estándar (sd). Los puntos representan todas las muestras analizadas.

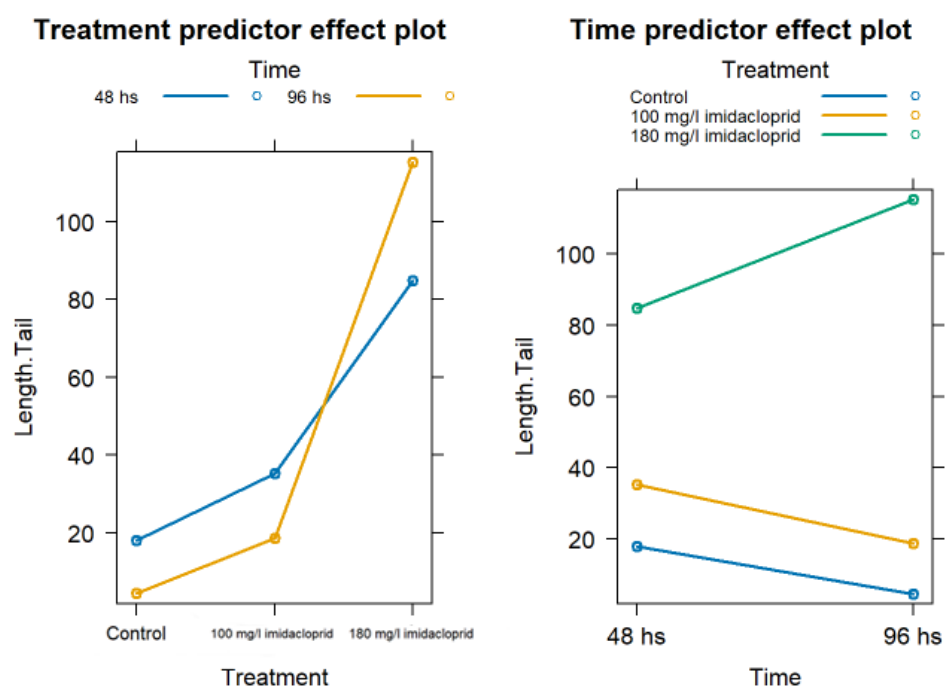


Gráfico 24: Genotoxicidad del imidacloprid en huevos de *Chrysoperla externa*. Predictor effect plot para longitud de la cola (Length tail) del cometa medida en micrómetros. Los tiempos de evaluación de la longitud de la cola fueron 48 h y 96 h de desarrollo embrionario dentro del huevo. Las concentraciones de los tratamientos fueron 0 (controles), 100 mg i.a/l y 180 mg i.a/l.

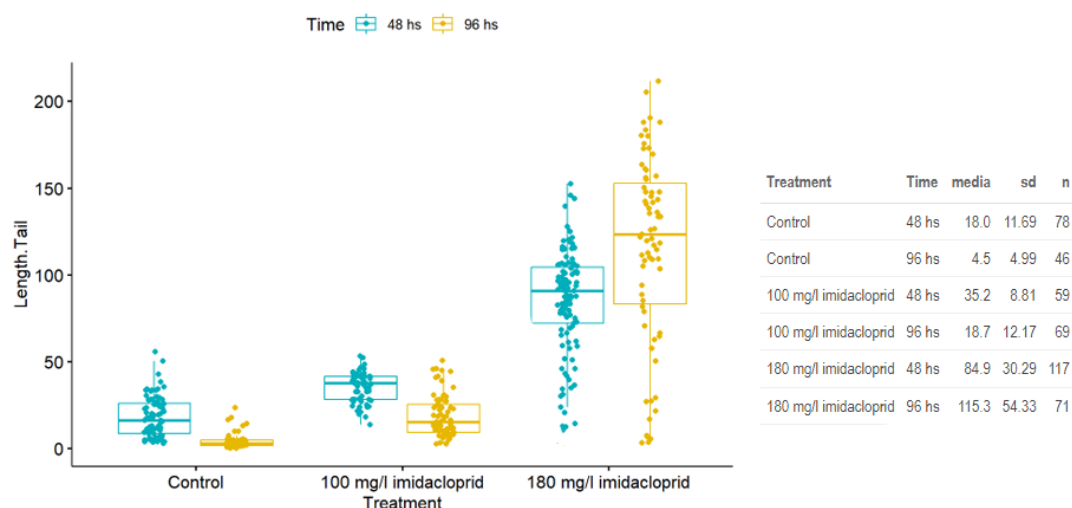


Gráfico 25: Genotoxicidad del imidacloprid en huevos de *Chrysoperla externa*. Longitud de la cola (Length Tail) del cometa medida en micrómetros. Los tiempos de evaluación de la longitud de la cola fueron 48 h (azul) y 96 h (amarillo) de desarrollo embrionario dentro del huevo. Las concentraciones de los tratamientos fueron 0 (controles), 100 mg i.a/l. y 180 mg i.a/l. Los cuadros indican valores medios y desviaciones estándar (sd). Los puntos representan todas las muestras analizadas.

4.3.2 Citotoxicidad del imidacloprid (Confidor OD®) y spirotetramat (Movento®) en huevos de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae)

Introducción

Chrysoperla externa es un insecto del orden Neuroptera, el cual radica su importancia en su capacidad para controlar poblaciones de insectos perjudiciales en cultivos. Las larvas de *C. externa* son voraces depredadores, especialmente de áfidos, pero también se alimentan de otros insectos dañinos como trips, ácaros, huevos de insectos y larvas de polillas (Giffoni *et al.*, 2007; Valencia Luna *et al.*, 2006).

El imidacloprid y el spirotetramat son insecticidas ampliamente utilizados en la agricultura para el control de plagas, especialmente de insectos succionadores. El imidacloprid actúa sobre el sistema nervioso de los insectos, interfiriendo con los neurotransmisores y provocando parálisis y muerte en las plagas (Araújo *et al.*, 2023). Por otro lado, el spirotetramat inhibe la biosíntesis de lípidos, interfiriendo en el desarrollo y crecimiento de los insectos (Hussain & Gau, 2023).

Los agroquímicos utilizados en la agricultura pueden provocar daños directos e indirectos en organismos no blanco, como *C. externa*. Aunque se conoce que los principios activos de estos productos causan daño celular en mamíferos y polinizadores, el efecto sobre los controladores biológicos ha sido menos estudiado (Ansoar-Rodríguez *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2016). En el trabajo previo, se comprobó que el imidacloprid produce daño a nivel de ADN en *C. externa* mediante el ensayo cometa alcalino, detallado en la sección 4.3.1 de esta tesis.

Dado que los huevos de *C. externa* no poseen un sistema nervioso desarrollado ni realizan mudas, este estudio ofrece una oportunidad única para evaluar el daño citotóxico del imidacloprid y el spirotetramat en una etapa donde sus mecanismos de acción no deberían ser evidentes.

El objetivo de esta sección fue comparar el daño citotóxico causado por el imidacloprid y el spirotetramat en huevos de *C. externa*.

Materiales y métodos

Insecticidas utilizados

Para los ensayos se utilizaron dos productos comerciales: Confidor OD® de formulación líquida comercializado por la empresa Syngenta Argentina; y Movento® de formulación líquida comercializado por la empresa Bayer.

En el caso del Confidor OD®, el principio activo es imidacloprid 20%. Se utilizaron las dos concentración recomendadas en campo para este principio activo en los cultivos hortícolas de Argentina, 50cm³/hl (350 cm³/ha) para cultivos hortícolas de hojas, equivalente a una concentración de 100 mg i.a/l y 90 cm³/hl (630 cm³/ha) para cultivos hortícolas de fruto, equivalente a una concentración de 180 mg i.a/l. Para el caso del Movento®, el principio activo es spirotetramat 15%. Se utilizó la concentración recomendada de campo de 60 ml/hl (420 cm³/ha) equivalente a una concentración de 90 mg i.a/l.

Material vivo

Los insectos se mantuvieron como se describió en la sesión materiales y métodos generales.

Se extrajeron de la colonia cartones con huevos de 24 h o menos de puesta. Los cartones fueron sumergidos por 15 segundos en la solución del insecticida con agua destilada. Los controles fueron sumergidos al mismo tiempo solo utilizando agua destilada.

Luego de la aplicación, los cartones fueron mantenidos bajo campana, hasta su completo secado y fueron colocados en cajas de Petri ventilados en bioterio de 25 ± 5°C, 70% ± 5% de humedad relativa y bajo fotoperiodo de L: D 16:8 hasta la realización de la tinción o ensayo cometa.

Tinción del material

Del material ya tratado con insecticidas, se extrajeron 5 huevos al azar por portaobjeto, y se realizaron 3 repeticiones. Se realizó la “técnica “confección de preparados citogenéticos con orceína” detallada en materiales y métodos generales.

Ensayo cometa alcalino

El ensayo cometa alcalino se realizó siguiendo el protocolo enunciado en materiales y métodos generales. Se seleccionó material tratado con imidacloprid con concentración de 180 mg i.a/l y para spirotetramat la concentración de 90 mg i.a/l. Con el fin de comparar las dos mayores concentraciones de los productos. Los huevos fueron analizados a las 48 h de desarrollo y a las 96 h de desarrollo.

Variables y Análisis estadístico

Se evaluó el índice mitótico (IM) de las diferentes muestras mediante la fórmula (Lacadena, 1996):

$$IM = \frac{\text{Células en división mitótica}}{\text{Células totales}} \times 100$$

Se realizó en conteo en tres preparados, analizando 1500 células por preparado. El análisis estadístico se realizó mediante software R. Los datos se analizaron mediante prueba F con df1, correspondiente a los grados de libertad del numerador y df2 grados de libertad el denominador.

Se evaluó el porcentaje de aberraciones cromosómicas (%Aberración) de las diferentes muestras mediante la fórmula (Lacadena, 1996; Mudry y Carballo, 2006):

$$\%Aberración = \frac{\text{Células con aberraciones cromosómicas}}{\text{Células totales en división}} \times 100$$

Se consideró como aberración cromosómica a cromosomas fuera de fase en metafase, cromosomas retrasados o adelantados, células con más de dos polos, presencia de micronúcleos, entre desvíos de las de la mitosis normotípica. Se realizó en conteo en tres preparados, analizando 1500 células por preparado.

En el ensayo comenta se realizó el cálculo de índice de daño (ID) de forma manual detallado por Collins (2004), se contabilizaron 10 repeticiones analizando 100 nucleoides en cada una de ellas, completando un total de 1000 nucleoides. Los cometas se clasificaron en 5 categorías o grados según el daño (Figura 30). A cada uno se le asignó un valor entre 0 y 4 y se realizó el cálculo del DI mediante la fórmula (Collins, 2004):

$$DI = \frac{(1xNd1 + 2xNd2 + 3xNd3 + 4xNd4)}{Total\ de\ cometas\ observados}$$

Donde Nd representa el número de cometas cada grado.

El análisis estadístico se realizó mediante software R. Los datos del análisis cometa fueron heterocedásticos. Se aplicó un modelo ANOVA de permutaciones (Kabacoff, 2022). Los análisis post hoc se realizaron con comparaciones de a pares con ajuste de los p valores por método Sidak para una significación de 0.05.

Resultados

Índice mitótico

A las 48 h de desarrollo, el índice mitótico (IM) no presentó diferencias entre los dos insecticidas evaluados y el control ($F= 0,1$, $df1= 3$, $df2= 8$, $p\text{- valor}= 0,972$). A las 72 h de desarrollo el IM se redujo en comparación a las 24 h anteriores (Tabla 7) pero en ninguno de los tratamientos se encontraron diferencias ($F= 1$, $df1= 3$, $df2= 12$, $p\text{- valor}= 0,439$). A las 96 h de desarrollo, los huevos presentaron los valores más bajos de IM (Tabla 7), para los diferentes tratamientos no se presentaron diferencias ($F= 2,4$, $df1= 3$, $df2= 7$, $p\text{- valor}= 0,158$).

Aberraciones cromosómicas

Se observó un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en los tratamientos imidacloprid 180 mg i.a/l a las 48 h de desarrollo con 4,40% de aberración cromosómica y en el tratamiento spirotetramat 90 mg i.a/l a las 72 h de desarrollo con 5,73% de aberración cromosómica (Tabla 8). La principal aberración encontrada en ambos tratamientos fue la inducción de cromosomas fuera del plano ecuatorial. (Figura 32).

Las variabilidades en el índice de daño (ID) estuvieron dadas solamente por el efecto del tratamiento ($Iter= 5000$; $Df=2$; $p\text{-valor} < 1 \times 10^{-8}$) (Gráfico 26).

A 48 h de desarrollo el ID del imidacloprid y del spirotetramat fue superior al control (ambos tratamientos: $p < 1 \times 10^{-8}$) (Figura 33). En cambio, para este mismo momento de desarrollo el ID de los dos insecticidas probados fue igual ($p\text{-valor}=0,99$).

A las 96 h de desarrollo el ID del imidacloprid y spirotetramat también fue superior al control (ambos tratamientos: $p\text{-valor} < 1 \times 10^{-8}$) pero, entre los dos insecticidas, el spirotetramat causó mayor daño en el ADN ($p\text{-valor}= 0,001$).

El spirotetramat presentó, en los huevos, mayor daño en ADN a las 96 h que a las 48 h de desarrollo ($p\text{-valor}= 0,0001$). En cambio el imidacloprid presentó en los dos tiempos de desarrollo evaluado el mismo daño ($p\text{-valor}= 0,693$).

Discusión

La tasa de división mitótica de estos insectos es extremadamente baja, alcanzando su punto máximo a las 48 h de desarrollo ($4,2\% \pm 1,08$ de células en división) en consonancia con la formación del embrión según lo descrito por Fernández Acevedo *et al.* (2020). A las 96 h el embrión se encuentra totalmente formado y ya prácticamente sin cambios, y por ello el IM es mucho menor ($0,6\% \pm 0,51$).

A medida que los huevos de *C. externa* avanzan en su desarrollo, se observa una disminución en el índice mitótico, sin diferencias notables entre los diferentes tratamientos. Aunque dicho índice no experimenta modificaciones, tanto el imidacloprid en su concentración más elevada como el spirotetramat provocan alteraciones a nivel celular.

Se evidencian aberraciones cromosómicas en aproximadamente un 5% de las células en división. No obstante, esta situación no afecta el índice de mitosis, sugiriendo la presencia de mecanismos de control celular que eliminan las células defectuosas sin provocar cambios considerables.

A través del ensayo del cometa, se determinó que los dos insecticidas evaluados causan daño genético en los huevos de *C. externa* cuando entran en contacto único a las 24 h de desarrollo.

