

**Selectividad de insecticidas utilizados en  
cultivos hortícolas del Cinturón Hortícola  
Platense sobre el depredador *Eriopsis  
connexa* en el marco del Manejo Integrado  
de Plagas.**

**Autora:** Lic. Marilina Noelia Fogel

**Directora:** Alicia Estela Ronco  
**Co-Directora:** Marcela Inés Schneider

Centro de Investigaciones del medio Ambiente,  
Departamento de Química, Facultad de Ciencias  
Exactas

**2012**

## AGRADECIMIENTOS

- A mis directoras la Dra. Alicia Ronco y la Dra. Marcela Schneider, agradecerles especialmente por todo el esfuerzo que hicieron en los momentos finales de la tesis.
- A Dra. Alicia Ronco, gracias por haber confiando en mí, guiándome y brindándome todo su apoyo profesional y sus consejos durante el desarrollo de la tesis.
- A la Dra. Marcela Schneider, por brindarme su experiencia en el tema, por su disposición para enseñarme, aconsejarme y escucharme en los momentos difíciles.
- A los jurados que evaluaron la tesis: Dra. Leda Gianuzzi, Dra. Sara Palacios y Dr. Teodoro Stadler.
- A la Universidad Nacional de La Plata y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, por haber financiado el doctorado a través del otorgamiento de las becas que me permitieron desarrollar mis investigaciones.
- Al Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIMA) por brindarme lugar de trabajo.
- Al Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) por trasladarme a realizar los muestreos a los establecimientos hortícolas.
- A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Federico y Esteban a los cuales tantas veces molesté. Carina, Leticia, Yanina, Pablo, Guille Damián y Gustavo que directa e indirectamente me brindaron su ayuda.
- Quiero agradecer especialmente a Belén González por su colaboración en los ensayos y en el mantenimiento de la cría en estos últimos años.

- 🌸 A Nicolás por la edición del manuscrito.
  
- 🌸 Manuel, Ivana, Luciana, Malala, Romina.
  
- 🌸 A Damián Aliardi.
  
- 🌸 A mis amigas, Ana Clara, Victoria, Nadia, Cecilia, Karina y Verónica que siempre están y estuvieron y conocen del tema, por tantas charlas, catarsis y buenos momentos compartidos y que seguiremos compartido.
  
- 🌸 A mi amiga del alma, Jimena por estar siempre, por su amistad incondicional a pesar de la distancia.
  
- 🌸 A mis padres, Alicia y Oscar y a mis adorados hermanos Mariano, Maxi y Matias, por todo su cariño y afecto, por alentarme a seguir adelante.
  
- 🌸 A mis hermosas sobrinas y sobrino, Estefi, Camila, Emi, Valen, Josefina y Renzo, por alegrarme tanto.
  
- 🌸 *Y muy especialmente a Alejandro, por su amor y compañerismo. Por entenderme y aconsejarme, por toda la ayuda brindada en esta etapa y por mostrarme otra manera de ver las cosas.*

**Indice**

RESUMEN .....	6
CAPITULO 1 .....	11
1.1 Actividad Hortícola en la Republica Argentina.....	12
1.2 Plagas agrícolas.....	14
1.2.1 Plagas importantes asociadas a los cultivos hortícolas.....	15
1.3 Control de plagas.....	17
1.3.1 Control Químico.....	17
1.3.1.1 Insecticidas biorracionales .....	19
1.3.1.1.a Neonicotinoides .....	20
1.3.1.1.b Insecticidas reguladores del crecimiento de los insectos. ....	21
1.3.1.2 Control de plagas en el Cinturón Hortícola Platense.....	23
1.3.2 Control Biológico. ....	23
1.3.2.1 Enemigos Naturales .....	24
1.3.2.2 Enemigos Naturales del CHP.....	27
1.4. Manejo Integrados de Plagas .....	27
1.5 Los “Coccinélidos” y el control de plagas.....	29
1.5.1 <i>Eriopis connexa</i> .....	30
1.5.1.1 Sistemática y descripción morfológica.....	30
1.5.1.2 Distribución geográfica.....	33
1.5.1.3 Importancia económica.....	33
1.6 Importancia de los estudios ecotóxicológicos sobre los organismos benéficos. ...	34
CAPITULO 2 .....	36
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	37
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>37</b>
2.3 HIPOTESIS DE TRABAJO .....	38
CAPITULO 3 .....	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	40
3.1 Recolección de organismos a campo ( <i>E. connexa</i> ).....	40
3.2 Cría de organismos en laboratorio .....	42
3.2.1 Cría y mantenimiento de <i>Rhopalosiphum padi</i> (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae): (presa).....	42
3.2.2 Cría y mantenimiento de <i>E. connexa</i> (depredador).....	43
3.3 Condiciones generales de cría y de ensayos .....	46
3.4 Metodología general de preparación y aplicación de los insecticidas evaluados .	47
3.4.1. Preparación de soluciones y suspensiones de insecticidas. ....	47

3.4.2 Metodologías utilizadas para la aplicación de los insecticidas .....	48
3.5 Diseño general del proceso de evaluación de efectos toxicos de insecticidas sobre el predador <i>E. connexa</i> en condiciones de laboratorio.....	50
3.6. Análisis estadístico.....	51
CAPITULO 4 .....	52
4. Evaluación de efectos toxicológicos de piriproxifen, teflubenzurón, acetamiprid y cipermetrina sobre huevos de <i>Eriopsis connexa</i> .....	53
4.1 Materiales y Métodos .....	53
4.1.1. Obtención de huevos para los bioensayos de toxicidad.....	53
4.1.2. Bioensayos .....	53
4.1.3 Análisis estadístico .....	56
4.2 Resultados.....	56
4.3 Discusión .....	65
CAPITULO 5 .....	72
5.1 Introducción.....	73
5.1.1. Evaluación de las máximas concentraciones recomendadas para aplicación en campo (MCRC) de piriproxifén, teflubenzurón, acetamiprid y cipermetrina sobre el segundo estadio larval de <i>E. connexa</i> .....	74
5.1.3 Evaluación de las máximas concentraciones recomendadas para el campo (MCRC) de piriproxifen, teflubenzurón, acetamiprid y cipermetrina sobre el cuarto estadio larval de <i>E. connexa</i> .....	81
5.1.4. Evaluación de concentraciones inferiores a la MCRC de acetamiprid sobre el cuarto estadio larval de <i>E. connexa</i> .....	87
5.2 Discusión .....	91
CAPITULO 6 .....	102
6- Evaluación de efectos toxicológicos de piriproxifen, teflubenzurón, acetamiprid y cipermetrina sobre pupas de <i>E. connexa</i> .....	103
6.1 Bioensayos.....	103
6.2 Resultados.....	104
6.3 Discusión .....	108
CAPITULO 7 .....	113
7- Evaluación de efectos toxicológicos de piriproxifén, teflubenzurón, acetamiprid y cipermetrina sobre adultos de <i>Eriopsis connexa</i> .....	114
7.1 Bioensayos.....	114
7.2 Resultados y Discusión.....	116
CAPITULO 8 .....	124
CONCLUSIONES .....	124
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129

**RESUMEN**

El Manejo Integrado de Plagas (MIP), es un paradigma en el que se propone la utilización de distintas técnicas de control, de manera conjunta, para mantener la densidad de población de los organismos plaga a niveles inferiores a los cuales éstas causan perjuicio económico (Nivel de Daño Económico). Este paradigma de control requiere de un estudio exhaustivo de la dinámica poblacional de los organismos plaga como así también de los enemigos naturales asociados a las mismas. Entre las principales premisas del MIP en el control de plagas, sobresale la compatibilidad entre el control químico con insecticidas selectivos y el control biológico, priorizando la conservación de los enemigos naturales de presencia espontánea en los agroecosistemas.

El objetivo principal de esta tesis fue la evaluación de la toxicidad de los insecticidas comúnmente utilizados en cultivos hortícolas sobre el depredador generalista *Eriopis connexa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Cochinellidae) con la finalidad de conocer el perfil toxicológico de los mismos y determinar la selectividad de los mismos hacia este organismo no blanco. La evaluación se realizó mediante ensayos de toxicidad aguda en laboratorio considerando los efectos letales y subletales seleccionados sobre los parámetros vitales del depredador, principalmente aquellos relacionados con su desempeño como agente de control biológico. En el caso de los adultos de *E. connexa*, se evaluó la toxicidad crónica. Se estudió la susceptibilidad de los diferentes estados de desarrollo del depredador hacia los diferentes productos, a través de distintas vías de exposición. Sobre la base de los resultados de éstos estudios será posible identificar los insecticidas más selectivos y ambientalmente amigables, para ser empleados en combinación con *E. connexa*, uno de los principales enemigos naturales de las plagas de los cultivos hortícolas del CHP. Los resultados de estos estudios servirán a futuro como base para rediseñar estrategias de control de bajo impacto ambiental en el marco del Manejo Integrado de Plagas (MIP).

La actividad Hortícola en Argentina se caracteriza por su amplia distribución geográfica y por la diversidad de cultivos. Dentro de la Región de Buenos Aires, se localiza el Cinturón Hortícola Platense (CHP), que comprende el área de mayor envergadura del Cinturón Hortícola Bonaerense. Dentro de CHP y asociado a los principales cultivos

(lechuga, tomate, pimiento), se encuentra un importante número de especies de artrópodos plaga que causan daños directos e indirectos en los cultivos ocasionando pérdidas económicas, resultado de la merma en la productividad. Asociados a estos organismos plaga se encuentran diferentes enemigos naturales como: parasitoides, depredadores y hongos entomopatógenos. Dentro de los depredadores se encuentra el coccinélido *Eriopis connexa*, considerado un potencial agente de control biológico en varios cultivos hortícolas de la Región Neotropical, donde tanto los estadios larvales como el adulto se alimentan de diferentes especies plagas.

Para evaluar los efectos de los insecticidas de uso habitual en hortalizas sobre el depredador *E. connexa* se realizó la puesta a punto de métodos de bioensayos de toxicidad seguido de la posterior aplicación para estudiar los diferentes productos (piriproxifén, teflubenzurón, acetamiprid y cipermetrina). El material biológico para los estudios se obtuvo a partir de mustros a campo y en invernáculos. A partir de este se estableció la cría en laboratorio de donde se obtuvo el material para las pruebas de toxicidad. Los bioensayos de laboratorio se realizaron sobre distintos estados del depredador (huevo, larva, pupa y adulto). La exposición de los insectos a los diferentes productos insecticidas se realizó por inmersión, tópico e ingestión, evaluando las máximas concentraciones recomendadas para su uso a campo (MCRC), así como concentraciones menores

#### **Evaluación de efectos toxicológicos de piriproxifen, teflubenzurón, acetamiprid y cipermetrina sobre huevos de *Eriopis connexa***

Se evaluaron las MCRC de piriproxifén (75 mg i.a/L), teflubenzurón (45 mg i.a/L), cipermetrina (25 mg i.a/L), acetamiprid (200 mg i.a/L), y concentraciones correspondientes al 50% de las mismas. La exposición se realizó sobre los huevos del depredador mediante ensayos de inmersión. La MCRC de acetamiprid ocasionó un 100% de mortalidad de los huevos tratados. La concentración más baja de este insecticida y ambas concentraciones de cipermetrina redujeron significativamente el porcentaje de eclosión de los huevos, aquellas larvas que lograron emerger, se murieron en es estadio larval L<sub>1</sub>. Piriproxifén y acetamiprid produjeron un alargamiento de la duración promedio del estado de huevo, comparados con el tratamiento control. El teflubenzurón y la cipermetrina no afectaron este parámetro. Piriproxifén y teflubenzurón no afectaron la eclosión pero provocaron efectos a largo plazo sobre los

restantes estados inmaduros (larva y pupa), donde se redujo el porcentaje de pupación con respecto a huevos y la emergencia de adultos, la cual sólo fue significativa para piriproxifén. Piriproxifén alargó el periodo intermuda (L<sub>1</sub>-Pupa), mientras que teflubenzurón produjo un acortamiento en este período. En estos experimentos solo la MCRC piriproxifén redujo el número promedio de huevos puestos por hembra (fecundidad acumulada). La concentración más baja de piriproxifén y ambas concentraciones de teflubenzurón no afectaron los parámetros reproductivos de hembras emergidas a partir de huevos tratados.

**Evaluación de efectos toxicológicos de piriproxifen, teflubenzurón, acetamiprid y cipermetrina sobre los estadios larval (L<sub>2</sub> y L<sub>4</sub>) de *Eriopsis connexa*.**

La aplicación de los insecticidas se realizó por tratamiento tópico sobre larvas, evaluándose las MCRC de todos los insecticidas y otras seis concentraciones de acetamiprid (100, 50, 20, 10, 5, y 1 mg i.a/L).

**Ensayos de exposición tópica sobre el segundo estadio larval (L<sub>2</sub>):** todas las concentraciones evaluadas de acetamiprid, ocasionaron un 100% de mortalidad en los ensayos de exposición tópica sobre el estadio L<sub>2</sub>. La cipermetrina y el teflubenzurón también redujeron significativamente la supervivencia del estadio larval L<sub>2</sub>, con respecto al control. Al evaluar la supervivencia acumulada considerando el período intermuda (L<sub>2</sub>-pupa) se observa que se produjo una reducción significativa del parámetro en los cuatro tratamientos con insecticidas. Teflubenzurón y cipermetrina prolongaron el tiempo de desarrollo de los estadios larvales y del período de intermuda (larva L<sub>2</sub>-pupa), con respecto al control.

**Ensayos de exposición tópica sobre el cuarto estadio larval (L<sub>4</sub>):** el acetamiprid produjo un 100% de mortalidad a las 24 h postratamiento en las concentraciones evaluadas desde 20 a 200 mg i.a/L, si bien a las más bajas (1 a 10 mg i.a/L) se redujo la supervivencia en el estado L<sub>4</sub> y en el período intermuda (L<sub>4</sub>-adulto), los organismos lograron completar su ciclo de vida hasta el estado adulto. Se observó una reducción significativa en la fecundidad y fertilidad de las hembras a la concentración de 10 mg/L de acetamiprid. La cipermetrina redujo significativamente la supervivencia sobre el cuarto estadio larval (L<sub>4</sub>). El piriproxifen provocó un alargamiento del tiempo de



desarrollo y una reducción en la fertilidad de las hembras. Teflubenzurón produjo una reducción en la fecundidad y fertilidad de las hembras.

**Evaluación de efectos toxicológicos de piriproxifén, teflubenzurón, acetamiprid y cipermetrina sobre pupas de *Eriopsis conexa*.**

Los ensayos de evaluación de insecticidas sobre pupas se realizaron utilizando la vía de exposición tópica. Se evaluaron las MCRC para cada uno de los productos y en el caso de acetamiprid se evaluó el 50% de la MCRC. Ninguno de los insecticidas provocó una reducción significativa en la supervivencia pupal. Como efectos subletales se observaron, fenómenos teratológicos como anomalías y malformaciones en el proceso de metamorfosis en los individuos tratados con acetamiprid, piriproxifén y cipermetrina. La mayor proporción de fenómenos teratológicos se observaron en los tratamientos con acetamiprid, donde ninguno de los organismos tratados logró llegar a adultos. En el tratamiento con piriproxifén las hembras normales no lograron dejar descendencia si bien se pudo observar el abdomen abultado de las hembras, no lograron poner huevos. En menor medida, en los individuos expuestos a cipermetrina, si bien se observaron anomalías en la metamorfosis, éstas no fueron significativas con el control. Con los adultos normales emergidos, se evaluaron la fecundidad y fertilidad acumulada; se observó una reducción en la fertilidad, la cual fue estadísticamente significativa con respecto al control. Por último, el teflubenzurón no produjo efectos teratológicos en las pupas expuestas, este insecticida produjo una reducción significativa en la fertilidad de las hembras con respecto al control.

**Evaluación de efectos de efectos toxicológicos de piriproxifén, teflubenzurón, acetamiprid y cipermetrina sobre adultos de *E. conexa*.**

La forma de exposición a los insecticidas se realizó a través de un ensayo de toxicidad oral crónica, suministrado los insecticidas mediante agua de beber. Los organismos estuvieron expuestos a los insecticidas durante 72 h renovándose cada día las soluciones. Se evaluaron las MCRC de piriproxifén, teflubenzurón, acetamiprid y cipermetrina. Acetamiprid redujo la supervivencia adulta en un 90%. Los insecticidas piriproxifén, teflubenzurón y cipermetrina, no afectaron la supervivencia de los adultos, siendo los valores similares al control, por lo que se pudieron evaluar los posibles efectos en los parámetros reproductivos (fertilidad y fecundidad). De manera general los parámetros reproductivos fueron afectados por los IGRs (piriproxifén y teflubenzurón).

En la quinta oviposición estos insecticidas provocaron la reducción en la fecundidad con respecto al control. Los efectos en la fertilidad también se pusieron de manifiesto con mismos productos. Pero para el caso de las hembras tratadas con piriproxifén la fertilidad se redujo significativamente. Esta reducción se evidenció cuando se evaluó la fertilidad acumulada. Teflubenzurón redujo significativamente la fertilidad durante las primeras oviposiciones, sin embargo la fertilidad acumulada no evidenció diferencias significativas con el control. La cipermetrina resultó inocua en los ensayos de ingestión con *E. connexa*.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente tesis, piriproxifén y teflubenzurón muestran una baja toxicidad hacia el depredador *E. connexa*, resultando éstos los menos nocivos, lo que podría permitir su uso conjunto con éste enemigo natural en programas de MIP. El insecticida acetamiprid es considerado biorracional y ha sido incorporado como tal en los sistemas de producción de la Región para reemplazar a los productos convencionales de amplio espectro como los organoclorados y organofosforados. Sin embargo los resultados del presente trabajo demuestran que *E. connexa* es altamente susceptible al acetamiprid, más aún que a la cipermetrina, que pertenece al grupo de los insecticidas convencionales. De aquí se desprende que el acetamiprid debería considerarse como no apto para programas de MIP, particularmente en sistemas productivos en los que se pretende complementar las estrategias de manejo de plagas empleando a *E. connexa*. Estudios de toxicidad en condiciones de semicampo y campo serían recomendables a futuro, a fin de completar el perfil toxicológico de estos compuestos previo a la implementación de programas MIP.

# **CAPITULO 1**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

### 1.1 Actividad Hortícola en la Republica Argentina

La actividad Hortícola en Argentina se caracteriza por su amplia distribución geográfica y por la diversidad de cultivos que produce. El sector expresa su importancia social y económica a través de una contribución decisiva para la alimentación de la población, su gran capacidad para satisfacer la demanda interna, y por un aporte histórico al producto bruto interno (11,6% del PBI Agrícola). Es una importante fuente de empleo con 350.000 personas que están en el eslabón productivo. Se estima que el área ocupada con cultivos comerciales de hortalizas es de aproximadamente 600.000 hectáreas, las que generan una producción aproximada de 10.500.000 toneladas (Colamarino et al., 2006). El 93% de la producción hortícola se destina al mercado interno (40% del área metropolitana) y el 7% restante se exporta generando U\$S 206 millones en el año 2005 (INDEC 2005).

Tendiendo en cuenta la interacción de factores ecológicos, económicos, políticos, sociales, y sus variaciones en el marco de la amplia geografía de nuestro país, se pueden definir ocho regiones representativas de la horticultura argentina (SAGPyA, 2006) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Regiones representativas de la horticultura en la República Argentina

Regiones	Provincias y subregiones
Noroeste	Salta, Jujuy y Tucumán
Noreste	Sudeste de Formosa, Este de Chaco y Misiones
Central	Córdoba, San Luis y Santiago del Estero
Andina	Catamarca, La Rioja, Mendoza y San Juan
Valle de Río negro y Neuquén	Río Negro y Neuquén
Litoral	Santa Fe y Entre Ríos
Patagonia Sur	Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego
Buenos Aires	Norte de Buenos Aires, Cinturón Hortícola de Buenos Aires, área central de Buenos Aires, sudeste bonaerense y Cinturón Hortícola de Bahía Blanca.

Dentro de la Región de Buenos Aires, se localiza el Cinturón Hortícola Platense (CHP), comprendiendo el área de mayor envergadura del Cinturón Hortícola Bonaerense. Este último abastece de verduras frescas a uno de los núcleos poblacionales más densos de la Argentina, Ciudad Autónoma de Buenos Aires y el Conurbano Bonaerense, la cual fue estimada en 11 millones de personas (Cieza, 2004). El Cinturón Hortícola Platense (CHP) cuenta con un área de 7538 ha cultivadas, de las cuales 4677 ha corresponden a invernáculos<sup>1</sup> y 2861 ha a campo (CFHB, 2005). Entre sus principales cultivos se destacan lechuga, tomate y pimiento (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Cultivos hortícolas del Cinturón Hortícola Platense

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

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

<sup>1</sup> Estructuras permanentes o desamables de cobertura transparente, dentro del cual se desarrolla todo el ciclo del cultivo.

## 1.2 Plagas agrícolas

La FAO define a las plagas como: “Cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales” (FAO, 2001)

Considerando a aquellos asociados a los agroecosistemas, se consideran organismos plaga aquellos que debido a su nivel poblacional generan un daño económico en los cultivos. Este término incluye a insectos, ácaros, enfermedades ocasionadas por hongos, bacterias y virus, nematodos, caracoles y babosas. También los roedores y los pájaros pueden ser considerados plaga cuando se alimentan sobre plantas jóvenes o sobre granos almacenados y producen un daño, que hacen imprescindibles la intervención del hombre. De igual manera se considera plagas a las malezas que compiten con los nutrientes de los cultivos (Ware, 1983).

Las poblaciones de estos organismos se encuentran en equilibrio por acciones de factores dependientes de la densidad, pero en algún determinado momento pueden crecer y superar los niveles de daño económico<sup>2</sup> y, consecuentemente, convertirse en plaga (Mathews, 1984).

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

---

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

### 1.2.1 Plagas importantes asociadas a los cultivos hortícolas.

Dentro de CHP y asociado a los principales cultivos (lechuga, tomate, pimiento), existe una gran cantidad de artrópodos plaga que los afectan recurrentemente produciendo daños directos e indirectos y generando graves perjuicios de importancia económica comprometiendo la productividad y el rendimiento de los cultivos. Entre las principales plagas sobresalen las moscas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae), los pulgones (Hemiptera: Aphididae) y los lepidópteros minadores como *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Botto et al., 1997; Viscarret & Botto, 1997; Cáceres, 2004; Polack, 2008).

Entre las moscas blancas más importantes asociadas tanto al cultivo de tomate como de pimiento, se encuentra *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856) y *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Viscarret, 2000; 2001). Con la implementación de los cultivos protegidos (invernáculos) a partir de la década del '90, las moscas blancas comenzaron a causar severos problemas (Cáceres, 2004; 2005). Si bien la especie más frecuente en cultivos hortícolas bajo cubierta es *T. vaporariorum*, desde la aparición de *B. tabaci* en el año 2001 en el NEA y en el 2004 en el CHP (Cáceres, 2004; Polack, 2005; 2008), ésta última ha adquirido mayor relevancia, principalmente por la transmisión de virus perteneciente a la familia Geminiviridae. Además de alimentarse de la plantas y extraer su floema, las moscas blancas excretan una melaza azucarada la cual queda depositada sobre la hoja y permite la proliferación de fumagina (hongos saprófagos), altos niveles de fumagina provocan una considerable reducción de la capacidad de realizar fotosíntesis, que redundan en una reducción del crecimiento, pérdidas de rendimiento y en condiciones severas, defoliación (Cohen, 1990; Polack, 2005).