El daño a las 48 h de desarrollo es comparable en ambos productos, pero a las 96 h, se observa un mayor daño en el caso del spirotetramat. Esto indica que con una sola aplicación de spirotetramat, el daño en el ADN persiste y se agrava con el tiempo. Por otro lado, el imidacloprid, en su concentración más alta, produce un daño sostenido con una sola aplicación a lo largo del tiempo. Estos hallazgos son concordantes con la investigación de Wei *et al.* (2020), que demuestra que el imidacloprid provoca disfunciones mitocondriales, generando una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y causando daños en el ADN y los lípidos. Además, Abdelhafez *et al.* (2023) informaron que, en cerebros de ratas tratadas con imidacloprid, se observa un aumento en el daño del ADN a medida que aumenta la concentración de imidacloprid.

Si bien los productos evaluados afectan el sistema nervioso o actúan sobre el desarrollo, mediante el estudio citogenético se determina que los insecticidas utilizados a campo para controlar a las presas de *C. externa* causan un daño en el ADN en estos individuos.

La información sobre el spirotetramat es limitada, y este es el primer trabajo que evalúa su daño a nivel de ADN. Este insecticida provoca un mayor daño en el ADN en huevos de 96 h de desarrollo que el imidacloprid. Basándonos solo en el estudio citotóxico, se podría determinar que si bien el spirotetramat se considera un producto de menor toxicidad en el ambiente frente a organismos no blanco que el imidacloprid por ser un producto de nueva generación, el daño a nivel ADN medido por cometa y porcentaje de aberraciones es igual o superior. Para investigaciones sería interesante determinar como los organismos continúan su desarrollo sorteando el daño encontrado.

A diferencia de la mayoría de los trabajos en esta área, que se centran en mamíferos, algunos peces y plantas cultivadas, este estudio es novedoso y proporciona información valiosa sobre el daño genético en insectos, un área de investigación escasamente explorada.

Bibliografía

Abdelhafez, H. E. D. H., Hammam, F. M., El-Dahhan, A. A., AboDallam, H., & Guo, J. (2023). Imidacloprid induces neurotoxicity in albino male rats by inhibiting acetylcholinesterase activity, altering antioxidant status, and primary DNA damage. *Journal of Toxicology*, 2023, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2023/4267469>

Ansoar-Rodríguez, Y., Christofolletti, C. A., Marcato, A. C., Correia, J. E., Bueno, O. C., Malaspina, O., & Fontanetti, C. S. (2015). Genotoxic Potential of the Insecticide Imidacloprid in a Non-Target Organism (*Oreochromis*

niloticus-Pisces). *Journal of Environmental Protection*, 06(12), 1360–1367. <https://doi.org/10.4236/jep.2015.612118>

Araújo, M. F., Castanheira, E. M. S., & Sousa, S. F. (2023). The Buzz on Insecticides: A Review of Uses, Molecular Structures, Targets, Adverse Effects, and Alternatives. *Molecules*, 28(8), 3641. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28083641>

Collins, A. R. (2004). The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261. <https://doi.org/10.1385/mb:26:3:249>

Giffoni, Jennifer, Valera, Neicy, Díaz, Francisco, & Vásquez, Carlos. (2007). Nota técnica. Ciclo biológico de *Chrysoperla externa* (hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada con diferentes presas. *Bioagro*, 19(2), 109-113. Recuperado en 10 de agosto de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612007000200007&lng=es&tlng=es

Haramboure, M., Mirande, L., & Schneider, M.I. (2016) Improvement of the mass rearing of larvae of the neotropical lacewing *Chrysoperla externa* through the incorporation of a new semiliquid artificial diet. *BioControl*, 61, 69-78. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9699-7>

Hussain, S., & Gau, M. (2023). Tetrionic Acid and Tetramic Acid derived pesticides and their toxicity: A Review. Pesticidas derivados del ácido tetrónico y ácido tetrámico y su toxicidad: una revisión. *Sustainability, Agri*,

Food and Environmental Research, 13. <https://10.770/safer-V13N1-art654>

Kabacoff, R. (2022), *R in Action (Third Edition)*, Manning, Shelter Island.

Lacadena, J.(1996) *Citogenética*. Editorial Complutense. Madrid. 931pp,

Mudry, MD y Carballo, MA (2006). *Genética toxicológica*. Editorial de los 4 vientos. 669 pp

Valencia Luna, Luis Aurelio, Romero Nápoles, Jesús, Valdez Carrasco, Jorge, Carrillo Sánchez, José Luis, & López Martínez, Víctor. (2006). Taxonomía y registros de Chrysopidae (Insecta: Neuroptera) en el estado de Morelos, México. *Acta zoológica mexicana*, 22(1), 17-61.

Xia, X., Xia, X., Huo, W., Dong, H., Zhang, L., & Chang, Z. (2016). Toxic effects of imidacloprid on adult loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 45, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.05.030>

Imágenes de la sección

Tabla 7: Análisis de Valores medios de Índice Mitótico (IM) para cada tratamiento y tiempo de desarrollo de los huevos de *Chrysoperla externa*. sd indica desvíos estándar. Los tratamientos indican mg de ingrediente activo por litro.

<i>Tiempo de desarrollo</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>IM medio</i>	<i>sd</i>
48 h	Control	4.2	1.08
	<i>Imidacloprid 100 mg i.a/l</i>	4.2	2.32
	<i>Imidacloprid 180 mg i.a/l</i>	4.8	2.36
	<i>Spirotetramat 90 mg i.a/l</i>	4.5	0.71
72 h	Control	2.9	1.07
	<i>Imidacloprid 100 mg i.a/l</i>	2	0.70
	<i>Imidacloprid 180 mg i.a/l</i>	2.1	0.90
	<i>Spirotetramat 90 mg i.a/l</i>	2.6	0.27
96 h	Control	0.6	0.51
	<i>Imidacloprid 100 mg i.a/l</i>	1.6	0.09
	<i>Imidacloprid 180 mg i.a/l</i>	2.6	1.94
	<i>Spirotetramat 90 mg i.a/l</i>	0.6	0.10

Tabla 8: Células contabilizadas con aberraciones cromosómicas en huevos de *Chrysoperla externa*. Los tratamientos indican mg de ingrediente activo por litro.

Tiempo de desarrollo	de Tratamiento		Células con aberración cromosómica	% de aberración cromosómica
48 h	Control		0	0
	Imidacloprid mg i.a/l	100	0	0
	Imidacloprid mg i.a/l	180	66	4,40
	Spirotetramat mg i.a/l	90	0	0
72 h	Control		0	0
	Imidacloprid mg i.a/l	100	0	0
	Imidacloprid mg i.a/l	180	0	0
	Spirotetramat mg i.a/l	90	86	5,73
96 h	Control		0	0
	Imidacloprid mg i.a/l	100	0	0
	Imidacloprid mg i.a/l	180	0	0
	Spirotetramat mg i.a/l	90	0	0

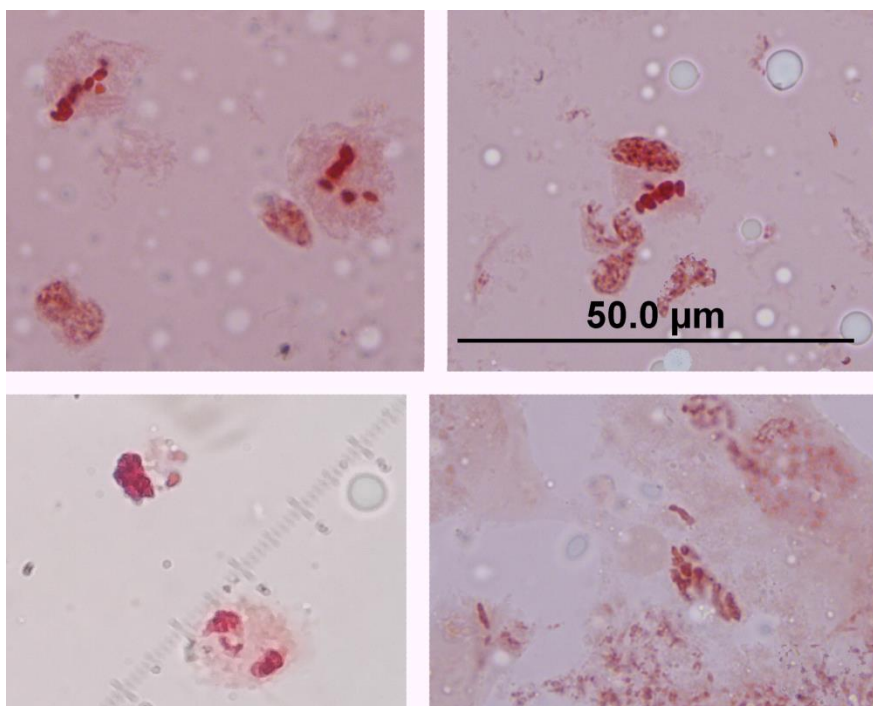


Figura 32: Aberraciones cromosómicas causadas por insecticidas en huevos de *Chrysoperla externa*. Arriba. Aberraciones cromosómicas causadas por spirotetramat 90 mg i.a/l en huevos de 72 h de desarrollo. Abajo: Aberraciones cromosómicas causadas por imidacloprid 180 mg i.a/l en huevos de 48 h de desarrollo.

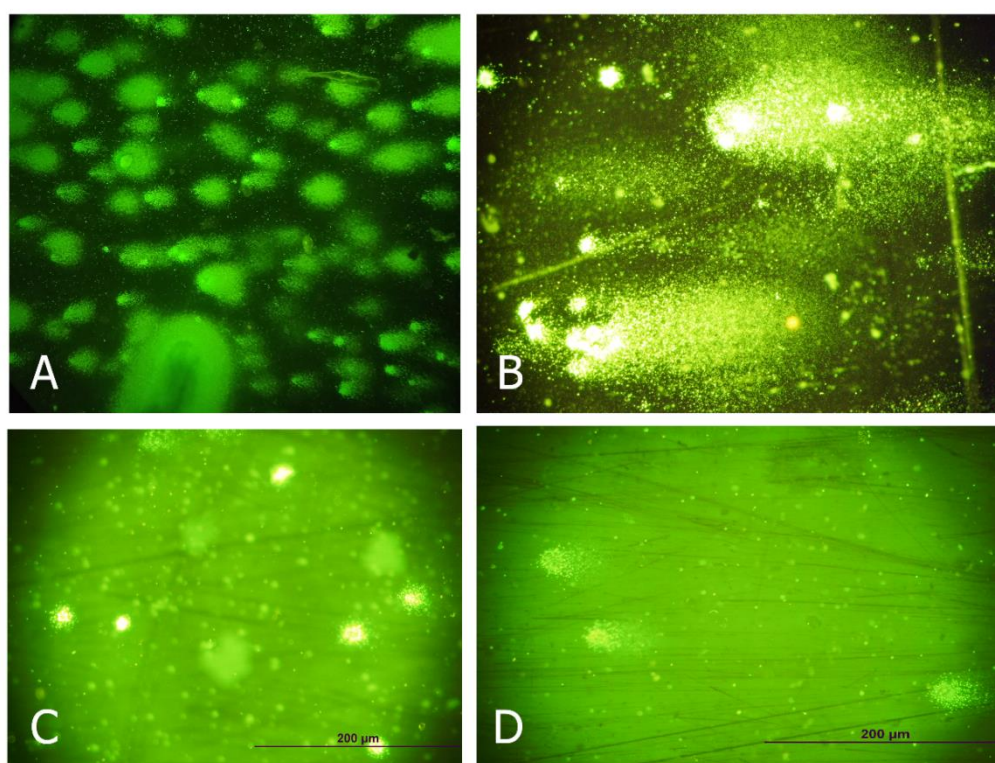


Figura 33: Ensayo cometa en huevos de *Chrysoperla externa*. A. Spirotetramat concentración de 90 mg i.a/l. Observación a 48h de desarrollo aumento x20 B: Imidacloprid a concentración de 180 mg i.a/l. Observación a 96 h de desarrollo. Aumento x 40 C. control. D: Imidacloprid a concentración de 100 mg i.a/l. Observación a 48 h de desarrollo. Aumento x 40.

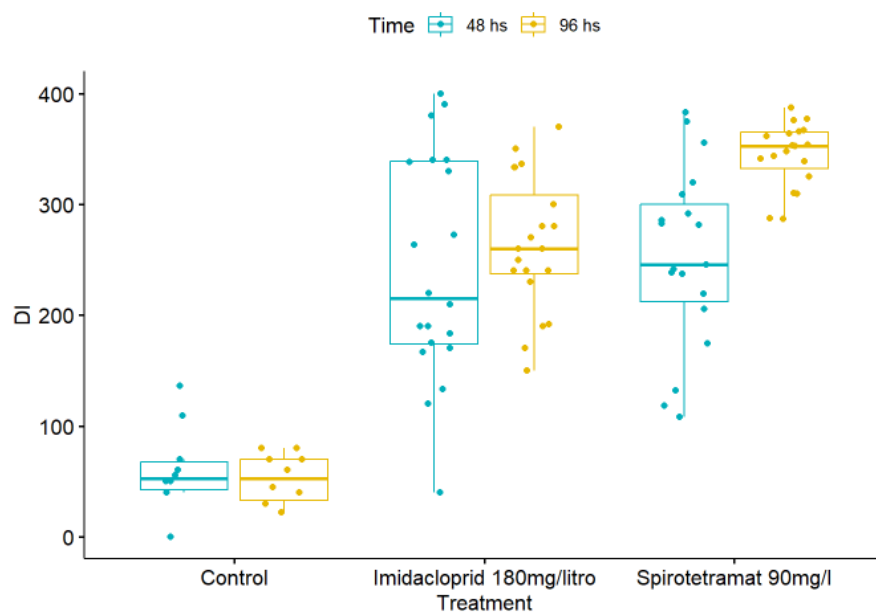


Gráfico 26: Genotoxicidad del imidacloprid en huevos de *Chrysoperla externa*. Índice de daños (DI) medido en unidades arbitrarias. Los tiempos de evaluación del Índice de Daño fueron 48 h (azul) y 96 h (amarillo) de desarrollo embrionario dentro del huevo. Las concentraciones de los tratamientos fueron 0 (controles), 180 mg i.a/l de imidacloprid y 90 mg i.a/l de spirotetramat. Los puntos representan todas las muestras analizadas.

Capítulo 5: Conclusiones



A partir de las hipótesis:

- El spirotetramat presenta una toxicidad significativamente menor que el imidacloprid en *C. externa*.
- El insecticida spirotetramat no modifica la supervivencia, el desarrollo y la reproducción de *C. externa*.

Se concluye que:

A través de los ensayos toxicológicos realizados, se determinó que el spirotetramat presenta una toxicidad estadísticamente menor en comparación con el imidacloprid para *C. externa*.

Sin embargo, se observaron efectos adversos a nivel reproductivo en presencia de spirotetramat, lo que subraya la necesidad de considerar su impacto a corto y mediano plazo en las poblaciones naturales presentes en los agroecosistemas.