Con respecto a los pulgones (Hemiptera: Aphididae), existen más de 4000 especies en el mundo, de las cuales se han descripto para la Argentina 173 especies (Delfino, 1994; Nieto Nafría et al., 1994), muchas de éstas se encuentran asociadas a cultivos hortícolas. Existen especies polípagas como *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) y otras más especialistas como *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758). Al igual que las moscas blancas, los pulgones son succionadores y se alimentan de las sustancias floemáticas provocando daños directos como clorosis, marchitamiento, senescencia precoz, deformaciones, agallas y disminución del crecimiento de las plantas (Delfino et al., 2007). En cuanto a los daños indirectos, son vectores importantes de virus fitopatógenos, entre ellos los de la familia Potviridae, que provocan una reducción en los rendimientos y además contribuyen al desarrollo de fumagina que se desarrolla sobre sus excreciones azucaradas (“honeydew”) que resta capacidad fotosintética a la planta y valor comercial a los frutos.

Entre los artrópodos claves del cultivo de tomate sobresale la “polilla del tomate”, *T. absoluta* (Cáceres et al., 1984; 1995), originaria de Perú y de distribución Neotropical, la cual ha tomado mayor relevancia como plaga cuarentenaria<sup>3</sup> desde su detección en Europa en el año 2006, causando graves daños en los cultivos de tomate y en otras hortalizas (Desneux et al., 2010).

Esta especie es una minadora ya que sus larvas neonatas penetran en el mesófilo de la hoja donde cavan y perforan generando galerías y minas irregulares, las cuales posteriormente se necrosan, además también pueden minar los brotes, tallos y frutos. Esto provoca daños importantes por la pérdida de capacidad fotosintética de la planta, que en ataques severos pueden comprometer a los frutos, disminuyendo el rendimiento del cultivo y la calidad de las cosechas (Cáceres, 1995; Estay, 2000).

---

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



### **1.3 Control de plagas**

Desde que el hombre se convirtió en agricultor se vio en la necesidad de combatir las plagas que atacan a sus cultivos las que provocan una disminución de su cosecha y, por ende, su fuente de alimentación. Las plagas figuran entre uno de los factores limitantes para la agricultura, su desarrollo masivo en pocas horas puede destruir cultivos o cosechas completas. Según estimaciones de la FAO, las pérdidas económicas en los cultivos, ocasionadas por plagas, fluctúan entre un 25 y 35%, variando en magnitud de acuerdo a la región, año, tipo de cultivo y plaga considerada ([www.fao.org](http://www.fao.org)).

Para combatir las plagas, la agricultura tradicional ha aplicado a través de los años, distintas prácticas como ser la rotación de cultivos, combinación de cultivos, desarrollo de variedades resistentes, pero sin duda la utilización de los plaguicidas es una de las primeras opciones a las que se recurre para combatir las plagas.

#### **1.3.1 Control Químico**

La industria moderna de los plaguicidas comienza partir de la Segunda Guerra Mundial (1940), donde se da comienzo a la “Era de la Química Moderna”, cuando los químicos desarrollaron productos para matar mosquitos y piojos y así proteger a las tropas de enfermedades transmitidas por éstos vectores. El primero en sintetizarse fue el DDT (para-diclorodifeniltricloroetano) perteneciente al grupo de insecticidas organoclorados, que rápidamente se extendió para el control de plagas agrícolas y del ganado. Tanto el DDT como el herbicida 2-4-D, revolucionaron la agricultura, al proporcionar a los agricultores herramientas altamente efectivas para proteger a sus cultivos contra las plagas. En pocos años, sin embargo, los problemas con estos plaguicidas sintéticos fueron reconocidos por ecólogos previsores (van Driesche et

al., 2007). Uno de los primeros problemas ocasionados por el DDT fue que los insectos comenzaron a hacerse resistentes y su empleo comenzó a decaer hacia el año 1960, una década más tarde su uso fue prohibido en Estados Unidos y otros países industrializados por su elevada toxicidad en organismos no blanco como aves y su bioacumulación en la cadena trófica (Spiro y Stigliani, 2004).

Hacia el año 1947 se incorporaron al mercado nuevos grupos de plaguicidas como los organofosforados (OPs), los cuales tienen dos propiedades características: generalmente son más tóxicos a los vertebrados que otras clases de insecticidas, y la mayoría de ellos son químicamente inestables o no persistentes. Esta última característica fue la que los trajo al uso agrícola como sustitutos de los organoclorados que son mucho más persistentes. Debido a la toxicidad relativamente alta de los OPs, la EPA, de acuerdo con lo previsto en la Ley de Protección de la Calidad de los Alimentos (1996), realizó una extensa reevaluación de toda la clase comenzando a finales de los años 1990s, y muchos OPs fueron cancelados.

En la actualidad se siguen utilizando diazinon y el clorpirifos, más allá de no presentar tan elevada persistencia como los clorados y ser menos bioacumulables, su uso debería presentar ciertas restricciones debido a que se han documentado variados efectos sobre organismos no blanco e intoxicaciones de importancia en el hombre (Chindah et al., 2004).

Los insecticidas carbamatos surgen alrededor del año 1956, son derivados del ácido carbámico y de igual manera que los OPs, su modo de acción es la inhibición de la vital enzima colinesterasa (ChE). Hay dos cualidades particulares que han hecho de que los carbamatos sean tan utilizados: su baja toxicidad oral y dermal para mamíferos y su espectro de acción excepcionalmente amplio para control de insectos. Los

carbamatos que han entrado más recientemente al mercado incluyen pirimicarb, indoxacarb (registrado en el 2000), alanicarb y furatiocarb.

Los piretroides son un grupo de pesticidas sintéticos desarrollados para controlar preponderantemente las poblaciones de insectos plaga. Este grupo surgió como un intento por parte del hombre de emular los efectos insecticidas de las piretrinas naturales obtenidas de las flores del crisantemo, que se venían usando desde 1850. La obtención de piretrinas sintéticas se produce en 1949 con la fabricación de la aletrina, considerado piretroide de primera generación. A lo largo de los años la síntesis de los piretroides ha tenido una evolución interesante pasando por cuatro generaciones distintas. La cuarta y actual generación de piretroides sintéticos se caracteriza por ser fotoestables, es decir, que en presencia de luz solar no sufren fotólisis. Como tienen baja volatilidad ofrecen una efectividad residual extendida, hasta de 10 días en condiciones óptimas. A esta última generación pertenecen **cipermetrina**, deltametrina, esfenvalerato, zeta-cipermetrina.

Los piretroides afectan tanto el sistema nervioso central como el periférico del insecto, actúan a nivel de los canales axónicos de sodio ( $\text{Na}^+$ ) permitiendo la entrada excesiva del ión, provocando la excitación continua de la membrana del axón, descargas repetitivas y eventualmente parálisis (Ware y Whitacre, 2004).

### **1.3.1.1 Insecticidas biorracionales**

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

En los últimos 20 años se han incorporado nuevas materias activas, lo que se conoce como “insecticidas de nueva generación”, muchos de los cuales tienen varias ventajas, baja toxicidad para los mamíferos, actividad más específica hacia las plagas, más selectivos hacia los organismos benéficos, lo cual reduce su impacto sobre el medio ambiente en general y por lo tanto los hace más compatibles con los enemigos naturales, permitiendo que sean utilizados en los programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Devine & Furlong, 2007).

Dentro de los insecticidas bioracionales encuentran los neonicotinoides, los insecticidas reguladores de los insectos, inhibidores de la síntesis de lípidos, moduladores de la Rianodina (neurotransmisor) y bioplaguicidas (de origen natural y botánicos) spinosinas y derivados de la fermentación del microorganismo *Streptomyces avermitilis*; (CASAFE, 2009). Más recientemente se están desarrollando compuestos (Cuarta Generación de Plaguicidas) a partir de técnicas de química verde (usando catalizadores eco-amigables), que podrían ser una alternativa novedosa a los convencionales para el control de artrópodos plaga (Romanelli et al., 2010).

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

#### **1.3.1.1.a Neonicotinoides**

Los neonicotinoides son una de las más nuevas clases de insecticidas, sintetizados a partir de la nicotina natural y con un nuevo modo de acción. Estos

compuestos actúan sobre el sistema nervioso central de los insectos, más específicamente a nivel de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), resultando en la excitación y parálisis seguido de muerte (Tomizawa et al., 1995). Los neonicotinoides son considerados compuestos principales para el control de plagas succionadoras como moscas blancas y pulgones (Elbert et al., 1998).

Imidacloprid fue introducido en Europa y Japón en 1990, y fue registrado por primera vez en los EEUU en 1992. Es un insecticida sistémico que tiene características de buena acción sistémica por la raíz y una notable acción de contacto y estomacal. Se usa para tratamiento del suelo, de semilla y foliar en diferentes cultivos, con alto poder residual. Imidacloprid fue restringido su uso en muchos cultivos debido a su alta toxicidad para abejas y polinizadores (Mommaerts et al., 2010). A raíz de esto surgieron nuevas moléculas entre las que podemos destacar: **acetamiprid**, tiametoxan y tiacloprid. Los registros de estos neonicotinoides fueron otorgados en el 2002 en los EEUU (Ware y Whitacre, 2004).

#### **1.3.1.1.b Insecticidas reguladores del crecimiento de los insectos.**

En las últimas décadas se ha avanzado en el desarrollo de nuevas materias activas que actúan sobre sitios bioquímicos selectivos presentes en los grupos de insectos específicos. Este enfoque ha llevado al desarrollo de los insecticidas reguladores de crecimiento (IRC, también llamados en inglés IGR). Estos compuestos químicos de origen sintético actúan alterando el crecimiento y desarrollo de los insectos de dos maneras: a) inhibiendo la formación de quitina; b) imitando la hormona juvenil (HJ) y la hormona de la muda (ecdisona).

a) *Inhibidores de la síntesis de la quitina*<sup>4</sup>. A ésta clase de insecticidas pertenecen las benzoilúreas, que actúa sobre los estados larvales de la mayoría de los insectos inhibiendo o bloqueando la síntesis de la quitina, una parte vital del exoesqueleto de los insectos, ocasionando ruptura de cutícula malformada y/o deshidratación, causando la muerte de los organismos (Ware y Whitacre, 2004). A éste grupo pertenecen **teflubenzurón**, hexaflumurón, novalurón, entre otros.

b) *Miméticos de la hormona juvenil y la hormona de la muda*<sup>5</sup>. Estos compuestos también llamaos juvenoides, son análogos a la hormona de la muda (ecdisona) y a la hormona juvenil (HJ), actúan desequilibrando las concertaciones de las hormonas naturales durante los procesos de crecimiento y desarrollo normal entre los estadios de las distintas plagas, provocando deformidades e impidiendo la emergencia adulta. Además provocan supresión de la embriogénesis (Ishaaya & Horowitz, 1994; Dhadialla et al., 1998).

Varios IGRs han sido registrados por la EPA, entre los que se encuentran metopreno, hidropreno, kinopreno, fenoxicarb, buprofezín y **piriproxifén**, éste ultimo es un efectivo inhibidor de la muda para una amplia variedad de insectos, pero particularmente es útil para loa complejos de mosca blanca y en sitios acuáticos para control de mosquitos (Ware y Whitacre, 2004).

---

<sup>4</sup> La quitina es uno de los componentes principales del exoesqueleto de los artrópodos (arácnidos, crustáceos, insectos), es un polisacárido compuesto de unidades de N-acetilglucosamina (exactamente, N-acetil-D-glucos-2-amina). Éstas están unidas entre sí con enlaces  $\beta$ -1,4, lo que permite un incremento de los enlaces de hidrógeno con los polímeros adyacentes, dándole al material una mayor resistencia.

<sup>5</sup> El crecimiento de los insectos comprende distintas etapas, las cuales están gobernadas por sustancias hormonales. La hormona de la muda (HM) presenta una estructura esteroideal y es secretadas por las glándulas protorácicas. La función de esta hormona es desencadenar los procesos de la muda, inducidos por una alta concentración de ecdisona en la hemolinfa que provoca la renovación total del exoesqueleto. La hormona juvenil (HJ) se produce en unas pequeñas glándulas denominadas corpora allata. Durante el período larvario, la HJ es la encargada de retener las características inmaduras (juveniles) de la larva. La concertación de la HJ en la hemolinfa es mayor en los estadios tempranos de la larva y disminuye al final a un nivel mínimo al final del periodo de pupa. Una vez que la HJ desaparece de la circulación se produce la muda imaginal y se desarrolla el adulto. La concentración de esta hormona vuelve a aumentar en el estado adulto reproductivamente activo.

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

Si bien estos organismos de control biológico son de presencia espontánea en cultivos hortícolas del CHP, el control de plagas en estos cultivos se realiza casi exclusivamente a través del Control Químico, mediante el empleo de plaguicidas (insecticidas, fungicidas y herbicidas), prevaleciendo el uso de los convencionales de amplio espectro (organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides) (CASAFE, 2009), con alrededor de 30 aplicaciones durante el ciclo del cultivo en tomate (*Lycopersicon sculentum*) y en forma semanal en pimiento (*Capsicum annun*) (Strassera, com. pers). La frecuencia de tratamiento depende del tipo de cultivo y sistema de cultivo (bajo cubierta o a campo) pero en general no se realizan rotaciones entre grupos de plaguicidas (**Tabla 3**). Debido a esto, dentro de los ambientes agrícolas, los sistemas hortícolas, principalmente los “bajo cubierta” o “protegidos” son sin dudas los que muestran un alto disturbio ecológico (Botto et al., 1998; Gabarra, 2002).

### 1.3.2 Control Biológico.

El control biológico involucra el uso de poblaciones de enemigos naturales (EN) (parasitoides, depredadores y patógenos) para reducir las poblaciones de plaga a densidades menores, ya sea temporal o permanentemente. En algunos casos, las poblaciones de enemigos naturales son manipuladas para causar un cambio permanente en las redes alimenticias que rodean a la plaga. En otros casos no se espera que los enemigos naturales liberados se reproduzcan por lo que sólo los individuos liberados tienen algún efecto. Algunos enfoques del control biológico son diseñados para reforzar las densidades de enemigos naturales al mejorar sus condiciones de vida (Van Driesche et al., 2007). El concepto de control biológico hay que diferenciarlo del control natural, que es el control que sucede en las poblaciones de organismos sin intervención del

hombre y que incluye además de enemigos naturales la acción de los factores abióticos del medio.

**Tabla 3** Plaguicidas asociados a la producción hortícola de la región

Nivel de uso de plaguicidas	Insecticidas	Fungicidas	Herbicidas
Sistémico (uso generalizado más de una vez por ciclo de siembra en presencia o no de adversidad)	Deltametrina Endosulfan	Macozeb Productos cúpricos Zineb	
Muy frecuente (en presencia de adversidad, más de 1 vez por ciclo)	Clorfenapir Imidacloprid Metamidofós	Azoxistrobina Captan Carbendazim	Trifluralina
Frecuente (se aplican al menos 1 vez por ciclo de siembra si es que aparece la adversidad)	Abemectina Aldicarb Carbofuran Cipermetrina Clorpirifós Dimetoato Lambdacialotrina Metribuzin Spinosad	Primicimidone Propamocarb Tebuconazole Triadimefon	Glifosato Metolacloro Paraquat
Eventual (de acuerdo a preferencias del productor)	Acetamiprid Buprofesim Cartap	Azufre Clorotalonil Folpet Fosetil aluminio Kasugagamicina	Metomil
Puntual (esporádicamente)	Bifentrin Flutriafol Carbaril		Epoxiconazole Hexaconazole Pcbn
Puntual (esporádicamente)	Bifentrin Flutriafol Carbaril		Epoxiconazole Hexaconazole Pcbn

Fuente: Cappello y Fortunato, 2008

### 1.3.2.1 Enemigos Naturales

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



*a) Parasitoides.* A diferencia de los parásitos verdaderos, los parasitoides matan a sus hospedadores y completan su desarrollo en un solo huésped (Van Driesche et al., 2007). Los estados inmaduros de los parasitoides son los que se alimentan y desarrollan dentro de sus hospedadores siendo los adultos de vida libre. Todos los estados de los insectos pueden ser parasitados, los que se clasifican en: parasitoides de huevos, de larvas, pupa y adultos. Los parasitoides cuyas larvas se desarrollan dentro del hospedador se llaman endoparasitoides y los que se desarrollan externamente son ectoparasitoides. De acuerdo al número de especies parasíticas están los parasitoides solitarios los cuales se desarrollan en un solo hospedero hasta la madurez, y el parasitoide gregario donde varios pueden hacerlo. La mayoría de los parasitoides pertenecen a los órdenes Diptera o Hymenoptera, unos pocos son Coleoptera, Neuroptera o Lepidoptera.

Entre los aspectos cruciales de la biología del parasitoide para el control biológico se incluyen: (1) encontrar hospedador (2) reconocimiento y evaluación de los hospederos, (3) vencer las defensas inmunológicas del hospedador, (4) regular la fisiología del hospedador y (5) el tiempo de búsqueda en áreas con hospedador (Van Driesche et al., 2007).

*b) depredadores:* Los depredadores, en sentido amplio, son organismos que para su sustento, desarrollo y reproducción deben cazar a otros animales. Dentro del reino animal existe una gran variedad de órdenes de predadores, entre los invertebrados encontramos los insectos, arañas, ácaros, caracoles y dentro de los vertebrados todos los grupos peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos incluyen especies depredadoras. En este caso particular nos referiremos a los artrópodos como ser insectos y ácaros, por ser éstos de gran relevancia y muchos de ellos son comercializados para el control biológico de plagas en todo en mundo.

Por lo antes mencionado entonces definimos a los depredadores como aquellos organismos que pueden reducir la poblaciones de plagas a un nivel inferior aceptable para evitar un daño y perjuicio económico a los cultivos (Symondson et al., 2002).

A diferencia de los parasitoides, los insectos depredadores son más grandes que sus presas y requieren más de una presa individual para completar su desarrollo. La mayoría de los depredadores no pueden completar su ciclo de vida con una sola presa sino que deben encontrar, someter y consumir numerosos individuos para madurar y reproducirse. Consecuentemente, la mayoría de estos depredadores requiere de altas densidades de población de su presa y deben tener actividad de búsqueda altamente eficiente para localizarlas (Van Driesche et al., 2007).

La manipulación inteligente de los ensamblajes de los depredadores para el control biológico en sistemas de cultivo, requiere del conocimiento de la taxonomía y biología del depredador, su especificidad y de las tasas de predación.

Las especies más comunes de insectos depredadores de uso potencial en control biológico se encuentran en los órdenes Dermaptera, Mantodea, Hemiptera, Thysanoptera, Coleoptera, Neuroptera, Hymenoptera y Diptera (Triplehorn y Johnson, 2005), siendo Hemiptera, Coleoptera, Hymenoptera y Diptera los más importantes.

**c) Patógenos:** Los patógenos de artrópodos incluyen bacterias, virus, hongos, nemátodos y protozoarios. La mayoría de la investigación sobre el uso de patógenos para control biológico, sin embargo, se ha enfocado en formular microorganismos para aplicación específica del sitio como bioplaguicidas (Federici, 2007).

Para entender el valor de cualquier patógeno como parte del control biológico que afecta a una plaga, se debe entender la biología del patógeno. Para completar sus ciclos de vida exitosamente, la mayoría de los patógenos debe contactar a un hospedador, poder entrar a su cuerpo, reproducirse dentro de uno o más tejidos del

hospedador y emitir algún estado de vida que subsecuentemente contacte e infecte nuevos hospedadores. La forma en que un patógeno en particular cumple estos procesos, influenciará fuertemente los tipos de hospederos que infecte y el impacto que tendrá en la densidad promedio del hospedero (Van Driesche et al., 2007).

### 13.3.2 Enemigos Naturales del CHP

En el CHP, sobresalen de acuerdo a su abundancia relativa, los siguientes enemigos naturales: los parasitoides *Eretmocerus mundus* Mercet, 1931 (Hymenoptera: Aphelinidae), *Pseudapanteles dignus* Muesebeck y *Aphidius* sp. (Hymenoptera: Braconidae); y los depredadores generalistas *Chrysoperla externa* Hagen, 1861 (Neuroptera: Chrysopidae), *Eriopis connexa* Germar, 1824 y *Harmonia axyridis* Pallas 1772 (Coleoptera: Coccinellidae); y los hongos entomopatógenos *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.) Zare y Gams, *L. muscarium* (Petch) Zare y Gams, *L. longisporum* (Petch) Zare y Gams, *Isaria fumosorosea* Wize *I. javanica* (Frieder y Bally) Samson y Hywel-Jones (Toledo et al., 2004; Scorsetti et al., 2007; 2008; Luna et al., 2007; Rimoldi et al., 2008; Fogel et al., 2009; Schneider et al., 2009).

De estos organismos nos centraremos en las próximas secciones en la descripción detallada del depredador *E. connexa*, el cual es motivo de estudio en la presente tesis.

## 1.4. Manejo Integrados de Plagas

A partir de 1950, diez años después del advenimiento de la industria de los plaguicidas, se comienza a hablar del Manejo Integrado de Plagas (MIP). Esto surgió por una preocupación por parte de varios centros de investigación dedicados al estudio

del Control Biológico, en California, como también por la preocupación de trabajadores de cultivos de algodón tanto en América del Norte y América del Sur, al igual que productores de árboles frutales en Canadá, Estados Unidos y Europa, donde se alertó sobre los resultados catastróficos de la excesiva dependencia de los plaguicidas (Kogan, 1998). A finales de la década del 70, se comienza a definir el concepto del Manejo Integrado de Plagas (MIP), el cual se ha modificado durante varias décadas y ha habido distintas posturas sobre el mismo.

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

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

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

Si de sustentabilidad hablamos en los sistemas agroecológicos, el MIP es, desde hace varias décadas, el paradigma más adecuado y promisorio para la solución del problema de las plagas. Si bien se ha extendido a lo largo del todo el mundo, su enseñanza se ha incluido en los programas académicos de muchas universidades, su implementación ha sido algunas veces deficiente debido a la falta de integración y de aprovechamiento de diversas técnicas (Sarandón, 2002). Posiblemente, una de las barreras más difíciles de sortear para la implementación de programas de MIP, se relaciona con las presiones impuestas por las compañías multinacionales de producción de plaguicidas, ya que las técnicas de MIP reducen el mercado de estos insumos. (Kogan, 1998).

El MIP, como se mencionó anteriormente utiliza distintas técnicas de control de plagas, una de ellas es buscar una compatibilidad entre el control químico con insecticidas mas selectivos hacia la fauna benéfica y el control biológico, priorizando la conservación de los enemigos naturales de presencia espontánea en los agroecosistemas.

### **1.5 Los “Coccinélidos” y el control de plagas.**

Como se mencionó anteriormente (sección 1.3.2.1.b), el orden Coleoptera presenta numerosas familias que son depredadores importantes entre los que se encuentran los coccinélidos, los cuales son un grupo muy diversificado y se hallan distribuidos en todas partes del mundo (Giorgi et al., 2009).

La familia Coccinellidae presenta una diversidad de especies predadoras, existen abundantes antecedentes sobre la gran variedad de presas de las que se alimentan estos depredadores, entre las que se encuentran: pulgones (Obrycki et al., 2009), moscas blancas, cochinillas (Hodek and Honek, 2009), ácaros (Biddinger et al., 2009), huevos y larvas de Lepidópteros y Coleópteros (Evans, 2009).

Debido a esta amplitud de presas, se los considera a los coccinélidos depredadores polífagos, por otra parte su gran distribución mundial y la presencia espontánea en muchos agroecosistemas los convierte en potenciales agentes de control biológico (Weber & Lundgren, 2009).

Se ha llevado a cabo numerosos estudios tanto de laboratorio, invernáculo y campo sobre las contribuciones de los coccinélidos a la disminución de las tasas de crecimiento de poblaciones de áfidos (Hodek and Honěk, 1996). Por ejemplo, en un estudio a campo, se liberaron larvas *Coleomegilla maculata* (DeGeer) y *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) y se observó una reducción de la densidad máxima de *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) (pulgón verde del duraznero) en un 85% en comparación con el control de las jaulas, sin larvas de coccinélidos (Obrycki et al., 1998).