El imidacloprid, por otro lado, mostró impactos negativos en la supervivencia, desarrollo, comportamiento locomotor y reproducción de *C. externa*, dependiendo del momento de desarrollo en el que los organismos fueron tratados. Este hallazgo indica la incompatibilidad del imidacloprid con el Manejo Integrado de Plagas (MIP), excepto en el caso de individuos en estado de pupa, donde su uso podría considerarse con precaución.

En cuanto al spirotetramat, se presenta como un insecticida compatible con el MIP en todos sus estadios, ya que no afectaría la supervivencia, desarrollo y comportamiento locomotor de los organismos. Esto posibilita que dichos organismos sigan alimentándose en los lotes productivos de presas fitófagas, manteniendo así un control biológico efectivo. Sin embargo, es imperativo tener en cuenta que afecta la reproducción, con la consiguiente reducción de la población de individuos a corto plazo. Se propone la necesidad de nuevas investigaciones que diluciden la posibilidad de llevar a cabo estudios con organismos tratados con spirotetramat que se reproduzcan con organismos no tratados. Este enfoque permitiría observar detalladamente el comportamiento reproductivo, considerando que en los lotes productivos podría haber organismos tratados y la introducción natural o artificial de organismos no tratados podría mantener una población de depredadores a largo plazo.

A partir de la hipótesis:

- La citogenética es una herramienta de evaluación ecotoxicológica relevante para detectar efectos citotóxicos y genotóxicos de insecticidas en individuos de *C. externa*.

Se concluye que:

La citogenética reveló ser una herramienta útil para el análisis de los daños cromosómicos inducidos por los insecticidas en *C. externa*. Esta técnica de detección, además de ser sencilla y económica, prescinde de instalaciones o productos costosos, destacando su accesibilidad y utilidad en la evaluación de los efectos genotóxicos.

Sin embargo, es crucial señalar una limitante significativa las bajas tasas de división celular observadas en la especie. Este factor, si bien no invalida la utilidad de la citogenética, añade complejidad al proceso, volviéndolo tedioso debido a la necesidad de realizar conteos extensos de células para obtener resultados estadísticamente utilizables. Adicionalmente, la técnica demanda un conocimiento profundo del patrón cromosómico normal de la especie, lo que puede resultar otro inconveniente en presencia de cromosomas pequeños y tasas de división bajas.

En función de estas consideraciones, se sugiere que la citogenética podría recomendarse de manera más efectiva en especies con tasas de divisiones celulares altas y con cromosomas de mayor tamaño. En estos casos, su simplicidad y bajo costo la convierten en una opción viable y práctica para evaluar daños cromosómicos inducidos por insecticidas. Este enfoque selectivo permitiría maximizar la eficiencia de la técnica, optimizando su aplicación en situaciones donde pueda ofrecer resultados más precisos y significativos.

A partir de la hipótesis:

- El ensayo cometa en su variante alcalina como herramienta de evaluación ecotoxicológica, permite determinar en forma rápida y precisa efectos genotóxicos de plaguicidas en organismos de *C. externa*.

Se concluye que:

La técnica de ensayo cometa fue herramienta eficaz para identificar de manera rápida y precisa los daños a nivel de ADN causados por los insecticidas. En el marco de este estudio, tanto el imidacloprid como el spirotetramat evidenciaron la inducción a lesiones en la molécula de ADN en material proveniente genético de los huevos de *C. externa*.

En el entorno natural, *C. externa* se encuentra expuesta a un daño genético que podría tener repercusiones a corto y mediano plazo en su desarrollo normal debido a inducción de rupturas en el ADN. Como una propuesta para futuras investigaciones, sería importante realizar un seguimiento más detallado del daño genético a lo largo del desarrollo, considerando la posibilidad de emplear técnicas donde se incluya la evaluación del tipo de lesiones que inducen los compuestos analizados. Estas técnicas podrían proporcionar una comprensión más precisa de qué partes específicas del ADN están siendo afectadas. Como por ejemplo, el uso de ensayo cometa alcalino con incubación de endonucleasas de restricción capaces de reconocer los diferentes tipos de bases dañadas en la molécula de ADN.

Aunque la técnica en sí misma requiere materiales de fácil acceso, es importante destacar que la principal limitación reside en la disponibilidad de microscopios con equipamiento para trabajar con reactivos fluorescentes. No obstante, durante la ejecución del trabajo, se logró establecer un protocolo de observación y comparación. Aunque esta puesta a punto demandó ciertos ajustes, no representó una dificultad insuperable. Esto abre la puerta a la aplicación de la técnica en numerosos otros artrópodos, ofreciendo la posibilidad de utilizarlos como indicadores biológicos y como señales tempranas de contaminación con pesticidas.

En resumen, la técnica de ensayo cometa, al demostrar su eficacia en la evaluación del daño genético causado por insecticidas, ofrece perspectivas prometedoras para la monitorización de la salud genética de los organismos y su potencial aplicación en estudios más amplios sobre la exposición a contaminantes.

A partir de la hipótesis:

- La histología de insectos resulta de utilidad como herramienta complementaria para caracterizar a nivel cualitativo los efectos subletales de insecticidas.

Se concluye que:

La histología fue de utilidad para caracterizar a nivel cualitativo los efectos subletales de insecticidas, principalmente del imidacloprid que presentó daños directos en los tejidos cerebrales de *C. externa*.

Sin embargo, es fundamental reconocer que esta técnica demanda la destreza de personal cualificado para llevar a cabo los cortes histológicos y seguir protocolos precisos de manejo del material. Aunque se reconoce su eficacia y se considera una opción recomendada, se enfrentaron desafíos considerables debido al tamaño reducido de *C. externa* y sus características biológicas, como una alta tasa de descomposición y presencia significativa de tejido graso. Lamentablemente, una proporción significativa de los cortes sufrió roturas, resultando en la pérdida de una cantidad considerable de material y dificultando el análisis de manera integral.

Además, es esencial destacar que la aplicación exitosa de la histología requiere un conocimiento previo del patrón histológico normal del individuo en estudio. En algunos casos, esta información puede no estar disponible, añadiendo una capa de complejidad al proceso de interpretación de los resultados.

En resumen, aunque la histología demostró ser valiosa para la caracterización cualitativa de los efectos subletales de los insecticidas, se debe abordar cuidadosamente su implementación, considerando las limitaciones inherentes a la especie de estudio y asegurando la disponibilidad de conocimientos histológicos específicos para una interpretación precisa y completa de los resultados.

Finalmente, es importante destacar que, la aplicación de insecticidas en la agricultura incide de manera directa e indirecta en organismos no blanco, generando impactos significativos. La comprensión profunda de estos efectos es esencial para formular recomendaciones precisas en el marco del Manejo Integrado de Plagas (MIP). El objetivo no solo es asegurar la producción de alimentos más seguros, sino también reducir al máximo los daños ambientales asociados con el uso de estos productos en el agroecosistema.

La aspiración de lograr producciones alimentarias más amigables con el entorno circundante no solo contribuye al equilibrio del agroecosistema, sino que también genera beneficios ambientales sostenibles a largo plazo. En este sentido, es imperativo que los profesionales que tienen la capacidad de recomendar el uso de sustancias químicas adopten una perspectiva más amplia del manejo del ecosistema. Esto implica contar con una información más completa y detallada para respaldar la toma de decisiones más acertadas. Es importante destacar que este estudio ha permitido evidenciar que los insecticidas de nueva generación, en concentraciones de campo, presentan un impacto significativamente menor en comparación con los insecticidas clásicos. Este hallazgo es crucial para el manejo sostenible en la agricultura, subrayando la necesidad de regular y fomentar el uso de estos productos en los cultivos. Avanzar hacia la adopción de insecticidas con menores impactos es fundamental para reducir los efectos negativos en el medio ambiente y mejorar la sostenibilidad agrícola.

El compromiso con la sostenibilidad ambiental en la agricultura requiere que quienes influyen en las decisiones relacionadas con el uso de insecticidas se involucren de manera integral en el contexto del MIP. Al tener una visión más holística del manejo del ecosistema y acceder a información detallada, los profesionales pueden desempeñar un papel crucial en la promoción de prácticas agrícolas que equilibren la necesidad de controlar plagas con la preservación del entorno natural. Esta mirada amplia no solo refuerza la seguridad alimentaria, sino que también fomenta una coexistencia armoniosa entre la agricultura y el medio ambiente.

Capítulo 6: Anexos



6.1 Estudios sobre *Chrysoperla Argentina*

Durante el desarrollo de la tesis de doctorado, se volvió a encontrar la especie *C. argentina*, la cual había sido citada por primera vez en el 2014 y se consideró agregar estos estudios como un anexo ya que se hicieron estudios comparativos con la especie objetivo de esta tesis.

Los objetivos de esta sección fueron:

- Profundizar en la descripción histológica de la anatomía interna de *C. argentina*.
- Realizar una descripción y análisis del cariotipo de *C. argentina*.

Descripción morfológica de machos de *Chrysoperla argentina* (Neuroptera: Chrysopidae)

Introducción

El orden Neuroptera comprende insectos holometábolos caracterizados por tener tres estadios larvales y abarca 17 familias, con más de 6.000 especies distribuidas a nivel mundial, exceptuando la Antártida (Gerth *et al.*, 2017; Ribera y Melic, 2015; Chen *et al.*, 2019). Dentro de este orden, la familia Chrysopidae, conocida comúnmente como "crisopas", es la segunda más numerosa y diversa, con 1.416 especies distribuidas en 82 géneros a nivel global (Winterton y Freitas, 2006; Garzón-Orduña *et al.*, 2018). Esta familia tiene una gran importancia en la agricultura, ya que muchas de sus especies actúan como agentes de control biológico de plagas en sus etapas larval y adulta (Ribeiro *et al.*, 2013; Villa *et al.*, 2019).

En Argentina, se han registrado tres especies del género *Chrysoperla* que se encuentran comúnmente en agroecosistemas: *C. externa*, *C. asoralis* y *C. argentina* (Reguilón *et al.*, 2006). A pesar de que *C. argentina* comparte comportamientos similares con *C. externa*, persiste la falta de conocimiento sobre su anatomía interna y la duración precisa de sus distintos estadios de desarrollo.

El objetivo de este trabajo fue realizar, por primera vez, una descripción detallada de la anatomía de *C. argentina*, con el fin de aportar nueva información sobre esta especie y facilitar comparaciones anatómicas con *C. externa*.

Material y métodos

El material vivo fue mantenido tal como se detalló en la sección de Materiales y Métodos generales.

Bioensayos

Los machos fueron seleccionados aleatoriamente de la colonia y, previo a los estudios histológicos, se procedió a anestesiarlos en frío durante 15 min a 4 °C en un refrigerador White-Westinghouse W3100®.

Se llevó a cabo la evaluación de la anatomía de diez abdómenes de ejemplares masculinos de *C. argentina*. Estos especímenes fueron disectados en una solución fisiológica comercial (0,9% p/v de **CINa** en agua destilada), posteriormente observados y fotografiados utilizando un estereomicroscopio Leica® M205a. Las imágenes fueron capturadas utilizando los programas DP Controller 3.3.1.292 y DP Manager 3.3.1.222.

Se procedió al análisis de la morfología testicular, evaluando aspectos como el largo, ancho, ubicación, número de vueltas y altura de cada vuelta del testículo. Todas las mediciones se realizaron utilizando el programa Image J, extrayendo doce imágenes para cada parámetro, en las que se llevaron a cabo cinco mediciones para minimizar el margen de error.

Dado que tanto el tamaño como la estructura de los individuos se mantuvieron estables, se seleccionaron cuatro abdómenes y cuatro cabezas de *C. argentina* para las secciones histológicas. El material se preparó siguiendo las descripciones detalladas en la sección de Materiales y Métodos generales bajo el apartado de "Cortes histológicos".

Todas las secciones fueron observadas utilizando un microscopio Olympus BX51® equipado con una cámara Olympus DP71®. Las imágenes fueron capturadas utilizando los programas DP Controller 3.3.1.292 y DP Manager 3.3.1.222.

Resultados

Cabeza

La cabeza de *C. argentina* también mostró el ganglio cerebral definido, con amplias zonas de neuropilo en el interior del corte y áreas de pericaria en la parte exterior. Las dimensiones registradas fueron un largo de 0,66 mm (de= 0,02, Min= 0,62, Máx= 0,69) y un ancho de 0,50 mm (de= 0,01, Min= 0,47, Máx= 0,52), considerando los lóbulos antenales (Figura 34: B).

En la región del protocerebro, se identificaron los lóbulos ópticos, que comprendían la lámina, la médula y la lóbula. El complejo central también fue visible en la parte central del protocerebro (Figura 34: B). Respecto al deutocerebro, se observaron los glomérulos situados en los lóbulos antenales, destacando un lóbulo con un tamaño mayor en comparación con el otro (Figura 34: A).

Sistema digestivo

Durante la disección ventral del abdomen se observó el sistema digestivo, situado en el centro y con aspecto tubular de coloración transparente con áreas de tonalidades ocre pálido. En los cortes histológicos, se constató que este sistema ocupaba prácticamente la totalidad del abdomen.

En *C. argentina*, se observó una abundante presencia de adipocitos a lo largo del sistema digestivo. Se destacó la existencia de un gran número de fibras musculares en las partes inicial y final del abdomen (Figura 35). El divertículo, de gran tamaño y con aspecto translúcido, estaba asociado a la porción inicial del sistema digestivo. Seguido a esto, se encontró el proventrículo, con una forma de copa y un aspecto firme (Figura 36: B). El intestino medio abarcó cuatro segmentos y mostró una pared bien definida. En el intestino posterior se halló el íleon, el recto y el ano, comprendiendo los tres últimos segmentos. En la sección rectal, se identificaron dos almohadillas rectales con una longitud de 0,11 mm (de= 0,01, Min= 0,09, Máx= 0,13) y un ancho de 0,14 mm (de= 0,01, Min= 0,12, Máx= 0,15) (Figura 14: A). A pesar de revisar numerosos cortes, no se logró determinar con exactitud ni el número ni la ubicación de los tubos de Malpighi.

Sistema reproductor

Los testículos de *C. argentina* se ubicaron a partir del segmento 6, en ambos laterales del sistema digestivo. Fueron dos estructuras de color amarillo brillante con forma de espiral con 4 vueltas siendo las del extremo más angostas que las centrales (Figura 37: A-B). El ancho promedio de las vueltas fue de 0,18 mm (de= 0,02, Min= 0,12, Máx= 0,22).

La longitud promedio total del testículo fue 0,91 mm (de= 0,07, Min= 0,77, Máx= 1,1). Respecto al ancho presentaron la región central más ensanchada respecto a las puntas. El ancho promedio fue de 0,31 mm (de= 0,03, Min= 0,26, Máx= 0,36). Al realizarse la extracción de los testículos del resto del abdomen se desespiralizaron, como un resorte que se encuentra en compresión y es liberado de la misma.