Dentro de los coccinélidos se encuentra el depredador generalista *Eriopsis connexa* considerado un potencial agente de control biológico de varios cultivos hortícolas de la Región Neotropical (Almeida-Sarmiento et al., 2007; Durante & Zenner de Polonia, 2006), tanto los estadios larvales como el adulto se alimentan de diferentes especies plagas.

### **1.5.1 *Eriopsis connexa***

#### **1.5.1.1 Sistemática y descripción morfológica**

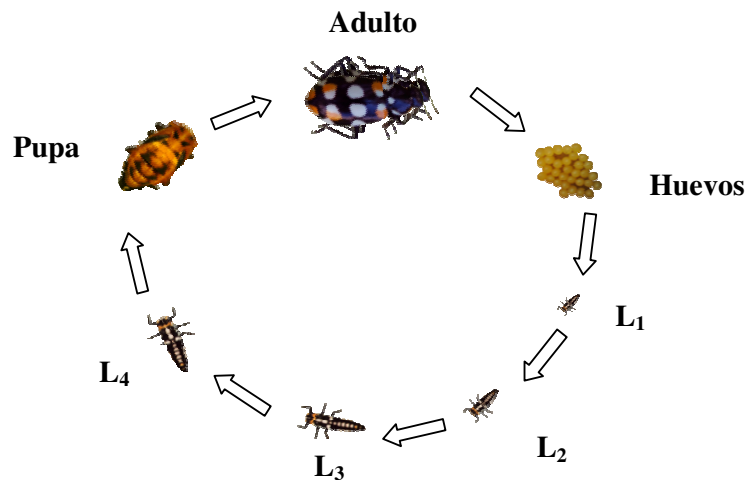
*Eriopsis connexa* fue descrito por primera vez por Germar en 1824. Al igual que todos los coleópteros se caracterizan por presentar el primer par de alas transformadas en escudos denominados élitros. Estos forman una armadura que protege la parte posterior del tórax, incluido el segundo par de alas. Los coccinélidos, conocidos vulgarmente como mariquitas, chinita o vaquita de San Antonio, son una familia

compuesta por unas 4.500 especies, que no suelen sobrepasar los 10 mm de longitud; tienen el cuerpo redondeado y convexo y presentan coloraciones vistosas, generalmente manchas negras sobre fondo rojo o amarillo; estos colores advierten de su desagradable sabor a sus depredadores, sobre todo aves (Montes, 1970).

La ubicación taxonómica es la siguiente:

PHYLUM: Arthropoda  
SUBPHYLUM: Hexapoda  
CLASE: Insecta  
SUBCLASE: Pterygota  
ORDEN: Coleoptera  
SUBORDEN: Polyphaga  
SERIE: Cucujiformia  
SUPERFAMILIA: Cucujoidea  
FAMILIA: Coccinellidae  
SUBFAMILIA: Coccinellinae  
TRIBU: Coccinellini  
GENERO: *Eriopis*  
ESPECIE: *Eriopis connexa*

La metamorfosis de *E. connexa* es completa (**Figura 1**), desde huevo, pasando por cuatro estadios larvales, pupa y adulto (Montes, 1970).



**Figura 1.** Esquema del ciclo de vida de *Eriopis connexa*

**Huevos:** los huevos son ovalados de color amarillo claro, las hembras los suelen poner en masas entre 20 a 25 muy ordenados y juntos. Al momento de eclosionar las larvas neonatas, el corion del huevo adquiere una coloración parda. Entre 19 y 27°C los huevos demoran en eclosionar alrededor de 3 días, con una viabilidad entre 80 y 90 % (Gyenge et al. 1998).

**Larvas:** esta especie pasa por 3 mudas y 4 estadios larvales, las larvas recién emergidas son muy delgadas de color pardo claro y semitransparentes (Montes, 1970). Luego de emerger las larvas se localizan alrededor del corion del huevo, alimentándose de éste y de aquellos huevos que no han eclosionado para luego dispersarse rápidamente. Son muy voraces y caníbales si la densidad de presas es insuficiente. (Martos y Niemeyer, 1990). La larva de cuarto estadio mide 7 mm de largo y 2,5 mm de ancho es de color gris oscuro con manchas anaranjadas en distintas partes del cuerpo (Montes, 1970). La duración de todo el período larvario en laboratorio es a 10,8 días 23°C; entre 8,5 y 12,5 días a 25°C; 11,8 días a 27°C (Gyenge, et al. 1998; Oliveira et al 2004; Silva, 2009)

**Pupa:** luego del cuarto estadio la larva deja de alimentarse, permanece inmóvil y se fija al sustrato por su último segmento abdominal, luego su cuerpo se esclerosa, se curva permaneciendo en forma convexa (Etchegaray y Barrios, 1979). La duración del período de pupa en laboratorio es: 5,7 días a 23°C; entre 3,1 y 3,7 días a 25 °C; 3,6 días a 27°C (Gyenge, et al. 1998; Oliveira, et. al 2004; Silva, 2009;).

**Adultos:** los adultos emergen del extremo anterior del pupario, a través de una línea medio dorsal de la región cefálica. Al momento de salir del pupario los élitros se observan de color amarillo claro y con el correr de las horas adquieren su coloración típica, fondo negro con manchas rojas y blancas. La cabeza prognata es negra, más angosta que el tórax. Las antenas tienen 11 segmentos pardos amarillentos y el pronoto



es negro en vista dorsal. *E. connexa* no presta dimorfismo sexual, pero los sexos se pueden diferenciar porque antes de oviponer, las hembras presentan el abdomen abultado que los élitros no alcanzan a cubrir (Etchegaray y Barrios, 1979).

La duración del ciclo desde larva hasta adulto en condiciones de laboratorio es de: 22,4 días a 21°C; entre 12, 6 y 17,4 días a 25°C (Martos y Niemeyer, 1990; Silva, 2009).

Bajo condiciones controladas el insecto permanece como adulto entre 200 días (Etchegaray y Barrios, 1979) y 260 días (Montes 1970). Sin embargo, Martos y Niemeyer (1990) han observado que las hembras pueden sobrevivir 360 días, aunque después de los tres meses de edad producen más huevos infértiles. Durante Gomez y Zenner de Polonia (2009), observaron que pocas hembras llegaron a ser longevas alcanzando como máximo 168 días. Para estos autores cada hembra puede llegar a oviponer un promedio de 112,65 huevos durante todo su ciclo de vida.

#### **1.5.1.2 Distribución geográfica.**

*Eriopis connexa* es originario de los Andes Peruanos donde se ha extendido hacia Argentina, Brasil, Chile y Uruguay y al resto de los países de Sud América, encontrándose en campo como en cultivos bajo cubierta (Almeida-Sarmiento et al., 2007; Durante Gomez y Zenner de Polonia, 2009).

#### **1.5.1.3 Importancia económica.**

Debido a su amplia distribución, diversidad de hábitats y su amplio rango de presas, lo hacen conveniente para su uso creciente en el control biológico de plagas, en varios cultivos (Martos y Niemeyer, 1990; Gyenge, et al., 1998; Almeida-Sarmiento et al., 2007; Durante Gomez y Zenner de Polonia, 2009; Silva, 2009).

Este coccinélido se ha introducido en los Estados Unidos de Norteamérica mediante Control Biológico Clásico para el control del áfido *Diuraphis noxia* (Mordv., 1913) (Quiroga et al, 1991; Miller, 1995; Michels et al., 1997).

### **1.6 Importancia de los estudios ecotóxicológicos sobre los organismos benéficos.**

Como se mencionó anteriormente, uno de los objetivos principales del Manejo Integrado de Plagas es aplicar distintas herramientas para el control de plagas de cultivos. Entre estas herramientas se destaca la búsqueda de la compatibilidad de los insecticidas con la fauna benéfica.

La Organización Internacional para la Lucha Biológica (IOBC), plantea una metodología secuencial que clasifica a los plaguicidas en cuatro categorías a partir de ensayos de toxicidad en laboratorio, éstos estudios de efectos secundarios se enfocan en el efecto letal, estimando la mortalidad: 1= inocuo (<30%); 2= levemente tóxico (30-79%); 3= moderadamente tóxico (80-98%); y 4= tóxico (<99%) y en otros casos la capacidad benéfica. (Hassan et al., 1994).

Actualmente este tipo de estudios están siendo muy discutidos ya que no se consideran los efectos subletales de los plaguicidas sobre los enemigos naturales, principalmente con aquellos que están relacionados con la capacidad de los enemigos naturales como agentes de control biológico. Stark et al. (2007) ha demostrado que la metodología de la IOBC no refleja la acción toxica de un plaguicida, ya que subestima a la misma, debido a que los parámetros evaluados no son siempre los más relacionados con el desempeño de los enemigos naturales. Se hace necesario incorporar otros estudios a nivel ecológico (aspectos reproductivos, neurofisiológicos de comportamiento), para evaluar el potencial de los plaguicidas sobre la fauna benéfica, lo

cual también ayudaría a desarrollar evaluaciones de riesgo de manera más completa (Haynes 1988; Desneux et al., 2007).

## **CAPITULO 2**

# **OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

## 2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la toxicidad de insecticidas comúnmente utilizados en cultivos hortícolas del Cinturón Hortícola Platense, sobre distintos estados del depredador generalista *Eriopis connexa* mediante bioensayos de laboratorio. Estos estudios permitirán seleccionar a los insecticidas más selectivos para uso en conjunto con éste insecto benéfico. Los resultados de estos estudios servirán a futuro como base para rediseñar estrategias de control de bajo impacto ambiental en el marco del Manejo Integrado de Plagas (MIP).

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la susceptibilidad de distintos estados de desarrollo del depredador *Eriopis connexa* hacia los diferentes productos a través de distintas vías de exposición, mediante bioensayos de laboratorio.
- 
- Evaluar la toxicidad, analizando efectos letales y subletales de los insecticidas seleccionados sobre los parámetros vitales, principalmente aquellos relacionados con su desempeño como agente de control biológico.
- 
- Establecer la compatibilidad de los insecticidas evaluados seleccionando aquellos que muestren un mínimo impacto sobre el insecto benéfico

### 2.3 HIPOTESIS DE TRABAJO

1. Los insecticidas utilizados en cultivos hortícolas afectan negativamente, tanto directa como indirectamente a *Eriopis connexa*, alterando sus parámetros vitales y por ende su desempeño como agente potencial de Control Biológico.

2. Nuevos grupos de insecticidas (no-convencionales), resultan más selectivos hacia organismos no blanco (depredadores) y por esto representan una alternativa para el control de plagas.

3. Los insecticidas convencionales, condicionan el desempeño del depredador *Eriopis connexa* como agente potencial de Control Biológico, afectándolo a nivel biológico y fisiológico.

## **CAPITULO 3**

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se describen los materiales y métodos generales empleados en esta tesis para: 1)- puesta a punto en laboratorio de la cría del depredador, seleccionado como organismos diagnóstico, y de su presa y 2)-diseño, protocolos y estandarización de bioensayos de laboratorio.

La metodología particular para cada tipo de bioensayo, es abordada en detalle para cada uno de los capítulos que conforman esta tesis.