En los cortes histológicos *C. argentina* los testículos se encontraron rodeados por una capa uniforme de tejido conectivo. Los tubos seminíferos estuvieron formados por tejido conectivo y epitelial, donde se pudieron diferenciar células en interfase y células en división meiótica (Figura 37: C). En la parte proximal se observaron células en los primeros estadios de la meiosis. En la parte media y distal del testículo se encontraron espermatozoides en estado de desarrollo avanzado. Su apariencia fue de estructuras filamentosas agrupadas en haces. Los espermatozoides fueron de aspecto filamentosos. Tanto los espermatozoides como los haces mostraron en el microscopio óptico una marcada refringencia.

Las vesículas seminales y sus glándulas anexas se observaron a partir del segmento 6 (Figura 37: D). Las vesículas seminales presentaron un tamaño en promedio de 0,18mm (de= 0,02, Min= 0,15, Máx= 0,20) por 0,13 mm (de= 0,02, Min= 0,11, Máx= 0,18) cada una con una pared bien diferenciada. Internamente se observó una cavidad de gran tamaño, con numerosos espermatozoides en su interior que le da el aspecto filamentosos con un lumen libre. Las glándulas anexas presentaron gran tamaño respecto al tamaño abdominal y de variadas formas abarcando gran parte de los dos segmentos terminales. Estuvieron contenidas exteriormente por musculatura.

Discusión

En los cortes del ganglio cefálico, el complejo central al igual que los lóbulos antenales presentaron un mayor desarrollo en *C. argentina* respecto a *C. externa*, esta diferencia podría estar relacionada con una mejor adaptación a los estímulos olfatorios y a un mejor procesamiento visual (Urquiza, 2021). En *C. argentina* hubo un desarrollo diferencial entre los lóbulos, a diferencia de *C. externa* que presentan un tamaño homogéneo. En ambas especies los cuerpos pedunculados no mostraron un desarrollo diferencial como ocurre en otros artrópodos, como *Drosophila melanogaster* y *Apis mellifera* donde se relaciona a estas estructuras con la memoria a corto y largo plazo (Strausfeld, 2002), por lo cual no fue posible diferenciarlos. Los estudios sobre los cambios en la cabeza durante la metamorfosis de *Chrysopa pallens*, llevados a cabo por Zhao et al. (2020), indican que el tamaño del ganglio cefálico es comparable al observado en este estudio. Además, el protocerebro mantiene la misma forma de mancuerna y los lóbulos antenales están orientados hacia adelante en la parte inferior, de manera similar a lo encontrado en nuestra investigación.

El sistema digestivo presenta similitudes entre las especies evaluadas, excepto en el número de ampollas rectales, en el cual *C. argentina* presentó solo dos frente a las cuatro de *C. externa*. En los cortes se percibe mayor cantidad de fibras musculares en *C. argentina* e igual cantidad de tejido adiposo en el abdomen en ambas especies.

Las descripciones de las estructuras digestivas observadas en *C. externa* y *C. argentina*, muestran similitudes a las observadas en *Ceraeochrysa cubana*, y *Chrysoperla rufilabris* (Burmeister, 1839) (Neuroptera: Chrysopidae), especies de presencia espontánea en América del Norte. Una diferencia notoria se observó en el número de tubos de Malpighi. Estas dos especies presentan más de 20 tubos (Vacacela *et al.* 2017; Woolfolk *et al.* 2004) mientras que en *C. externa* se han podido identificar menos de 6 estructuras, coincidiendo con lo reportado previamente por Costa Dantas, *et al.* (2021).

En la familia Chrysopidae, el sistema reproductor de machos y la morfología de los testículos en particular, han sido descritos sólo en algunas especies. Withycombe (1922) describió que los testículos de las especies *Chrysoperla carnea* (Stephens, 1836)¹ (Neuroptera: Chrysopidae), y *Pseudomallada flavifrons* (Brauer, 1851)² (Neuroptera: Chrysopidae), eran espiralados. Esta descripción morfológica testicular es similar a la encontrada en nuestros estudios para *C. externa* y *C. argentina*. Sin embargo, existe una diferencia en la cantidad de vueltas en los testículos entre los géneros. Mientras que las especies de *Chrysoperla* presentan 4 vueltas en sus testículos, las especies del género *Pseudomallada* presentan 6. De acuerdo a estos datos, podríamos hipotetizar que las vueltas de los testículos espiralados en Chrysopidae podría ser un carácter específico y serviría a nivel taxonómico.

La morfología interna testicular encontrada en *C. externa* y *C. argentina* es similar en ambas especies y coincide con la descripción de *C. pallens*³ realizada por Principi (1948) pero no a la detallada por Liu *et al.* (2023) para la misma especie indicando problemas de taxonomía posiblemente en el trabajo de Principi (1948). En las dos especies analizadas en el presente trabajo los tubos seminíferos espiralados presentan internamente los diferentes estadios de división meiótica y desarrollo de los espermatozoides, los cuales se encuentran asociados a haces en las partes posteriores. Para *C. pallens* Liu *et al.* (2023) determinaron que los testículos son arriñonados.

1 En las investigaciones de Withycombe (1922) se describió como *Chrysopa vulgaris* (Schneider, 1851).

2 En el trabajo original se describió como *Chrysopa flavifrons* (Brauer, 1851).

3 En el trabajo es citada como *Chrysopa septempunctata* (Wesmael, 1841).

Los diferentes cortes observados muestran una alta producción de espermatozoides los cuales pasan del testículo a las vesículas seminales donde son reservados. *C. argentina* presenta una mayor cantidad de glándulas anexas y de mayor tamaño que las de *C. externa*, aunque en ambas especies ocupan gran parte del posterior del abdomen. De igual forma que para otras especies, el número de glándulas accesorias y su desarrollo parecería tener una alta relevancia en la producción de compuestos que ayudan en el traslado de los espermatozoides a la espermateca de la hembra (Happ, 1992). Estos compuestos de naturaleza peptídica podrían estar cumpliendo roles importantes en la estimulación ovárica de las hembras como ocurre en *D. melanogaster* (Chen *et al.*, 1988). Esto podría explicar la alta fecundidad y fertilidad de las hembras de *C. externa*, cuya capacidad reproductiva ha sido demostrado a través de estudios demográficos (Schneider *et al.*, 2009).

Withycombe (1922) propuso que aquellas especies con morfología testicular similar deberían estar emparentadas. Sin embargo, la autora no pudo probar en aquel momento su propia hipótesis debido a que las especies de crisópidos evaluadas estaban muy alejadas filogenéticamente y en géneros diferentes. Mediante el avance de la taxonomía junto con los estudios de análisis de filogenética sobre la base de ADN (Winterton & Freitas, 2006; Garzón-Orduña, *et al.*, 2019), las especies estudiadas originalmente sufrieron cambios de género y ubicación filogenética. Estos nuevos estudios junto con nuestros resultados coinciden con lo propuesto por Withycombe (1922). Bajo esta premisa, *C. externa* y *C. argentina* serían especies sumamente emparentadas entre ellas y a la vez al hoy considerado complejo de *C. carnea*.

Las estructuras internas de la cabeza y los detalles del ganglio cefálico han sido estudiados detalladamente en organismos de *D. melanogaster*, *A. mellifera*, y algunos lepidópteros como *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1756) (Lepidoptera: Pyralidae) (Ito *et al.*, 2014; Sehnal & Rembold, 1985; Villalobos *et al.*, 2011). Estas investigaciones no solo aportaron información anatómica de las especies sino que fueron un puntapié inicial para los estudios de fisiología hormonal, estudios de comportamiento y aprendizaje de las especies, entre otros. Nuestra descripción de la cabeza y del ganglio cefálico para *C. externa* y *C. argentina* es totalmente nueva y aporta información relevante para ambas especies.

Este estudio describe por primera vez la morfología interna de *C. argentina* y proporciona información relevante para identificar esta especie con gran potencial como agente de control biológico. También proporciona información valiosa aplicable a nivel taxonómico para separar especies. Por otro lado, sirve como base para estudios aplicados que requieren comparaciones de tejidos internos como los estudios de ecotoxicología donde se evalúa el impacto de los

agentes contaminantes en los procesos de meiosis (citogenotoxicidad) y otras estructuras morfológicas en organismos no blanco.

Bibliografía

- Chen, P., Stumm-Zollinger, E., Aigaki, T., Balmer, J., Bienz, M., & Böhlen, P. (1988). A male accessory gland peptide that regulates reproductive behavior of female *D. melanogaster*. *Cell*, 54(3), 291–298. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90192-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90192-4)
- Chen, Z., Huang, S., Chang, Y., Wang, Y., Shih, C., & Ren, D. (2019). Neuroptera – Lacewings. In *Rhythms of Insect Evolution: Evidence from the Jurassic and Cretaceous in Northern China* (p. 285). Dong Ren (Editor), Chungkun Shih (Editor), Taiping Gao (Editor), Yongjie Wang (Editor), Yunzhi Yao (Editor).
- Costa Dantas, P., Pinto Santos, H., Bozdogan, H., Serrao, J., & Carvalho, G. (2020). Morphology of the male and female reproductive tracts of virgin mated *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). *Microsc Res Tech.*, 1–9. <https://doi.org/10.1002/jemt.23645>
- Costa Dantas, P., Pinto Santos, H., Serrao, J., & Carvalho, G. (2021). Anatomy and histology of the alimentary canal of larvae and adults of *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). *Arthropod Structure & Development*, 60, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2020.1010001467-8039>.
- Garzón-Orduña, I., Winterton, S., Jiang, Y., Breitzkreuz, L., Duelli, P., Engel, M., Penny, N., Tauber, C., Mochizuki, A. & Liu, X. (2019). Evolution of green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae): a molecular supermatrix approach. *Syst Entomol*, 44. 499–513. <https://doi.org/10.1111/syen.12339>
- Gerth, M., Wolf, R., Bleidorn, C., Richter, J., Sontowski, R., Unrein, J., Schlegel, M., & Gruppe, A. (2017). Green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) are commonly associated with a diversity of rickettsial endosymbionts. *Zoological Letters*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/s40851-017-0072-9>
- Happ, G. M. (1992). Maturation of the Male Reproductive System and its Endocrine Regulation. *Annual Review of Entomology*, 37(1), 303–320. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.001511>
- Ito, K., Shinomiya, K., Ito, M., Armstrong, J., Boyan, G., Hartenstein, V., Harzsch, S., Heisenberg, M., Homberg, U., Jenett, A., Keshishian, H., Restifo, L., Rössler, W., Simpson, J., Strausfeld, N., Strauss, R., & Vosshall, L. (2014). *A Systematic Nomenclature for the Insect Brain*. *Neuron*, 81(4), 755–765. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.017>
- Principi, M. (1948). Contributi allo studio dei Neurotteri Italiani. VIII. Morfologia, anatomia e funzionamento degli apparati genitali nel gen. *Chrysopa* Leach (*Chrysopa septempunctata* Wesm. e *C. formosa* Brauer). *Bollettino dell'Istituto di Entomologia della Università degli Studi di Bologna* 17:316–362
- Reguilón, C., González Olazo, E., & Núñez Campero, S. (2006). Morfología de los estados inmaduros de *Chrysoperla argentina* (Neuroptera: Chrysopidae). *Acta zoológica lilloana*, 50(1–2), 31–39.
- Ribeiro, A., Castellani, M., Moreira, A., Perez-Maluf, R., Silva, C. & Santos, A. (2013). Diversidade e sazonalidade de crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae) em plantas de urucum. *Horticultura Brasileira*, 31(4), 636–641. <https://doi.org/10.1590/s0102-05362013000400021>
- Ribera, I. and Melic, A., 2015. Orden Neuroptera. *Revista IDE@ - SEA*, Issue 58, pp. 1-12
- Schneider, M., Sanchez, N., Pineda, S., Chi, H., & Ronco, A. (2009). Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach. *Chemosphere*, 76(10), 1451–1455. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.05.029>
- Sehnal, F., and Rembold, H. (1985). Brain stimulation of juvenile hormone production in insect larvae. *Experientia*, 41(5), 684–685. <https://doi.org/10.1007/bf02007720>
- Strausfeld N. (2002). Organization of the honey bee mushroom body: representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. *The Journal of comparative neurology*, 450(1), 4–33. <https://doi.org/10.1002/cne.10285>
- Urquiza, S. (2021). Nociones Sobre La Estructura Y Evolución Del Sistema Nervioso De Algunos Invertebrados. *Rebiol*, 41(2), 256–276. Recuperado a partir de <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/4060>
- Vacacela, H., Alvarez- Zapata, A., Gonzales, A., Martins, E., Martinez, L., & Serrao, J. (2017). Anatomy and histology of the alimentary canal and ovarioles of *Ceraeochrysa cubana* adult. *Bulletin of Insectology*, 70(2).
- Villa, M., Somavilla, I., Santos, S., López-Sáez, J., & Pereira, J. (2019). Pollen feeding habits of *Chrysoperla carnea* adults in the olive grove agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 283. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.106573>
- Villalobos, A., Agudelo, J., & Arrieta, D. (2011). *Apis Mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera) Histology As An Entomologic Contribution Part II: Musculature, Blood And Nervous System. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*. 15(1),231–245.
- Winterton, S., and de Freitas, S. (2006). Molecular phylogeny of the green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae). *Australian Journal of Entomology*, 45(3), 235–243. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.2006.00537.x>
- Withycombe, C. (1922). Notes on the biology of some British Neuroptera (Planipennia). *Transactions of the Entomological*

Society of London 1922:501-594.

Woolfolk, S., Cohen, A. & Inglis, G. (2004). Morphology of the Alimentary Canal of *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae) Adults in Relation to Microbial Symbionts. *Annals of the entomological society of america*, 97(4), pp. 769-808.

Zhao, C., Ang, Y., Wang, M., Gao, C., Zhang, K., Tang, C., Liu, X., Li, M., Yang, D., & Meier, R. (2020). Contribution to understanding the evolution of holometaboly: transformation of internal head structures during the metamorphosis in the green lacewing *Chrysopa pallens* (Neuroptera: Chrysopidae). *BMC Evolutionary Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12862-020-01643-2>

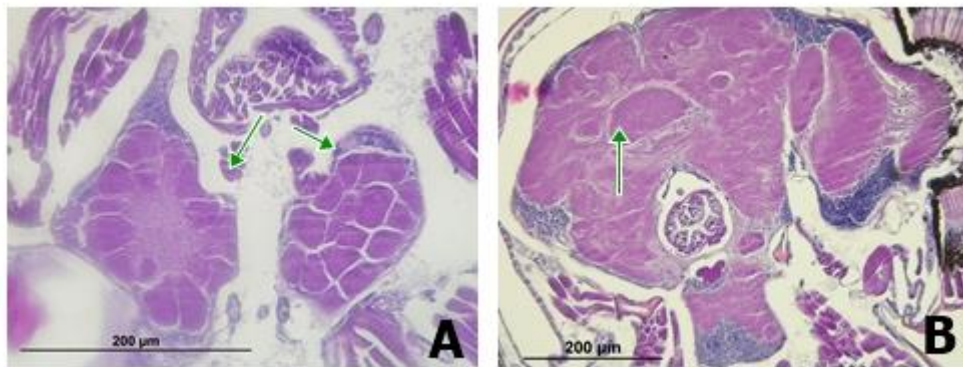


Figura 34: Sección anatómica de la cabeza de macho de *Chrysoperla argentina*. A: Detalle del lóbulo antenal con los glomérulos señalados con flecha. B: Detalle del complejo central señalado con flecha. Técnica de coloración HE.

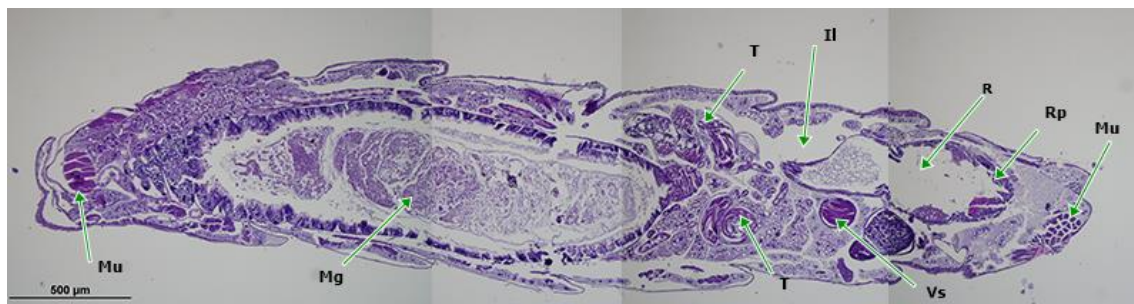


Figura 35: Corte longitudinal de abdomen de *Chrysoperla argentina*. Intestino medio (Mg), ileon (Il), recto (R), ampolla rectal (Rp), testículos (T), vesícula seminal (Vs), músculos (Mu). Técnica de coloración HE.

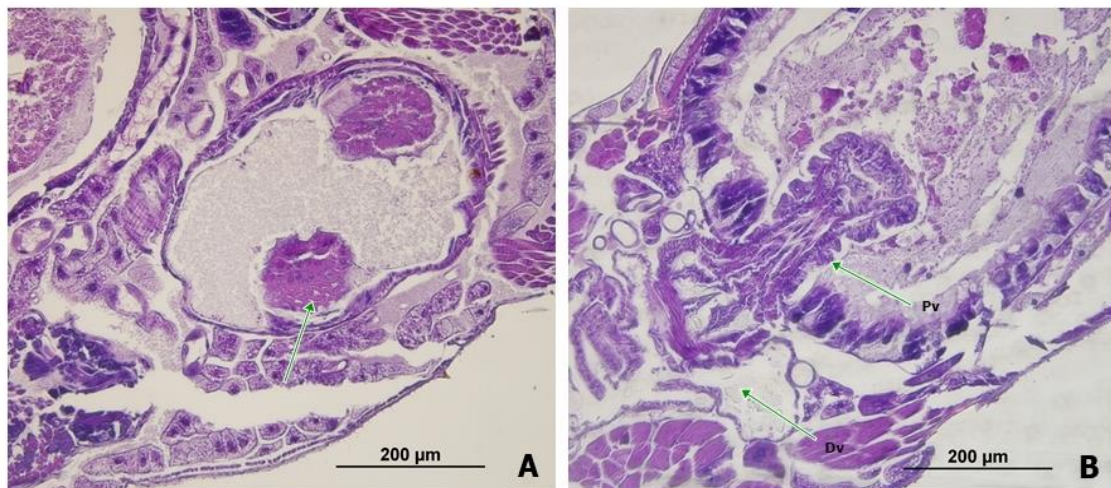


Figura 36: Detalle de partes del Sistema digestivo de *Chrysoperla argentina*. Las flechas indican: A: ampolla rectal; B: divertículo (Dv); proventrículo (Pv). Técnica de coloración HE.

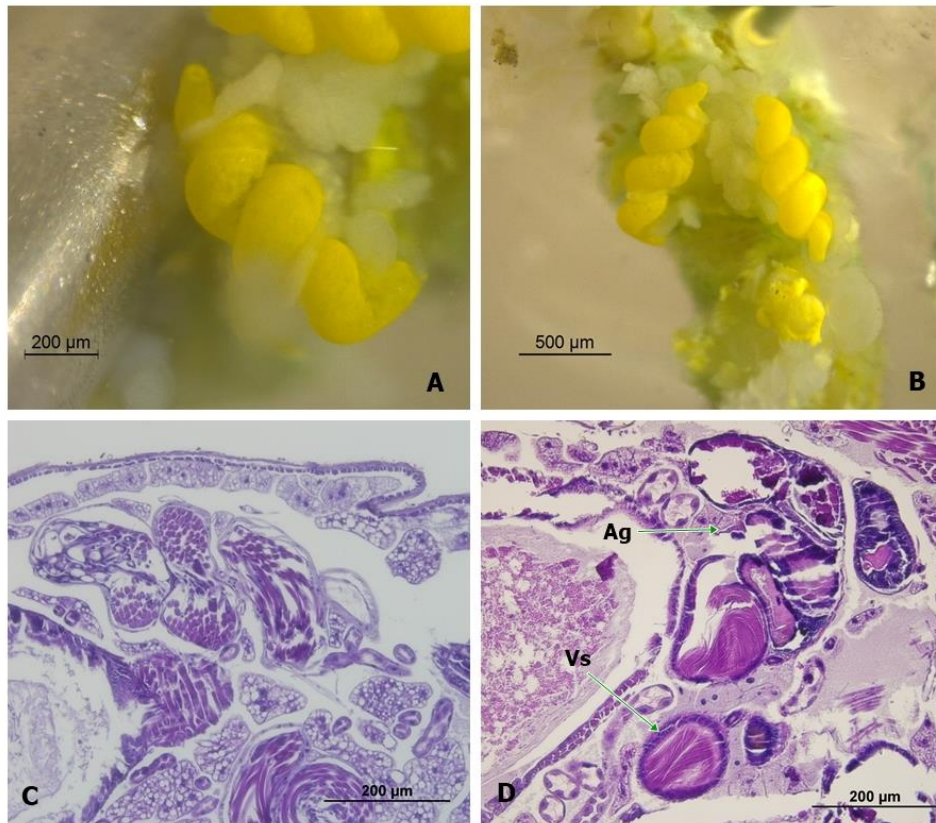


Figura 3716: Testículos y glándulas accesorias de *Chrysoperla argentina*. A-B: Testículos de *C. argentina* coloración natural (dentro del abdomen). C: Corte histológico de testículo. Técnica de coloración HE. D: vesículas seminales (Vs) and glándulas anexas (Ag). Técnica de coloración HE.

Citogenética de *Chrysoperla argentina* (Neuroptera: Chrysopidae)

Introducción

Los estudios citogenéticos en Chrysopidae indican que la fórmula cariotípica más comúnmente observada es $2n=12$, con un sistema cromosómico sexual XY/XX (Hirai, 1957; Blackmon *et al.*, 2016). Los cromosomas sexuales suelen ser de tamaño similar, aunque en algunos casos el cromosoma X puede ser mayor que el cromosoma Y (MacLeod, 1969). Estudios meióticos realizados en las especies presentes en Argentina han confirmado que *C. externa* y *C. argentina* presentan esta fórmula cariotípica (Andrada, 2012).

Sin embargo, se desconocen detalles específicos sobre el cariotipo de *C. argentina*. Por ello, el objetivo de este trabajo fue analizar el cariotipo y describir el ciclo celular mitótico de *C. argentina*, complementado con un análisis de la morfometría cromosómica. Esta información será clave para futuras evaluaciones de los daños citogenéticos inducidos por agroquímicos.

Materiales y métodos

El material biológico fue criado según lo descrito en la sección materiales y métodos generales.

La obtención de cromosomas se llevó a cabo extrayendo 200 huevos de los cartones que actúan de sustrato en las colonias. Los huevos fueron seleccionados al azar, y se aplicó la técnica de confección de preparados citogenéticos, tal como se describe en la sección de materiales y métodos generales. Adicionalmente, se extrajeron otros 200 huevos, se seleccionaron al azar y se llevó a cabo la técnica determinación de complemento cromosómico (sección 3.2.2), según los procedimientos detallados en la sección de materiales y métodos generales.

Todos los preparados fueron observados mediante un microscopio Olympus BX51 con cámara Olympus DP71, y las imágenes fueron capturadas utilizando el programa DP controller 3.3.1.292.

Los cromosomas de *C. argentina* fueron medidos al final de la profase mitótica. Estas mediciones se llevaron a cabo utilizando el software libre IdeoKar 1.3, que permitió obtener las imágenes cariotípicas. Las ediciones de las fotos fueron realizadas con Inkscape 0.92.3. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando la versión de prueba de Minitab 18.

Los cromosomas que exhibieron bandeo natural fueron emparejados en pares. Aquellos cromosomas que no manifestaron una diferenciación marcada fueron agrupados según el criterio de un aporte cromosómico similar, y la relación de dicho aporte entre los cromosomas que se mantuvo constante a lo largo de las diversas imágenes.

Resultados

Las células somáticas presentaron un tamaño de $8,65 \mu\text{m}$ ($\pm 2,65 \mu\text{m}$). Durante la interfase, se observó una membrana nuclear bien diferenciada con cuerpos heteropícnóticos en su interior.

Chrysoperla argentina presentó 12 cromosomas sin evidencia de constricción primaria, y la longitud cromosómica total fue de $69,07 \mu\text{m}$ ($\pm 14,68 \mu\text{m}$). Tras el tratamiento con colchicina, los cromosomas mostraron profases con una condensación laxa que facilitó la diferenciación de los cromosomas producto de una picnosis diferencial. En relación al sistema cromosómico sexual XY, se observó que el cromosoma X exhibió un tamaño significativamente mayor al Y (Figura 38).

Los cromosomas fueron organizados de mayor a menor, identificándose el par 1 y el par 3 mediante un bandeo natural en los cromosomas. Los demás se agruparon según similitudes de tamaño. Los dos cromosomas que carecían de pares homólogos, fueron considerados como el par sexual X/Y. El par 1, compuesto por cromosomas de gran tamaño, mostró un bandeo cromosómico natural a lo largo de todo el cromosoma, con un largo total de $15,26 \mu\text{m}$ ($\pm 3,15 \mu\text{m}$). Dentro del par, se encontró el cromosoma somático de mayor tamaño con un largo total de $8 \mu\text{m}$ ($\pm 0,56 \mu\text{m}$). El par 2 no presentó ningún patrón de bandeo específico, con un largo total de $14,40 \mu\text{m}$ ($\pm 3,66 \mu\text{m}$). El par 3 exhibió una heteropícnosis positiva en los telómeros, con un largo total de $10,85 \mu\text{m}$ ($\pm 2,64 \mu\text{m}$). Los pares 4 y 5 tuvieron largos totales de $10,46 \mu\text{m}$ ($\pm 3,36 \mu\text{m}$) y $7,06 \mu\text{m}$ ($\pm 2,21 \mu\text{m}$), respectivamente. En ambos pares, no se observó un patrón de bandeo. El par 1 presentó al cromosoma somático de menor tamaño con un largo de $3,55 \mu\text{m}$ ($\pm 0,27 \mu\text{m}$) (Figura 39).

El par sexual X/Y estuvo conformado por dos cromosomas extremos sin tamaños homólogos. El largo total fue de $13,31 \mu\text{m}$ ($\pm 2,67 \mu\text{m}$). El cromosoma Y aportó al genoma total el 4.84% ($\pm 1,30$) con un largo total de $3,67 \mu\text{m}$ ($\pm 1,30 \mu\text{m}$), mientras que el cromosoma X contribuyó con el 15,75% ($\pm 0,88$) al genoma con un largo total de $10,85 \mu\text{m}$ ($\pm 1,02 \mu\text{m}$) (Gráfico 27).

Discusión

Las dos especies estudiadas de crisopas presentan fórmula cromosómica de $2n=10A+XY$ ($n=5+X$ (hembras) y $n=5+Y$ (machos)) similar a lo descrito en otras especies de esta familia (Asana & Kichijo, 1936; Kichijo, 1934). Los cromosomas tienen forma de bastón sin constricción primaria con una variación gradual de tamaño, como el caso de las especies *Chrysopa Formosa* (Brauer, 1851) (Neuroptera: Chrysopidae), *Chrysopa sapporensis* (Okamoto, 1914) (Neuroptera: Chrysopidae) (Kichijo, 1934), *Chrysopa perla* (Linnaeus, 1758) (Neuroptera: Chrysopidae) y *Pseudomallada prasinus* (Burmeister, 1839) (Neuroptera: Chrysopidae) (Neville & de Beaumont; 1933).

En metafase los cromosomas se agrupan en la placa ecuatorial de forma ordenada y en vista superior se observan agrupados de forma radial igual que lo descrito para para *C. perla* (Neville & de Beaumont; 1933)

En ambas especies los cromosomas sexuales presentan un dimorfismo marcado. El cromosoma X se encuentra entre los pares cromosómicos de mayor tamaño y el cromosoma Y entre los cromosomas más pequeños, al igual que en otras especies de Chrysopidae como *Chrysoperla carnea*, *C. formosa* (Kichijo, 1934) y *C. perla* (Neville & de Beaumont; 1933).

En este trabajo, los cromosomas se ordenan de mayor a menor y se determina cada par a partir de este ordenamiento a fin de establecer su cariotipo. Este criterio se determinó dado que, al no existir datos previos acerca de cómo denominar a los cromosomas de estas especies, se optó por los ordenamientos tradicionales usados para otros organismos. Este es el primer trabajo en determinar una nomenclatura de los cromosomas de la especie.

En este estudio, se adoptó un enfoque de ordenamiento de cromosomas de mayor a menor, estableciendo así la nomenclatura para cada par, dado que no existían datos previos al respecto. En este trabajo se propone por primera vez una nomenclatura e identificación para los cromosomas de estas especies. En particular, *C. externa* muestra un bandeo cromosómico natural que permite distinguir tres de los seis pares que componen su genoma. Destaca el par dos, con un aporte relativo al genoma de aproximadamente 18%, presentando además un satélite no descrito en estudios previos de esta especie. En *C. argentina*, la diferenciación de los pares es más compleja, ya que solo dos pares cromosómicos presentan bandeo natural. El par sexual se construyó con dos cromosomas extremos sin un par homólogo, considerándose al de mayor tamaño como el cromosoma X, en concordancia con el dimorfismo sexual característico de la familia (Neville & de Beaumont, 1933; Kichijo, 1934).