#### 3.1 Recolección de organismos a campo (*E. connexa*)

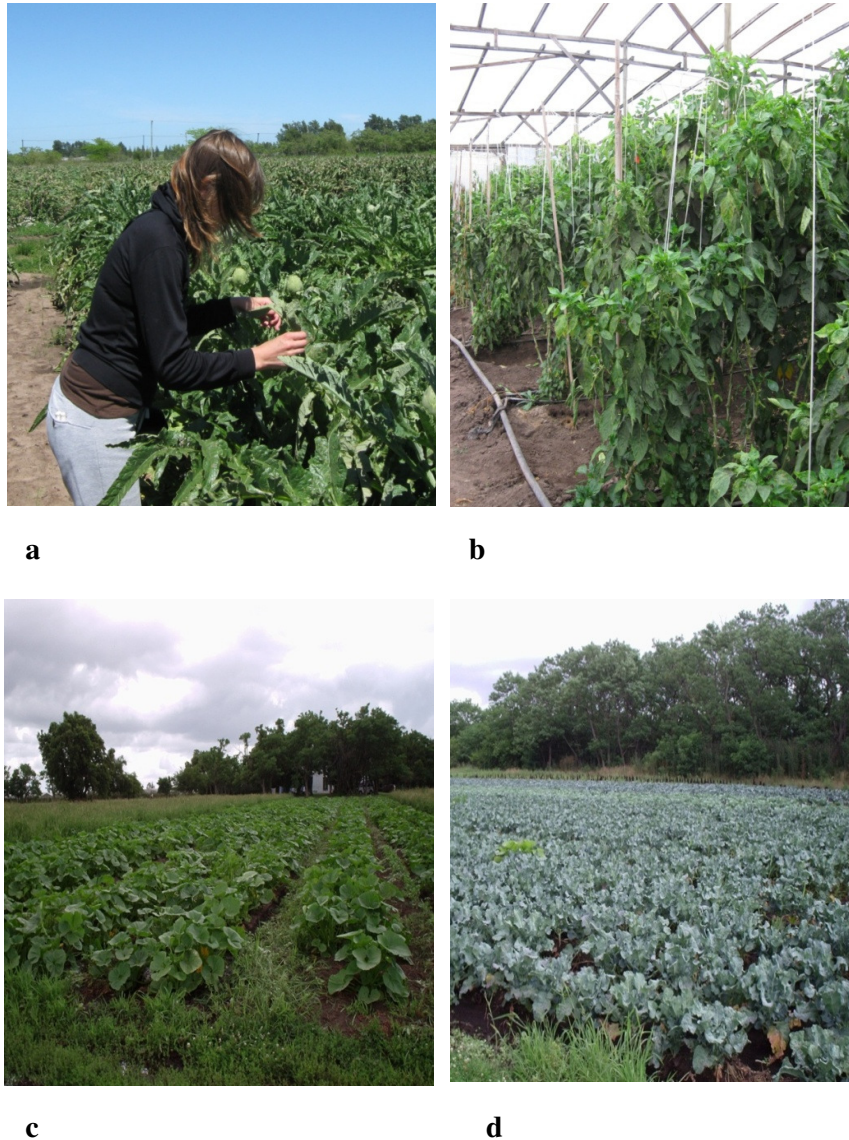
La recolección de los organismos se realizó en cultivos hortícolas tanto a campo como bajo invernáculos en diferentes sitios del Cinturón Hortícola Platense (CHP), Provincia de Buenos Aires (**Figura 3.1**).

La recolección de organismos adultos y estadios larvales encontrados en los cultivos se realizó de manera manual y arrastre mediante red entomológica. Para el muestro de los cultivos a campo se delimitó un área de 600 m<sup>2</sup>, luego se tomaron hileras de cultivos de manera intercalada y en cada hilera se muestrearon cada dos plantas. Para el caso de los cultivos bajo invernáculo se delimitó un área de 400 m<sup>2</sup>, procediéndose de la misma manera que en los cultivos a campo. En los cultivos a campo y malezas se utilizó la red de arrastre.

Una vez capturados los organismos, se los transfirió a bolsas de polietileno y se los colocó en conservadoras para su transporte hasta el laboratorio. En la **tabla 3.1** se detallan los sitios de muestreo, cultivos dónde de recolectó el material biológico y la forma de manejo de cada cultivo.



Este mismo procedimiento se siguió durante los años siguientes al establecimiento de la cría del depredador en laboratorio, realizando los muestreos en forma periódica durante los meses noviembre a mayo, a fin de renovar las crías de laboratorio incorporando material nuevo para mantener la variabilidad alélica y por lo tanto la calidad de mismas.



**Figura 3.1:** Fotografías de de los sitios de muestreo pertenecientes al Cinturón Hortícola Platense (CHP). a) Olmos; b) Colonia Urquiza (Quinta Maita); c) y d) Colonia Urquiza (Quinta La Anunciación)

**Tabla 3.1:** Establecimientos hortícolas donde se realizaron los muestreos para la obtención de organismos utilizados en la cría en laboratorio y posterior uso en ensayos de toxicidad.

Sitio de muestreo Lugar/Establecimiento	Tipo de cultivo	Forma de manejo de los cultivos
Colonia Urquiza: “La Anunciación”	Zapallito verde ( <i>Cucurbita pepo</i> ), berenjena ( <i>Solanum melongena</i> ).	<b>Orgánicos:</b> no se utilizan plaguicidas sintéticos para controlar plagas.
Los Hornos: “La Nueva Era”	Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) Frutilla ( <i>Fragaria vesca</i> ) Berenjena ( <i>S. melongena</i> ) Pimiento ( <i>Capsicum annum</i> )	
Parque Pereyra Iraola: “García”*	Alfalfa ( <i>M. sativa</i> ) Repollo ( <i>Brassicae oleracea</i> ), malezas y espontáneas.	
Colonia Urquiza: “Maita”*	Pimiento ( <i>C. annum</i> ), tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ).	<b>Integrados:</b> se utiliza control químico pero de acuerdo a los monitoreos, no se utilizan plaguicidas convencionales.
Olmos: “Zembo”*	Frutilla ( <i>F. vesca</i> ), alcaucil ( <i>Cynara scolymus</i> )	<b>Convencionales:</b> control químico con plaguicidas convencionales y los tratamientos son realizados sin monitoreo previo, siguiendo la aplicación calendario.
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales: “Estación Experimental Julio Hirschhorn”	Alfalfa ( <i>M. sativa</i> ), trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).	Cultivo No Comercial y/o espontáneas

\*Se consigna el nombre del establecimiento

### 3.2 Cría de organismos en laboratorio

#### 3.2.1 Cría y mantenimiento de *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae): (presa).

Para llevar a cabo la cría y los experimentos con el depredador, fue necesario poner a punto también la cría de la presa que se utilizó como alimento. Se seleccionó para tal efecto al pulgón de la avena, *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae). La elección de esta especie de pulgón se debió principalmente a su facilidad para reproducirlo en laboratorio, utilizando plantines de trigo (con dos días de germinado como máximo). Las colonias se iniciaron con material de pulgón

suministrado inicialmente por la Ing. Agr. Mónica Ricci de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Para el desarrollo de *R. padi* se utilizaron plantas de trigo *Triticum aestivum* (var. JN3016 y ACA 901 de ciclo largo), las que se desarrollaron con semillas provistas por el INTA Marcos Juárez (Ing. Agr. Carlos Bainotti) y posteriormente por la Asociación de Cooperativas Argentinas (Ing. Agr. Armando Junquera).

Para que las semillas de trigo germinen se remojaron en una bandeja de plástico (18 cm x 13 cm) durante dos horas, pasado éste período se eliminó el exceso de agua, se tapó la bandeja y se mantuvo así durante uno a dos días hasta que se observó presencia de la radícula. Luego, se sembraron las semillas en macetas de 5 cm de alto por 6 cm de ancho, se colocaron alrededor de 12 macetitas en recipientes de PVC, la parte superior de los recipientes se cubrió con “voile” para favorecer la ventilación (figura 3.3). Cada tres días se incorporaron nuevas plantas germinadas para luego poder liberar en ellas pulgones provenientes de plantas ya infestadas, a fin de favorecer su multiplicación y así mantener un stock suficiente de presa para la cría del depredador. Las plantas de trigo fueron regadas periódicamente con agua de red y cada 15 días se adicionó a la solución un fertilizante triple NPK y hormona de crecimiento (Fertifox Potenciado<sup>®</sup>), en concentración de: nitrógeno N (14,2%), fósforo P (3,1%), potasio K (4,3%) y ácido naftalen acético (42 mg) para asegurar un buen estado nutricional de las mismas.

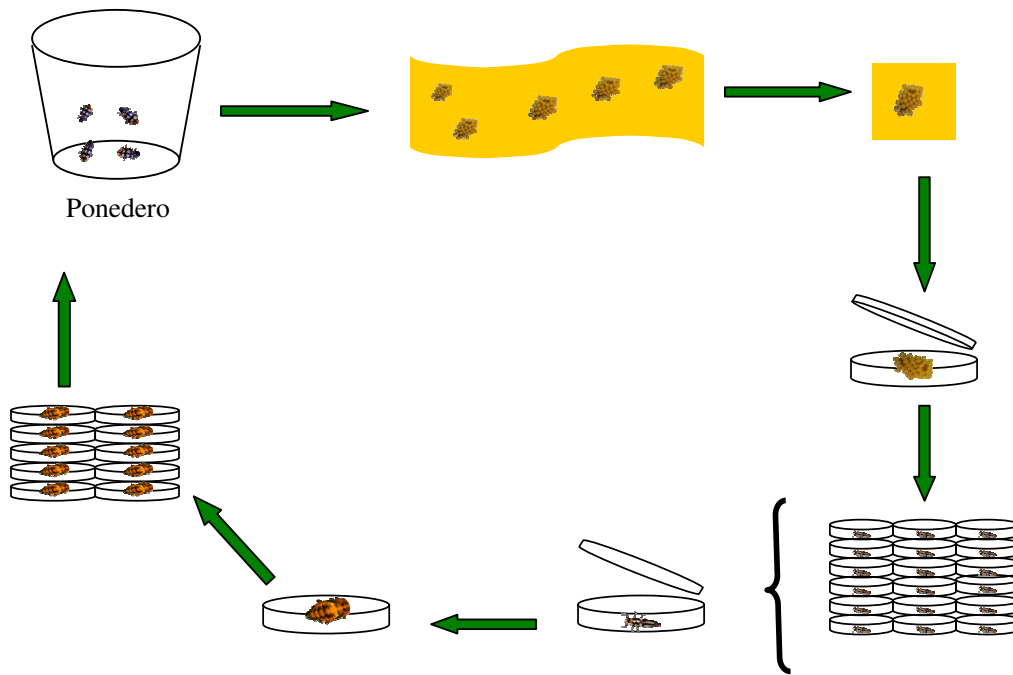
### **3.2.2 Cría y mantenimiento de *E. connexa* (depredador)**

El estado sanitario de los organismos criados en laboratorio es de suma importancia, ya que incide directamente en la calidad de los bioensayos de toxicidad para la evaluación de los efectos de los insecticidas. Es por ello que la puesta a punto, mantenimiento e incorporación de material de campo a las colonias ya establecidas fue

primordial dentro de las actividades experimentales desarrolladas en el presente estudio. Individuos con deficiencias nutricionales o de baja calidad sanitaria, no pueden tomarse como organismos diagnóstico.

Una vez realizados los muestreos a campo, los organismos fueron llevados al laboratorio donde se registraron los distintos estadios del depredador de *E. connexa*, se separaron y acondicionaron en recipientes de cría como los descritos anteriormente, dependiendo del estadio del organismo y se los dejó en cuarentena para descartar enfermedades y/o parasitismo. Cumplido el tiempo de cuarentena, se inició la cría masiva con las progenies de los individuos sanos. La metodología de mantenimiento de cría se esquematiza en la **Figura 3.2**.

Los adultos fueron liberados dentro de recipientes de plástico de 18 cm de diámetro y 15,5 cm de alto, cubiertos en su parte superior con “voile” para una mejor ventilación y a la vez para evitar que los organismos se escapen. El interior del recipiente fue forrado con papel madera para ser utilizado como sustrato de oviposición por las hembras. Se colocaron aproximadamente 15 parejas de adultos por recipiente. Se les suministró alimento *ad libitum*, mediante tres plantas de trigo infestadas con abundante cantidad de ninfas y adultos del pulgón de la avena *R. padi* y como suplemento alimenticio, pasas de uva y dieta artificial a base de hígado vacuno (Martos y Neimeyer, 1990). Posteriormente en forma periódica se revisaron los recipientes de cría de adultos para extraer los plastones de huevos y se realizó el recambio de alimento. Cada uno de los plastones se los colocó en cajas de Petri plásticas (9 cm diámetro y 1,5 cm alto) y se las llevó a la cámara de cría. Al cabo de tres días aproximadamente se observaron los plastones de huevos bajo lupa binocular para determinar la eclosión de los huevos.