El aporte cromosómico en *C. externa* es más homogéneo en comparación con *C. argentina*, donde el par 1, par 2 y el par sexual contribuyen mayormente al material genético total. Esta

disparidad sugiere que el cariotipo de *C. argentina* tiende a ser bimodal. Además, se observa que la tasa de división en estos insectos es relativamente baja, alcanzando su pico a las 48 h de desarrollo, coincidiendo con la formación del embrión según lo descrito por Fernández Acevedo *et al.* (2020) (Capítulo 4, sección 4.1.1). A las 96 h, el embrión está totalmente formado y prácticamente sin cambios, resultando en una disminución significativa en la tasa de mitosis.

En resumen, este trabajo presenta, por primera vez, una propuesta de nomenclatura e identificación de los cromosomas de *C. externa* y *C. argentina*, acompañada de información detallada sobre su ciclo celular. Este aporte representa una contribución al campo de la citogenética de la familia Chrysoidae. Además, esta información es de suma utilidad para poder conocer el comportamiento normal de los cromosomas y analizar alejamientos de este patrón en determina condiciones ambientales.

Bibliografía

Andrada, A. R., Lozzia, M. E., González-Olazo, E., & Heredia, F. (2012). Estudios meióticos en dos especies de crisópidos (Chrysopidae: Neuroptera). *Acta zoológica lilloana*, 38-43.

Asana, J. J., & Kichijo, H. (1936). The Chromosomes of Six Species of Ant-lions (Neuroptera) (With 6 Textfigures). *北海道帝國大學理學部紀要*, 5(2), 121-136. [https://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/27230/1/13\(1_4\)_P219-223.pdf](https://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/27230/1/13(1_4)_P219-223.pdf)

Blackmon, H., Ross, L., & Bachtrog, D. (2016). Sex determination, sex chromosomes, and karyotype evolution in insects. *Journal of Heredity*, 108(1), 78-93. <https://doi.org/10.1093/jhered/esw047>

Fernández-Acevedo, V., Gil, S. R., & Schneider, M. I. (2022). Morpho-colorimetric characterization of the embryonic development of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Approach for its use for biological control strategy. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 81(4).

Hirai, H. (1957). A Cytotaxonomic Study of the Chrysopidae (Neuroptera) (With 12 Text-figures). *北海道大學理學部紀要*, 13(1-4), 219-223.

Kichijo, H. (1934). The Chromosomes of Some Neuropterous Insects Of The Family Chrysopidae (With 5 Figures in Text). *北海道帝國大學理學部紀要*, 3(2), 55-65.

MacLeod, E. (1969). Chromosome Cytology, Reproductive Behavior, and Ecology of the Insect Family Chrysopidae. *Research Project Report*. <https://journals.uwyo.edu/index.php/jhrs/article/view/4655>

Naville, A., & de Beaumont, J. (1933). *Recherches sur les chromosomes des Névroptères* (Vol. 29).

Reguilón, C., González Olazo, E., & Núñez Campero, S. (2006). Morfología de los estados inmaduros de *Chrysoperla argentina* (Neuroptera: Chrysopidae). *Acta zoológica lilloana*, 50(1-2), 31-39.

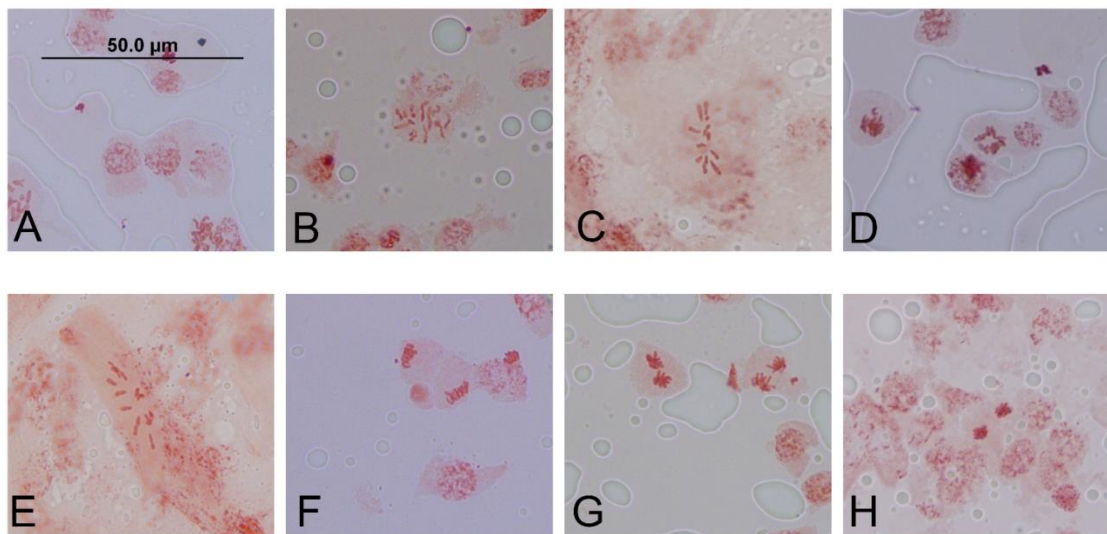


Figura 38: Ciclo mitótico de *Chrysoperla argentina*. A: Interfase mitótica. B: Profase. C: Profase tardía. D: Metafase. E: Anafase. F: Anafase tardía. G: Anafase tardía. H: Telofase.

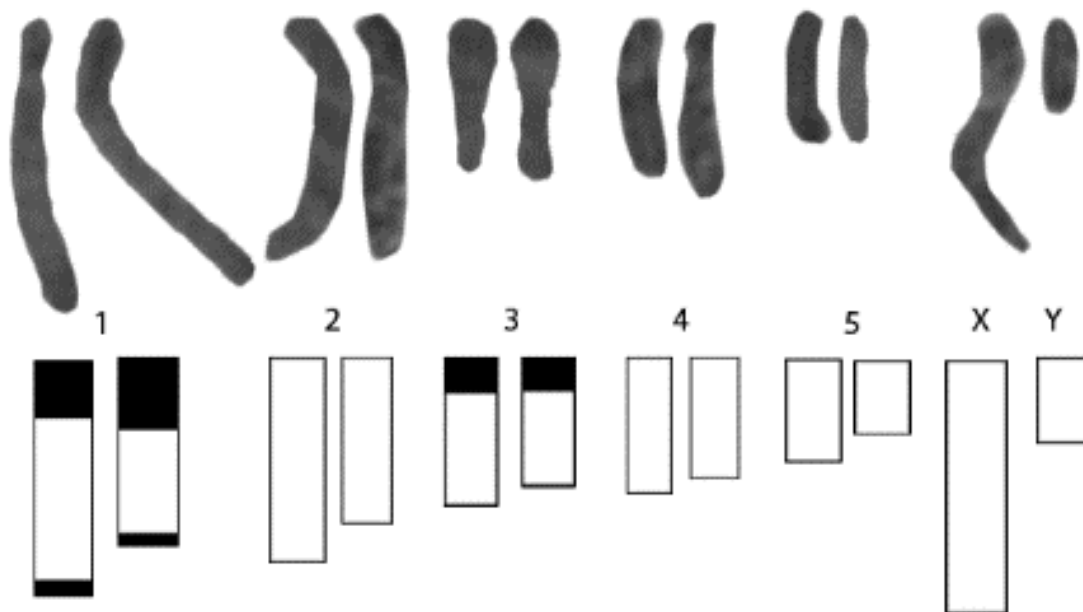


Figura 39: Cariotipo de *Chrysoperla argentina* obtenido a partir del análisis de las imágenes obtenidas a partir de preparaciones citogenéticas. Parte superior: Imagen real de los cromosomas. Parte inferior: Diagrama de los cromosomas obtenido de forma promedio de las imágenes evaluadas.

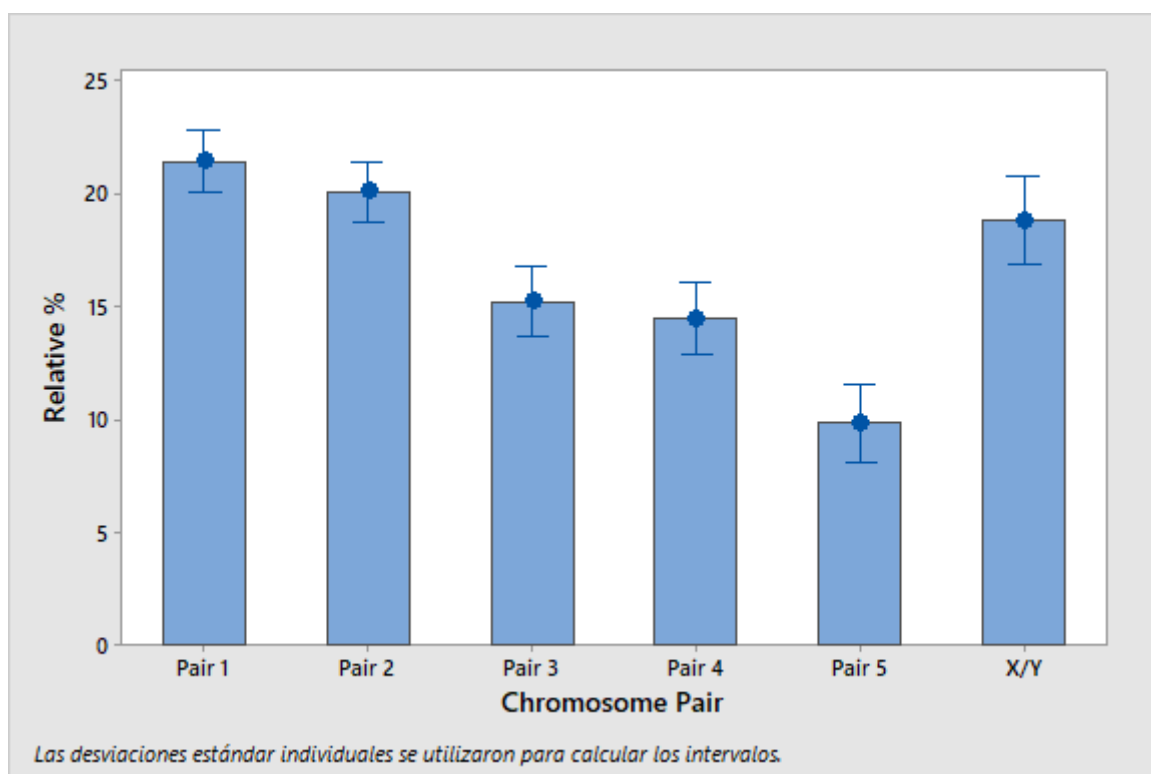


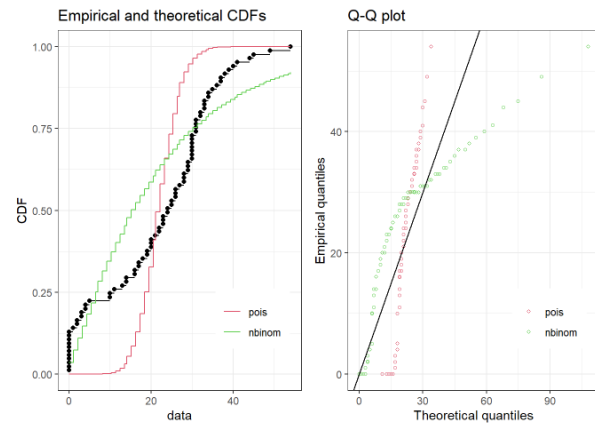
Gráfico 27: Aporte relativo de ADN de cada par cromosómico de la especie *Chrysoperla argentina*. Los puntos indican media estadística. IC de 95% de la media.

6.2 Salidas de R para diferentes los modelos

4.2.1 Toxicidad del imidacloprid (Matrero 35®) sobre pupas de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae)

Validación del modelo binomial para el análisis de fecundidad

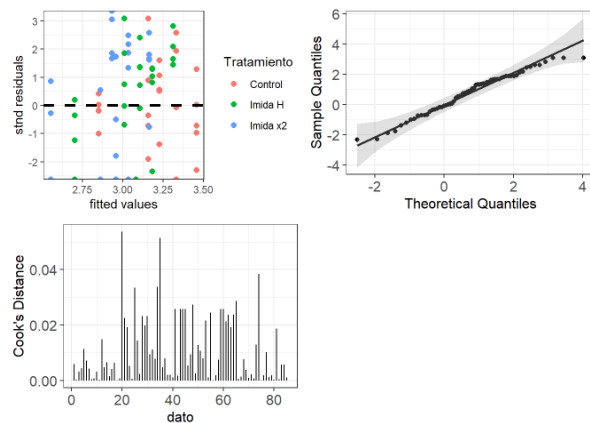
```
## Chi-squared statistic: 3.85e+09 92.9
## Degree of freedom of the Chi-squared distribution: 8 7
## Chi-squared p-value: 0.316e-17
## the p-value may be wrong with some theoretical counts < 5
## Chi-squared table:
##      obscounts theo 1-mle-pois theo 2-mle-nbinom
## <= 0      11      3.14e-08      3.04
## <= 5       8      1.62e-03     15.45
## <= 16       8      1.09e+01     26.05
## <= 20       8      2.39e+01     6.85
## <= 24       8      2.74e+01     5.73
## <= 28       9      1.62e+01     4.78
## <= 30      10      3.59e+00     2.08
## <= 33       9      2.24e+00     2.78
## <= 39       8      7.26e-01     4.52
## > 39       6      2.37e-02     13.72
##
## Goodness-of-fit criteria
##      1-mle-pois 2-mle-nbinom
## Akaike's Information Criterion    1349    701
## Bayesian Information Criterion    1352    706
```