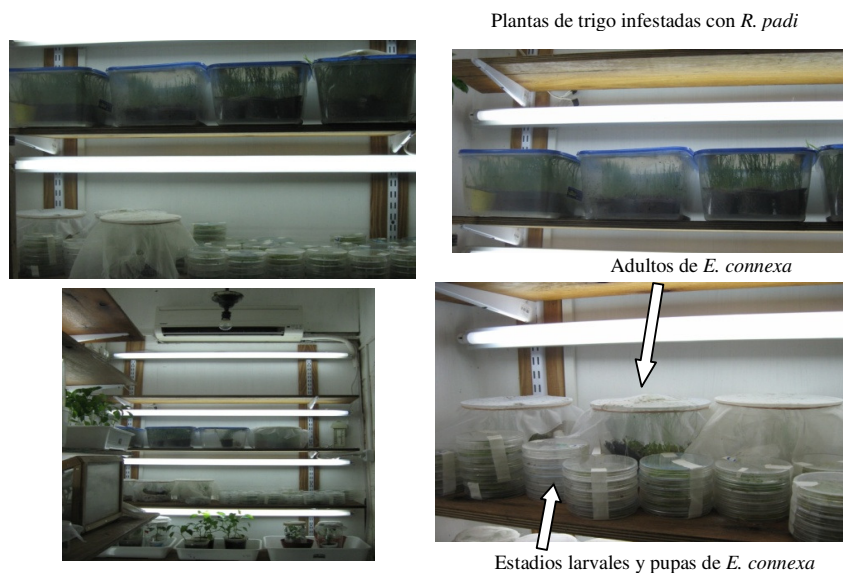
**Figura 3.2** Esquemización de la metodología de cría de *Eriopsis connexa*

Una vez que los huevos eclosionaron y se observó la presencia de larvas neonatas, inmediatamente las mismas fueron separadas mediante un pincel fino colocándolas individualmente en cajas de Petri, esto fue muy importante realizarlo durante todo el procedimiento de cría como también para los bioensayos, ya que es común el canibalismo en coccinélidos independientemente de la presencia de presa (Martos y Niemeyer, 1990; Obrycki y Kring, 1998). Las larvas se mantuvieron en las mismas placas hasta que completaron todo su ciclo de vida llegando a adultos, identificando a todos los organismos de acuerdo a la cohorte que pertenecían. Todos los estadios larvales fueron alimentados con ninfas y adultos de *R. padi*. En el caso de los estadios larvales L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> se les suministró como suplemento alimenticio una dieta artificial (Martos y Neimeyer, 1990).

La forma de suministro de la dieta se realizó de la siguiente manera: se recortaron trozos de 1cm x 1 cm de Parafilm®, los cuales se estiraron y sobre cada uno se colocó una porción de dieta (~0,125 ml), se unieron las puntas y se cerraron en forma de “domo”, de acuerdo con la técnica de Ferkovich et al. (2007) para la cría de Anthocoridae. La dieta preparada (Martos y Neimeyer, 1990) se colocó a -20°C para su conservación. Cada dos días se revisaron las larvas y se renovó la dieta. Asimismo, se limpiaron las cajas de Petri en forma periódica con alcohol 70% para prevenir la proliferación de patógenos.

### 3.3 Condiciones generales de cría y de ensayos

Para el mantenimiento y cría de los organismos, como también para llevar a cabo los bioensayos toxicológicos, se utilizaron dos cámaras de cría acondicionadas a  $25\pm 2$  °C,  $70\pm 5$  % HR y un fotoperíodo de 16:8h L:O. Las cámaras contaban con termómetros de precisión (máximo y mínimo), higrómetros (máximo y mínimo) y un reloj para regular el fotoperíodo, como así también un sistema de ventilación que permitía la renovación de aire y la homogenización de las condiciones ambientales (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Cámaras de cría donde se llevo a cabo la cría de los organismos y los bioensayos toxicológicos

### 3.4 Metodología general de preparación y aplicación de los insecticidas evaluados

#### 3.4.1. Preparación de soluciones y suspensiones de insecticidas.

Las soluciones o suspensiones de insecticidas utilizadas en los bioensayos ecotoxicológicos fueron preparadas al inicio de cada experimento. Se prepararon soluciones stock y a partir de ésta se realizaron las diluciones correspondientes a las concentraciones de exposición seleccionadas para estos estudios. Los solventes utilizados fueron agua destilada y acetona dependiendo del tipo de ensayo y método de exposición al insecticida seleccionado (ingestión, inmersión, tópico, etc.).

Para la evaluación de toxicidad se partió de las máximas concentraciones recomendadas para campo (MCRC) para cada insecticida y se incorporaron luego a la evaluación concentraciones menores a fin de evaluar efectos subletales, por lo que realizaron diluciones a partir de la MCRC para cada insecticida a evaluar (Darvas y Polgar, 1998).

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

**Tabla 3.2** Insecticidas utilizados en los ensayos de toxicidad con *E. connexa*

<b>Ingrediente activo</b>	<b>Nombre comercial</b>	<b>Pureza</b>	<b>MDRC (mg i.a./L)</b>	<b>Empresa fabricante</b>
Pirifoxifen	Epingle <sup>®</sup>	10% p/v	75	Summit-Agro S.A.
Teflbenzurón	Nomolt <sup>®</sup>	15 % p/v	45	BASF S.A.
Acetamiprid	Mospilan <sup>®</sup>	20 % p/p	200	Summit-Agro S.A.
Cipermetrina	Glextrin25 <sup>®</sup>	25 % p/v	25	Gleba S.A.

**MDRC:** Máxima Dosis Recomendada para Campo- Los productos ensayados fueron provistos gratuitamente por los fabricantes indicados en la tabla.

### 3.4.2 Metodologías utilizadas para la aplicación de los insecticidas

En este punto se desarrolla en líneas generales los diferentes tipos de ensayos evaluados en la tesis en función de las metodologías convencionales y la vía de exposición de los organismos a los insecticidas (Hassan, 1994; Viñuela et al., 2001; Schneider et al., 2004 a, b, 2008; Rimoldi et al., 2008; Fogel et al., 2009).

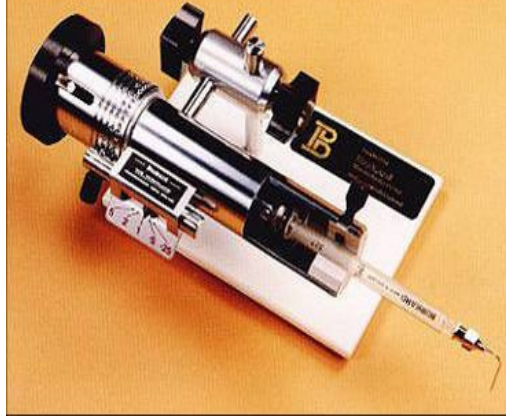
**Inmersión:** consiste en sumergir a los organismos durante cierto tiempo en una solución de un insecticida dado, utilizando como solvente agua destilada. A la solución se le agrega un tensoactivo (Tween®80 al 0,01%) para una mejor adhesión de los insecticida a la superficie tratada (**Figura 3.4**).



**Figura 3.4.** Exposición por inmersión, huevos de *E. connexa*

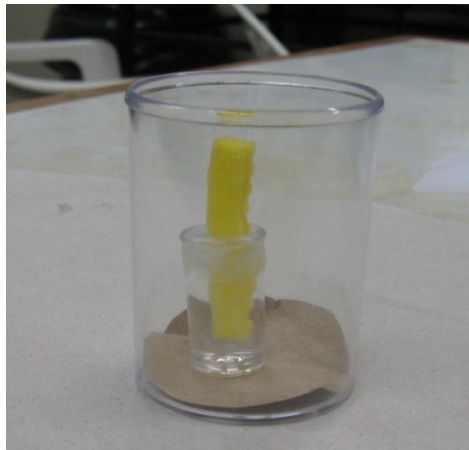
**Aplicación tópica:** este tipo de aplicación se realiza mediante un microaplicador manual (Burkard®, UK), colocando sobre el organismo una gota de volumen conocido de la solución del insecticida a evaluar. En este caso se utiliza como solvente acetona para facilitar una rápida evaporación de la gota, asegurando la deposición del insecticida sobre la cutícula del insecto (Busvine, 1971) (**Figura 3.5**).





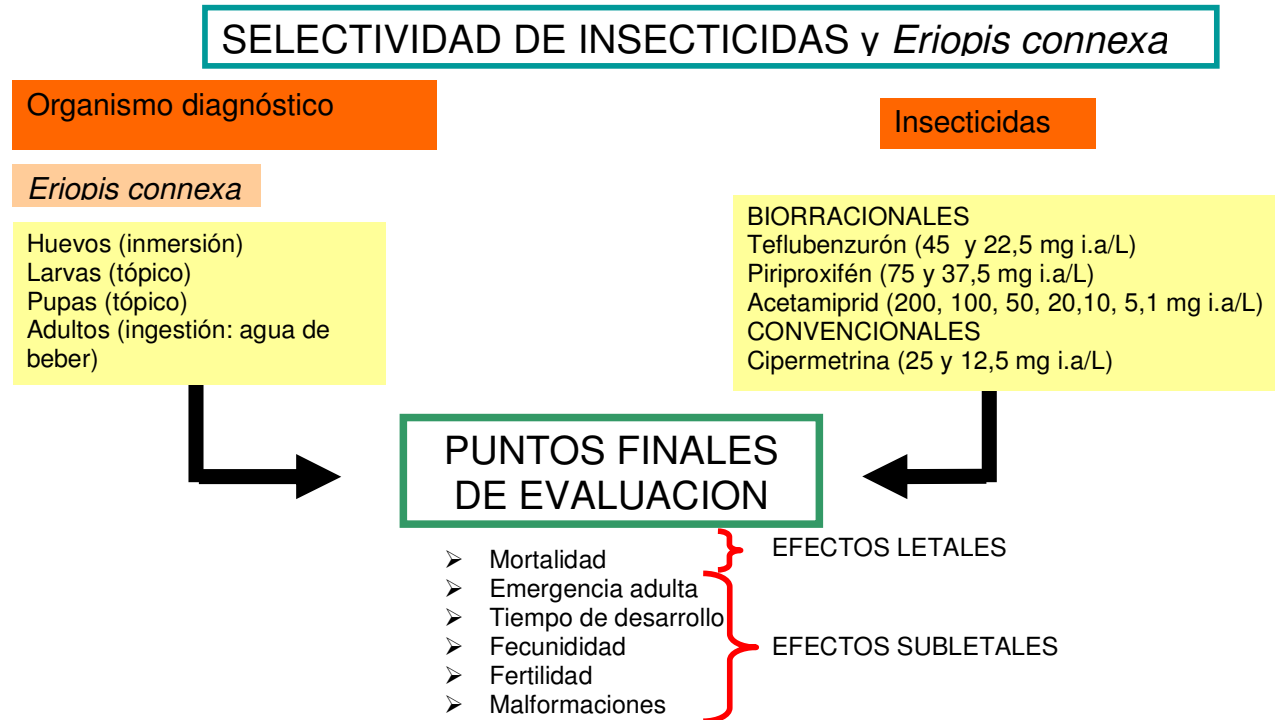
**Figura 3.5** Microaplicador manual (Burkard®, UK), ensayos de exposición tópica.

**Ingestión:** Se trata de exponer a los organismos a presas (mediante inmersión o tópicamente), dieta artificial o agua de beber tratadas con el insecticida a evaluar. Los organismos pueden ser expuestos durante un determinado período variable desde horas hasta días consecutivos, (de acuerdo a eso se evaluará la toxicidad aguda o crónica (**Figura 3.6**)).