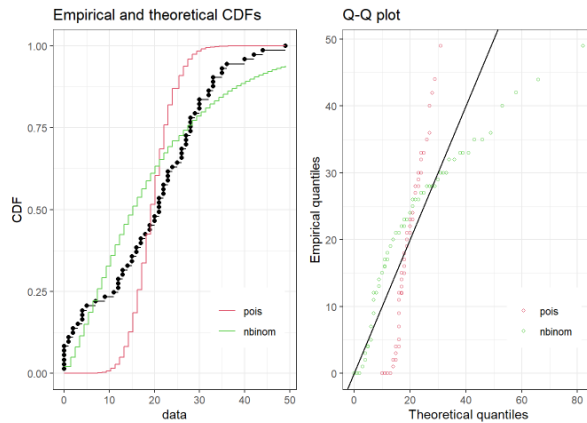
Modelo de Fecundidad

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: Negative Binomial(3486) ( log )
## Formula: n ~ Tratamiento + (1 | Pareja)
## Data: base0
##
##      AIC      BIC    logLik deviance df.resid
##      1276    1289     -633    1266      80
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -5.262 -2.425  0.776  1.849  6.272
##
## Random effects:
##      Groups Name      Variance Std.Dev.
## Pareja (Intercept) 0.0382  0.195
## Number of obs: 85, groups: Pareja, 6
##
## Fixed effects:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)    3.2107    0.0902   35.62 < 2e-16 ***
## TratamientoImida H -0.1471    0.0574   -2.56  0.01 *
## TratamientoImida x2 -0.2952    0.0595   -4.96 6.9e-07 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##      (Intr) TrtmIH
## TrtmntImdH -0.338
## TrtmntImdx2 -0.326  0.514
```

Validación del modelo



Validación del modelo binomial para el análisis de eclosión de huevos de F2



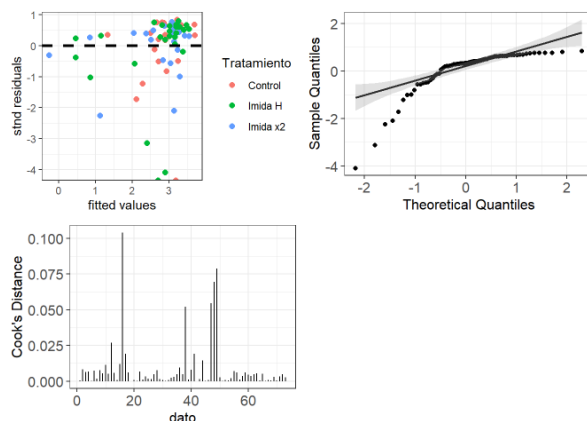
```
## Chi-squared statistic: 12504256 35.3
## Degree of freedom of the Chi-squared distribution: 7 6
## Chi-squared p-value: 0.378e-06
## the p-value may be wrong with some theoretical counts < 5
## Chi-squared table:
## obscounts theo 1-mle-pois theo 2-mle-nbinom
## <= 1      8      5.12e-06      3.52
## <= 7      8      7.98e-02     15.25
## <= 14     8      9.12e+00     16.48
## <= 19     9      2.85e+01     9.28
## <= 22     9      1.77e+01     4.58
## <= 26     8      1.31e+01     5.08
## <= 29     8      3.33e+00     3.14
## <= 33     8      1.05e+00     3.43
## > 33     7      1.32e-01     12.23
##
## Goodness-of-fit criteria
##                               1-mle-pois 2-mle-nbinom
## Akaike's Information Criterion    1006      583
## Bayesian Information Criterion    1009      588
```

Modelo de eclosión de huevos de F2

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: Negative Binomial(7.77) ( log )
## Formula: Emergidos ~ Tratamiento + offset(log(Total)) + (1 | Pareja)
## Data: base
##
##      AIC      BIC    logLik deviance df.resid
##      510      522     -250      500      68
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -2.423 -0.265  0.250  0.516  0.799
##
## Random effects:
## Groups Name      Variance Std.Dev.
## Pareja (Intercept) 0          0
## Number of obs: 73, groups: Pareja, 6
##
## Fixed effects:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)   -0.2842    0.0902   -3.15   0.0016 **
## TratamientoImida H    0.0445    0.1241    0.36   0.7198
## TratamientoImida x2   0.0212    0.1292    0.16   0.8698
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##      (Intr) TrtmImH
## TrtmImHx2 -0.727
## TrtmImHx2 -0.698 0.507
## optimizer (Nelder-Mead) convergence code: 0 (OK)
## boundary (singular) fit: see help('isSingular')
```

```
##
## Call:
## MASS::glm.nb(formula = Emergidos ~ Tratamiento + offset(log(Total)),
## data = base, init.theta = 7.76596964, link = log)
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)   -0.2842    0.0905   -3.14   0.0017 **
## TratamientoImida H    0.0445    0.1248    0.36   0.7214
## TratamientoImida x2   0.0212    0.1297    0.16   0.8702
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## (Dispersion parameter for Negative Binomial(7.77) family taken to be 1)
##
## Null deviance: 104.32 on 72 degrees of freedom
## Residual deviance: 104.19 on 70 degrees of freedom
## AIC: 508.2
##
## Number of Fisher Scoring iterations: 1
##
##              Theta: 7.77
##              Std. Err.: 2.51
##
## 2 x log-likelihood: -500.22
```

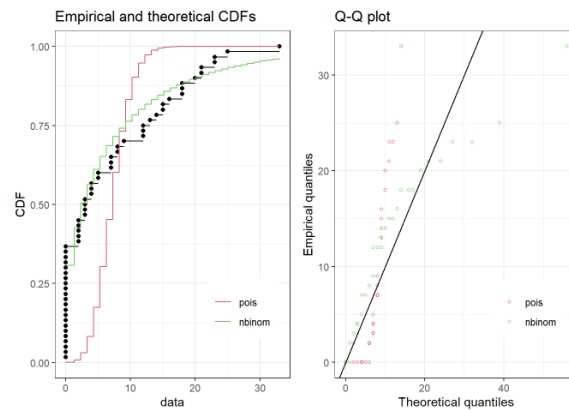
Validación del modelo



4.2.2 Toxicidad del imidacloprid (Matrero 35®) sobre tercer estadio larval y estadio prepupa de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae)

Validación del modelo binomial para el análisis de fecundidad

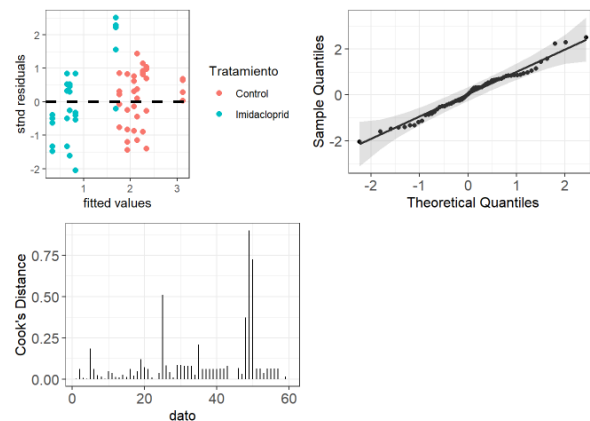
```
## Chi-squared statistic: 15206 7.57
## Degree of freedom of the Chi-squared distribution: 4 3
## Chi-squared p-value: 0 0.0558
## the p-value may be wrong with some theoretical counts < 5
## Chi-squared table:
##      obscounts theo 1-mle-pois theo 2-mle-nbinom
## <= 0      22      0.05563      18.45
## <= 3       9      4.90267      15.38
## <= 7       8     31.11353       9.07
## <= 13      7     23.17357       7.05
## <= 18      7      0.74703       3.31
## > 18      7      0.00756       6.75
##
## Goodness-of-fit criteria
##      1-mle-pois 2-mle-nbinom
## Akaike's Information Criterion      755      348
## Bayesian Information Criterion      758      352
```



Modelo de fecundidad

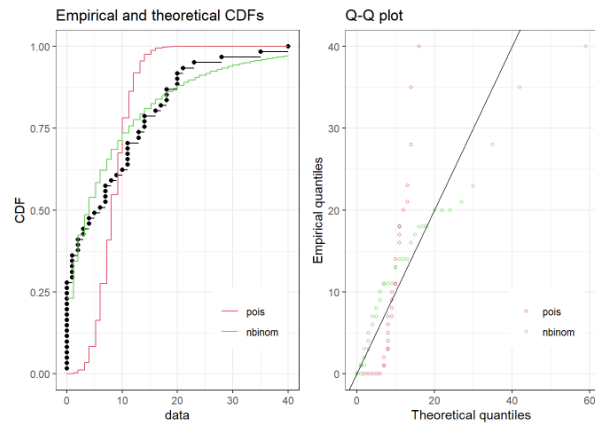
```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: Negative Binomial(0.542) ( log )
## Formula: n ~ Tratamiento + (1 | Pareja)
## Data: base0
##
##      AIC      BIC    logLik deviance df.resid
##      345      353     -168     337       56
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -0.718 -0.650 -0.325  0.425  2.571
##
## Random effects:
##      Groups Name      Variance Std.Dev.
## Pareja (Intercept) 0.302    0.549
## Number of obs: 60, groups: Pareja, 7
##
## Fixed effects:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)      2.227    0.319    6.98   3e-12 ***
## TratamientoImdacloprid -1.439    0.490   -2.94   0.0033 **
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##      (Intr)
## TrtmntImdc1 -0.423
```

Validación del modelo



Validación del modelo binomial para el análisis de eclosión de huevos de F2

```
## Chi-squared statistic: 20471 4.22
## Degree of freedom of the Chi-squared distribution: 4 3
## Chi-squared p-value: 0 0.239
## the p-value may be wrong with some theoretical counts < 5
## Chi-squared table:
##      obscounts theo 1-mle-pois theo 2-mle-nbinom
## <= 0      17      0.0147      14.10
## <= 2       8      0.6340      11.72
## <= 7      10     24.2517      14.17
## <= 11     8     27.7406      6.21
## <= 17     7      8.2106      5.67
## > 17     11      0.1484      9.13
##
## Goodness-of-fit criteria
##      1-mle-pois 2-mle-nbinom
## Akaike's Information Criterion      808      381
## Bayesian Information Criterion      810      385
```

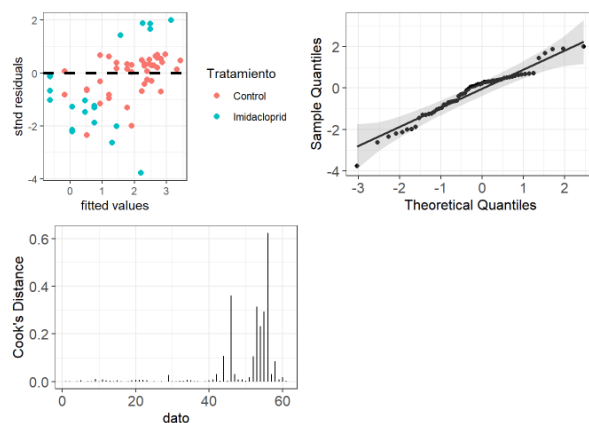


Modelo de eclosión de huevos de F2

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: Negative Binomial(146) ( log )
## Formula: Emergidos ~ Tratamiento + offset(log(Total)) + (1 | Pareja
## Data: base
##
##      AIC      BIC    logLik deviance df.resid
##      284      292     -138      276        57
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -2.641 -0.889 -0.270  0.474  1.746
##
## Random effects:
##      Groups Name      Variance Std.Dev.
## Pareja (Intercept) 0.0395  0.199
## Number of obs: 61, groups: Pareja, 7
##
## Fixed effects:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)   -0.1692    0.0922  -1.84   0.066 .
## TratamientoImidacloprid -0.5762    0.1389  -4.15 3.4e-05 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##      (Intr)
## TrtmntImdc1 -0.194
```

```
##
## Call:
## MASS::glm.nb(formula = Emergidos ~ Tratamiento + offset(log(Total)),
## data = base, control = glm.control(maxit = 50), init.theta = 17.59354792,
## link = log)
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)   -0.1770    0.0665  -2.66  0.0078 **
## TratamientoImidacloprid -0.4622    0.1449  -3.19  0.0014 **
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## (Dispersion parameter for Negative Binomial(17.6) family taken to be 1)
##
##      Null deviance: 101.809 on 60 degrees of freedom
## Residual deviance:  90.467 on 59 degrees of freedom
## AIC: 289.4
##
## Number of Fisher Scoring iterations: 1
##
##              Theta: 17.6
##              Std. Err.: 12.7
##
## 2 x log-likelihood: -283.4
```

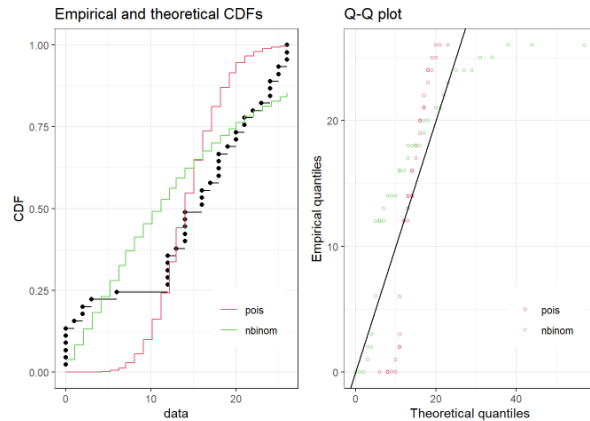
Validación del modelo



4.2.3 Toxicidad del imidacloprid (Confidor OD®) y spirotetramat (Movento®) sobre larvas de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) alimentadas con presas tratadas

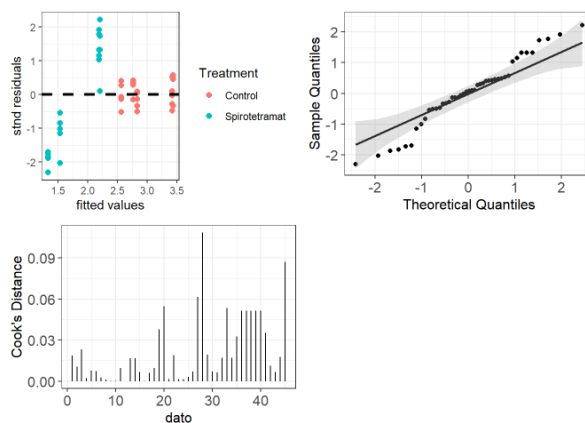
Validación del modelo binomial para el análisis de fecundidad

```
## Chi-squared statistic: 1201566 27.5
## Degree of freedom of the Chi-squared distribution: 4 3
## Chi-squared p-value: 0 4.56e-06
## the p-value may be wrong with some theoretical counts < 5
## Chi-squared table:
##      obscounts theo 1-mle-pois theo 2-mle-nbinom
## <= 0      6      0.00003      1.68
## <= 12     10     15.16235     23.59
## <= 14      6      9.44000      2.76
## <= 18      8     14.53658      4.51
## <= 22      6      4.97175      3.38
## > 22      9      0.88128      9.09
##
## Goodness-of-fit criteria
##              1-mle-pois 2-mle-nbinom
## Akaike's Information Criterion      500      335
## Bayesian Information Criterion      502      338
```



Modelo de fecundidad

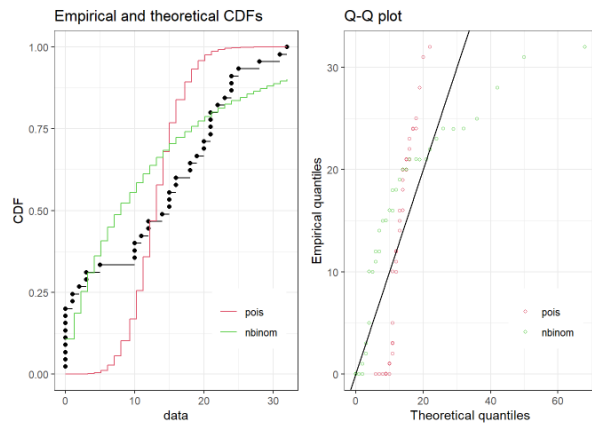
```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: Negative Binomial(3.39) ( log )
## Formula: n ~ Treatment + (1 | Pareja)
## Data: base0
##
##      AIC      BIC    logLik deviance df.resid
##      318      326     -155      310       41
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.397 -0.791 -0.283  0.653  2.125
##
## Random effects:
##      Groups Name      Variance Std.Dev.
## Pareja (Intercept) 0.165      0.406
## Number of obs: 45, groups: Pareja, 5
##
## Fixed effects:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)      2.999      0.218  13.74 < 2e-16 ***
## TreatmentSpirotetramat -1.233      0.221  -5.58 2.4e-08 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##      (Intr)
## TrtmntSprtt -0.342
```



4.2.4 Toxicidad del imidacloprid (Confidor OD®) y del spirotetramat (Movento®) sobre el ciclo de vida de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae)

Validación del modelo binomial para el análisis de fecundidad

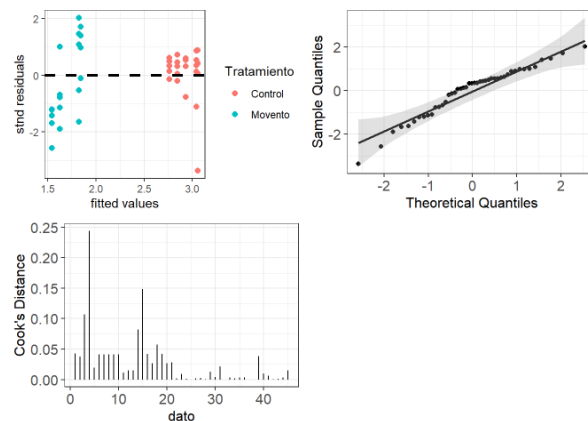
```
## Chi-squared statistic: 761902 19.6
## Degree of freedom of the Chi-squared distribution: 4 3
## Chi-squared p-value: 0 0.000205
## the p-value may be wrong with some theoretical counts < 5
## Chi-squared table:
##      obscounts theo 1-mle-pois theo 2-mle-nbinom
## <= 0      9      1.06e-04      4.82
## <= 5      6      4.97e-01      13.49
## <= 12     6      2.06e+01      10.40
## <= 16     6      1.67e+01      3.84
## <= 21     9      6.65e+00      3.48
## > 21     9      6.12e-01      8.97
##
## Goodness-of-fit criteria
##                                     1-mle-pois 2-mle-nbinom
## Akaike's Information Criterion      602      327
## Bayesian Information Criterion     604      330
```



Modelo de fecundidad

```
## Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace
## Approximation) [glmerMod]
## Family: Negative Binomial(1.15) ( log )
## Formula: n ~ Tratamiento + (1 | Pareja)
## Data: base0
##
##      AIC      BIC    logLik deviance df.resid
##      320      327     -156      312       41
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.0451 -0.7776 -0.0109  0.5043  2.3564
##
## Random effects:
##      Groups Name      Variance Std.Dev.
## Pareja (Intercept) 0.0447  0.211
## Number of obs: 45, groups: Pareja, 5
##
## Fixed effects:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)      2.924      0.215   13.58 < 2e-16 ***
## TratamientoMovento -1.217      0.354   -3.44  0.00059 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Correlation of Fixed Effects:
##              (Intr)
## TratmtntMovento -0.540
```

Validación del modelo



6.3 Publicaciones y presentaciones derivadas de la tesis

Publicados

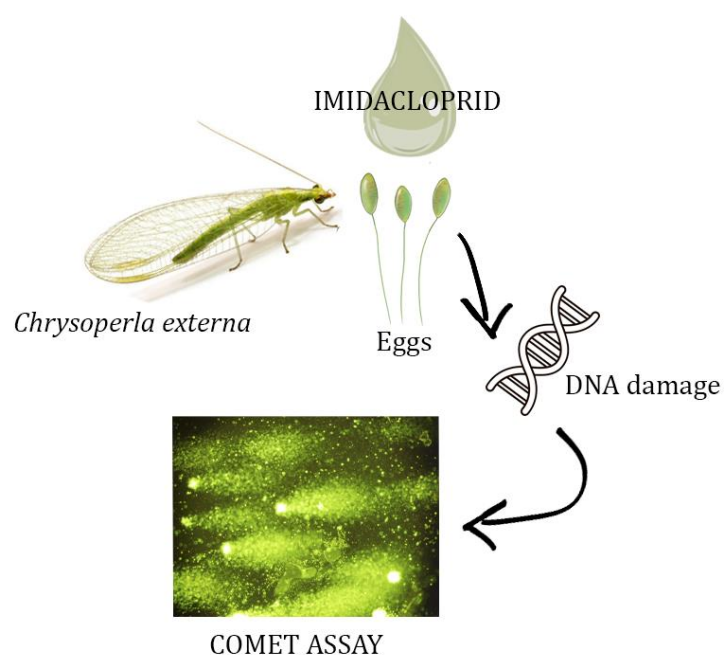
Evaluation of imidacloprid (Confidor OD®) genotoxicity in *Chrysoperla externa* eggs (Neuroptera: Chrysopidae) through comet assay.

Fernández Acevedo V, Rodríguez Gil S, Seoane A, Minardi G, M.I. Schneider.

Chemosphere, Volume 356,2024,141819,ISSN 0045-6535,

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141819>.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653524007124>)



Abstract: The comet assay allows the analysis of DNA damage caused by different genotoxins. This assay has recently gained interest because of its ease of studying the interactions of xenobiotics with different organisms. *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) is a species of great economic relevance because it is a predator of major agricultural pests during its larval stage. Neonicotinoids are the most important chemical class of insecticides introduced into markets. A previous imidacloprid toxicity assessment on *C. externa* showed that this neonicotinoid insecticide reduced the egg viability. The objective of this study was to analyze the genotoxicity of Confidor OD® (imidacloprid 20% a.i., LS, Bayer CropScience) on the biological control agent *C. externa* at DNA level using the comet assay as an ecotoxicological biomarker. A comet assay

protocol has been developed for this species at first time. For the bioassays, the commercial product formulated Confidor OD® was used at two concentrations: 100 and 180 mg/l of the active ingredient. Selected eggs were dipped in a Confidor OD® solution for 15 s. Descriptors evaluated in the comet assay were damage index, % DNA damage, and tail length. The damage index did not show any significant differences between the different concentrations evaluated, but differences were observed for tail length, because at higher concentrations of Confidor OD®, there were greater DNA breaks. The DNA of the cells from treated eggs analyzed at 48 h and 96 h of development showed the same % DNA damage; that is, they had no recovery capacity. Application of Confidor OD® to *C. externa* eggs produced irreparable breaks at the DNA level. The technique adjusted for *C. externa* can be used in other beneficial insects to study pesticide genotoxicity using a comet assay.

Keywords: Pesticides; Neonicotinoid; Predator; Lacewings; Agrochemical; ADN damage

Morpho-colorimetric characterization of the embryonic development of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Approach for its use for biological control strategy

Fernández Acevedo V, Rodríguez Gil S, M.I. Schneider.

Revista de la Sociedad Entomológica Argentina 81 (4)

Abstract: Integrated Pest Management (IPM) is a pest control approach that considers all available strategies and their subsequent integration for pest control. The Biological Control (BC) of pests through the use of natural enemies is an outstanding strategy. Biological control by generalist predators has had a highlighted relevance in the last decade. This strategy by augmentation demands mass rearing of these organisms. In the Neotropical Region *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) is of great importance for its high voracity and its wide range of hosts. The aim of this study was to describe the external changes of the eggs, especially in colour and shape, associated with the intrachorionic development of *C. externa* embryos, to characterize them morphocolorimetrically. A practical key from its embryonic development determination was constructed as a tool for mass rearing technique, providing valuable information that could facilitate BC implementation for IPM programs in developing regions.

Keywords: Biological control, Egg, Embryonic phases, Integrated pest management, Mass-rearing.

Toxicidad de insecticidas hacia el depredador generalista *Chrysoperla externa* (neuroptera: chrysopidae) incorporando citogenética y morfometría como herramientas de diagnósticos.

Fernández Acevedo V, Rodríguez Gil S, M.I. Schneider.

Investigación Joven, 6(Especial), 129–130. Recuperado a partir de <https://revistas.unlp.edu.ar/InvJov/article/view/6999>

Resumen: El control de plagas en Argentina se realiza principalmente utilizando el control químico mediante el uso de plaguicidas. Esta estrategia de control desde el punto de vista ambiental impacta negativamente sobre organismos no blanco y en particular en relación a los agroecosistemas sobre la biodiversidad de los mismos, reduciendo las poblaciones de enemigos naturales de las plagas de los cultivos. En estudios previos se ha evaluado al depredador *Chrysoperla externa* como organismo diagnóstico, por ser de fácil cría en laboratorio y por esto elegida como modelo de estudio. Se ha avanzado en determinar el efecto de plaguicidas convencionales (organoclorados, piretroides y neonicotinoides) y algunos biorracionales (metoxifenocida, piriproxifen, spinosad y azadiractina) sobre este depredador, utilizando puntos finales de evaluación toxicológicos relacionados a aspectos bioecológicos de este organismo. (supervivencia, desarrollo y reproducción) Con esta información de base (toxicología y susceptibilidad), e incorporando la citogenética y la morfometría como herramientas de diagnóstico, se plantea evaluar la sensibilidad de estas herramientas novedosas de evaluación ecotoxicológica en artrópodos terrestres. Por otro lado, y de cara a una agricultura sustentable se plantea avanzar en la búsqueda de selectividad de insecticidas, evaluando insecticidas con modo de acción novedosa y de registro reciente en el país.

Palabras clave: Ecotoxicología, *Chrysoperla*, Enemigo natural

En evaluación

Internal anatomy of *Chrysoperla externa* and *Chrysoperla argentina* (Insecta: Neuroptera)

VF Acevedo, SR Gil, Vargas,S; Topa, E; M Schneider – 2024

Brazilian Archives of Biology and Technology

Abstract: The Chrysopidae family comprises 1416 species. This family is relevant to agriculture because several species are biological pest control agents during their larval or adult stages. In Argentina, three species of *Chrysoperla* commonly found in agroecosystems have been cited:

C. externa, *C. asoralis*, and *C. argentina*. This study describes the general internal anatomy of male of *C. externa* and *C. argentina*, focusing on the reproductive system to increase the existing knowledge and provide baseline information for future taxonomic studies. Dissections and histological sections were performed on male specimens' abdomens, testes, and heads. The central complex and antennal lobes in the brain are more developed in *C. argentina* than in *C. externa*. The digestive system is similar in both species, except for the number of rectal pads, four in *C. externa* and only two in *C. argentina*. *Chrysoperla argentina* has more muscle fibers than *C. externa*, but the amount of abdominal fat body in both species is similar. The testes in both species are spiral-shaped and have four turns, with spermatozoa grouped in bundles and stored in large seminal vesicles. The description of the brain of *C. externa* and *C. argentina* is entirely new and provides original information on both species. In addition, the internal morphology of *C. argentina* is characterized for the first time, providing relevant information for further studies.

Keywords: brain, taxonomy, chrysopidae, biological control, digestive system

Cytogenetic determination of two species of lacewings (Neuroptera: Chrysopidae)

VF Acevedo, S Rodriguez Gil, M I Schneider – 2024

<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3919125/v1>

Abstract: The Chrysopidae family is the second most important family in the order Neuroptera. *Chrysoperla externa* and *C. argentina* are two of the four chrysopid species of economic importance in Argentina. Meiotic studies of the species have indicated that have chromosome numbers of $2n=12$. The objective of this study was to analyze and describe the biology of *C. externa* and *C. argentina* chromosomes in terms of the cell cycle and karyotype because of the lack of exhaustive details of the karyotype or mitotic cycle of both species of lacewings. Chromosomes of *C. externa* were measured at the metaphase stage, *C. argentina* chromosomes were measured at the end of the mitotic prophase. Chromosomes that exhibited natural banding were paired together. Chromosomes that did not show marked differentiation were grouped according to the criterion of a similar chromosome contribution. The chromosomes are rod shaped without primary constriction with a gradual variation in size. In both species, sex chromosomes exhibited marked dimorphism. The X chromosome is among the largest chromosome pairs and the Y chromosome among the smallest. *Chrysoperla externa* shows natural chromosome banding that allows three of the six pairs that make up its genome

to be distinguished. *Chrysoperla argentina* only two chromosome pairs exhibit natural banding. In conclusion, this study presents, for the first time, a proposal for nomenclature, identification of the chromosomes and karyotype of *C. externa* and *C. argentina*, accompanied by detailed information on their cell cycle.

Congresos y otras actividades

2021. Exposición Virtual en el **Jornadas Argentinas de Genética 2021**. Póster “Cromosomas de *Chrysoperla externa* (Hagen) primeros datos para la determinación de su cariotipo” Modalidad virtual, Buenos Aires.

2021. “**Cromosomas de *Chrysoperla externa* (Hagen) primeros datos para la determinación de su cariotipo**”. Resumen. Presentado en las Jornadas Argentinas de Genética (Modalidad Virtual), Buenos Aires, Argentina. Coautores: Rodríguez Gil, S. y Schneider M.

2022. Exposición Virtual en el **L Congreso Argentino de Genética y II Jornadas Regionales SAG-NEA** Póster “Toxicidad de imidacloprid (Confidor®) sobre huevos de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) utilizando ensayo cometa” Modalidad virtual, Buenos Aires.

2022. “**Toxicidad de imidacloprid (Confidor®) sobre huevos de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) utilizando ensayo cometa**” Comunicación libre. Presentado en L Congreso Argentino de Genética y II Jornadas Regionales SAG-NEA, Corrientes, Argentina. Coautores: A. Seoane, S. Rodríguez Gil y M.I. Schneider.

2023. “**Nuevas técnicas para la realización de cortes histológicos en artrópodos**”. Poster. Presentado en XXVI Congreso Argentino De Histotecnología. CABA, Argentina. Coautores: Vargas, Silvina; Soldati, Kevin y Topa, Pascual Emilio. Certificado.

2020. Participación en el Concurso 95° Aniversario SEA “**Sobre insectos y otros artrópodos ¿Cómo los ves?**” en el marco de los FESTEJOS 95° ANIVERSARIO SEA, organizado por la Sociedad Entomológica Argentina. San Miguel de Tucumán, Tucumán.

2022. Participación en el Concurso de Fotografía Científica 2022 CONICET La Plata “**Quinquenio**”. Fotografía “Metamorfosis” seleccionada para el calendario anual, mes de marzo 2023.