**Figura 3.6** Metodología de exposición por ingestión: agua de beber.

**3.5 Diseño general del proceso de evaluación de efectos toxicos de insecticidas sobre el predador *E. connexa* en condiciones de laboratorio**



### 3.6. Análisis estadístico

Los resultados de las variables evaluadas en los diferentes ensayos, fueron sometidos a análisis estadísticos a fin de determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

Se utilizó el método paramétrico de Análisis de la Varianza (ANOVA). El primer paso fue analizar la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de las varianzas a través de la prueba de Barlett. En el caso que los datos se ajustaron a estos supuestos se procedió a realizar el ANOVA. Si algunas de las premisas no fue cumplida se realizaron transformaciones, seleccionándose según la escala en la cual estaban expresados los datos (Zar, 1996). Las transformaciones utilizadas fueron la logarítmica  $y = \log(x+1)$  y para los datos expresados en porcentajes o proporciones que se utilizó la transformación angular:  $p' = \arcseno\sqrt{p}$  donde  $p$  corresponde al valor original y  $p'$  corresponde a su valor transformado. Una vez realizadas las transformaciones correspondientes, los datos fueron sometidos nuevamente a la comprobación de la normalidad y homocedasticidad. Si los supuestos siguieron sin cumplirse, fue necesario utilizar un test no paramétrico para el análisis de los datos. El test utilizado en estos casos fue el test Kruskal-Wallis, realizándose la prueba bilateral de Dunn para comparaciones múltiples por pares.

Para el análisis a posteriori de los datos sometidos a ANOVA, se realizó la separación de medias mediante el test LSD. En los casos donde se deseaba conocer diferencias entre todos los tratamientos, para evaluar diferencias con el control, se utilizó el test de Dunnet.

Para la realización de las pruebas estadísticas se utilizó el programa XLStat (Addinsoft XLstat para Excel, Paris, Francia, 2009) con un nivel de significancia de 95% ( $p < 0,05$ ).

## CAPITULO 4

**Evaluación de efectos toxicológicos de  
piriproxifen, teflubenzurón, acetamiprid  
y cipermetrina sobre huevos de *Eriopsis  
connexa*.**

#### **4. Evaluación de efectos tóxicos de piriproxifen, teflubenzurón, acetamiprid y cipermetrina sobre huevos de *Eriopsis connexa***

##### **4.1 Materiales y Métodos**

###### **4.1.1. Obtención de huevos para los bioensayos de toxicidad.**

Se utilizaron huevos de  $\leq 48$  h de edad del predador. Para obtener los mismos se liberaron 30 adultos recién emergidos provenientes de una misma cohorte en un recipiente de plástico (“ponedero”) y se les suministró como alimento pulgón de la avena (*R. padi*) *ad libitum*. Luego de 5 días aproximadamente, se revisaron los recipientes con adultos y en el caso de observar la presencia de hembras ovíparas (abdomen sobresaliendo de los élitros), las mismas fueron separadas inmediatamente, colocadas en otros ponederos forrados con papel madera como sustrato de oviposición, a las cuales se les suministró *ad libitum* pulgón de la avena. Periódicamente se observaron las hembras para poder obtener un número suficiente de “plastonos de huevos” (huevos en masa) y asegurar que los mismos fueran de  $\leq 48$  h de edad. Los mismos se colocaron en cámaras de cría ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  HR y 16:8h L:O) hasta que alcanzaron la edad requerida para iniciar los ensayos de toxicidad.

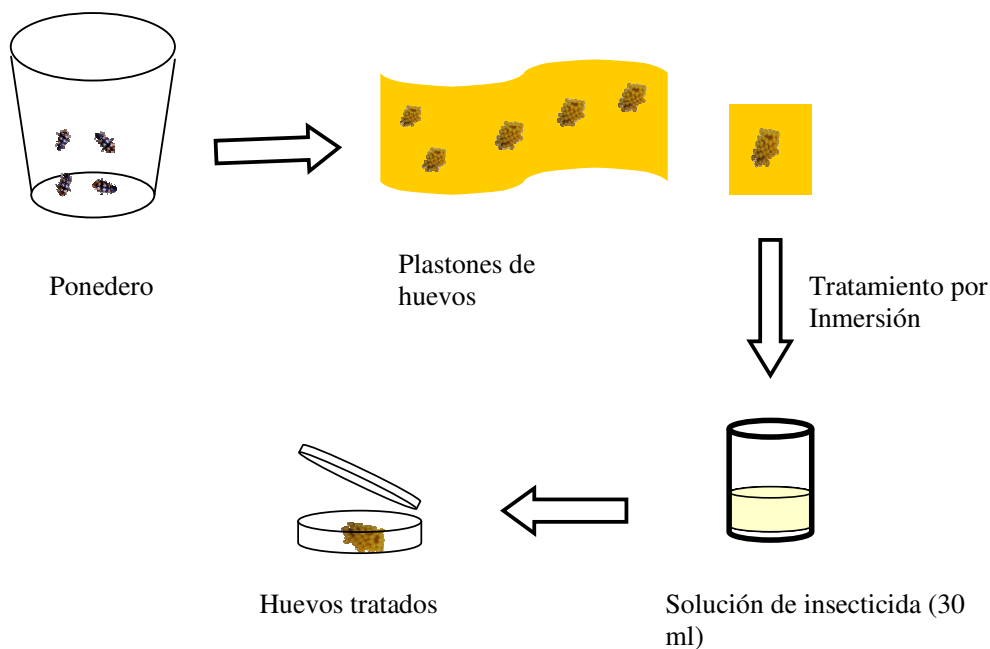
###### **4.1.2. Bioensayos**

Se evaluaron las MCRC (Máxima Concentración Recomendada para su uso en el Campo) y diluciones al 50 % de las mismas de los siguientes productos comerciales: Epingle<sup>®</sup> (10% p/v piriproxifen, Summit-Agro S.A), Nomolt<sup>®</sup> (15 % p/v teflubenzurón, BASF S.A.), Mospilan<sup>®</sup> (20% p/p acetamiprid, Summit-Agro S.A) y Glextrin25<sup>®</sup> (25 % p/v cipermetrina, Gleba S.A.). Las concentraciones usadas fueron: piriproxifen 75 y 37,5 mg i.a./L, teflubenzurón 45 y 22,5 mg i.a./L, acetamiprid 200 y 100 mg i.a./L y cipermetrina 25 y 12,5 mg i.a./L.

Las soluciones de insecticidas fueron preparadas usando agua destilada, adicionando un tensoactivo (Tween 80<sup>®</sup> 0,01%) para facilitar la adhesión del insecticida al corion del huevo. Se realizaron controles con agua destilada + tensoactivo.

Los “plastones de huevos” de  $\leq 48$  h de edad fueron sumergidos en cada una de las soluciones durante 15 segundos siguiendo la metodología descrita por Pineda et al (2004). Se utilizaron 3- 4 réplicas (20-30 huevos) para cada uno de los tratamientos. Una vez sumergidos, se dejaron secar, se colocaron en cápsulas de Petri (9 cm diámetro y 1,5 cm alto) y se llevaron a cámara climatizada (**Figura 4.1**).

A las 24 h postratamiento y durante 7 días consecutivos se revisaron las masas de huevos bajo lupa binocular para registrar el número de huevos eclosionados. Aquellos que no eclosionaron durante ese período se consideraron muertos.



**Figura 4.1** Esquemización de metodología de exposición de huevos de *E. connexa* a insecticidas.

Se evaluó como efecto a corto plazo de los insecticidas el porcentaje de eclosión a partir de la siguiente fórmula:  $N^{\circ}$  de huevos eclosionados /  $N^{\circ}$  huevos inicial X 100. Una vez emergidas las larvas neonatas, éstas fueron separadas inmediatamente mediante un pincel fino, se colocaron individualmente en cápsulas de Petri (9 cm de diámetro) a fin de evitar canibalismo entre ellas y se las alimentó cada dos días con pulgón de la avena en exceso. Los huevos de los cuales no emergió ninguna larva se fijaron en solución de Bouin®, luego se deshidrataron en series de etanol grado analítico (70, 90 y 100%) y se montaron entre porta y cubre objetos mediante solución de Hoyer®

Los efectos a largo plazo de los insecticidas se evaluaron a partir del número de larvas emergidas (consideradas como sobrevivientes a los tratamientos al estado de huevo) y como puntos finales se consideraron: supervivencia y tiempo de desarrollo para cada uno de los estados inmaduros del predador (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub> y pupa) y porcentaje de pupas formadas con respecto a los huevos eclosionados. Con los individuos que completaron el ciclo de vida se evaluó la emergencia adulta respecto a pupas y respecto a huevos eclosionados.

En los tratamientos donde los organismos completaron su ciclo de desarrollo y sobrevivieron al estado adulto, se evaluó la fecundidad y fertilidad de las hembras, analizando la oviposición durante tres días consecutivos posteriores a la identificación de las hembras grávidas. Para esto, una vez que los individuos llegaron a adultos se colocaron juntos por tratamiento en recipientes plásticos (“ponederos”) y se les suministró pulgón de la avena (*R. padi*) *ad libitum* para favorecer el desarrollo ovárico de las hembras (imprescindible para la separación de sexos). Luego de cinco días se separaron 10 hembras grávidas como mínimo por tratamiento. Cada una fue

individualizada y colocada en vasos de plástico de 7 cm de alto x 5 cm de diámetro, forrados interiormente con papel madera como sustrato de oviposición y se les proporcionó pulgón como presa y dieta artificial como suplemento alimenticio a fin de evitar la reabsorción de huevos. Durante los primeros tres días consecutivos, se registraron el número de huevos puestos (fecundidad) y la emergencia larval a partir de esos huevos (fertilidad) por hembra y tratamiento.

#### 4.1.3 Análisis estadístico

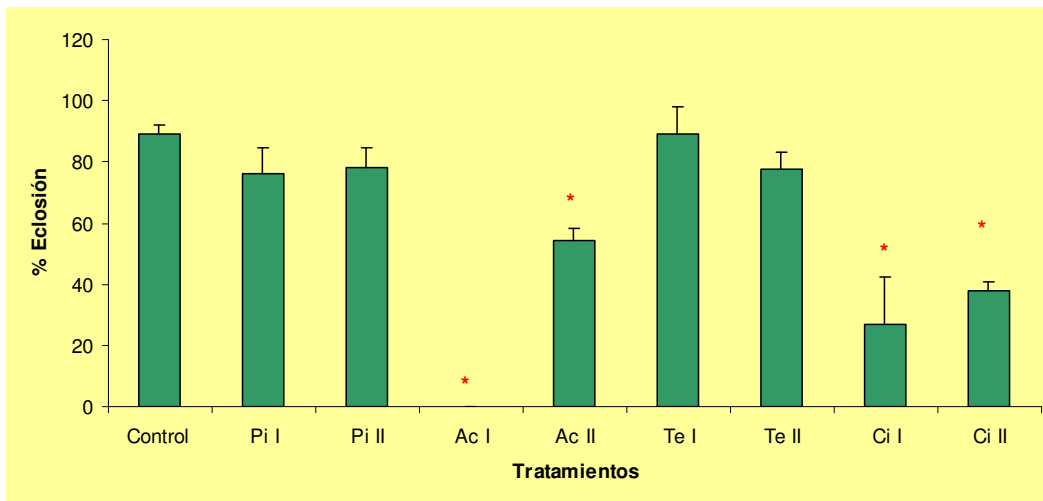
Los datos fueron sometidos a Análisis de la varianza (ANOVA), se corroboraron las premisas del ANOVA mediante pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk, Anderson-Darling y Jaques-Vera) y la homocedasticidad de las varianzas (Barlett y Levene). Si alguna de las premisas no fue cumplida se realizaron transformaciones, logarítmica  $y = \log(x+1)$  y angular:  $p' = \arcseno\sqrt{p}$ , para los datos expresados en porcentajes o proporciones. Para el análisis a posteriori de los datos sometidos a ANOVA, se realizó la separación de medias mediante el test LSD para conocer diferencias entre todos los tratamientos y para evaluar diferencias con el control se utilizó el test de Dunnet. En aquellos datos donde no se cumplieron los supuestos de ANOVA, se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, realizándose la prueba bilateral de Dunn para comparaciones múltiples. Se utilizó el programa XLStat (Addinsoft XLstat para Excel, 2009).

## 4.2 Resultados

*a) Efectos de insecticidas sobre la eclosión de los huevos.* Como se puede observar en la **Figura 4.2**, el tratamiento con acetamiprid a la MCRC (200 mg i.a/L) ocasionó un

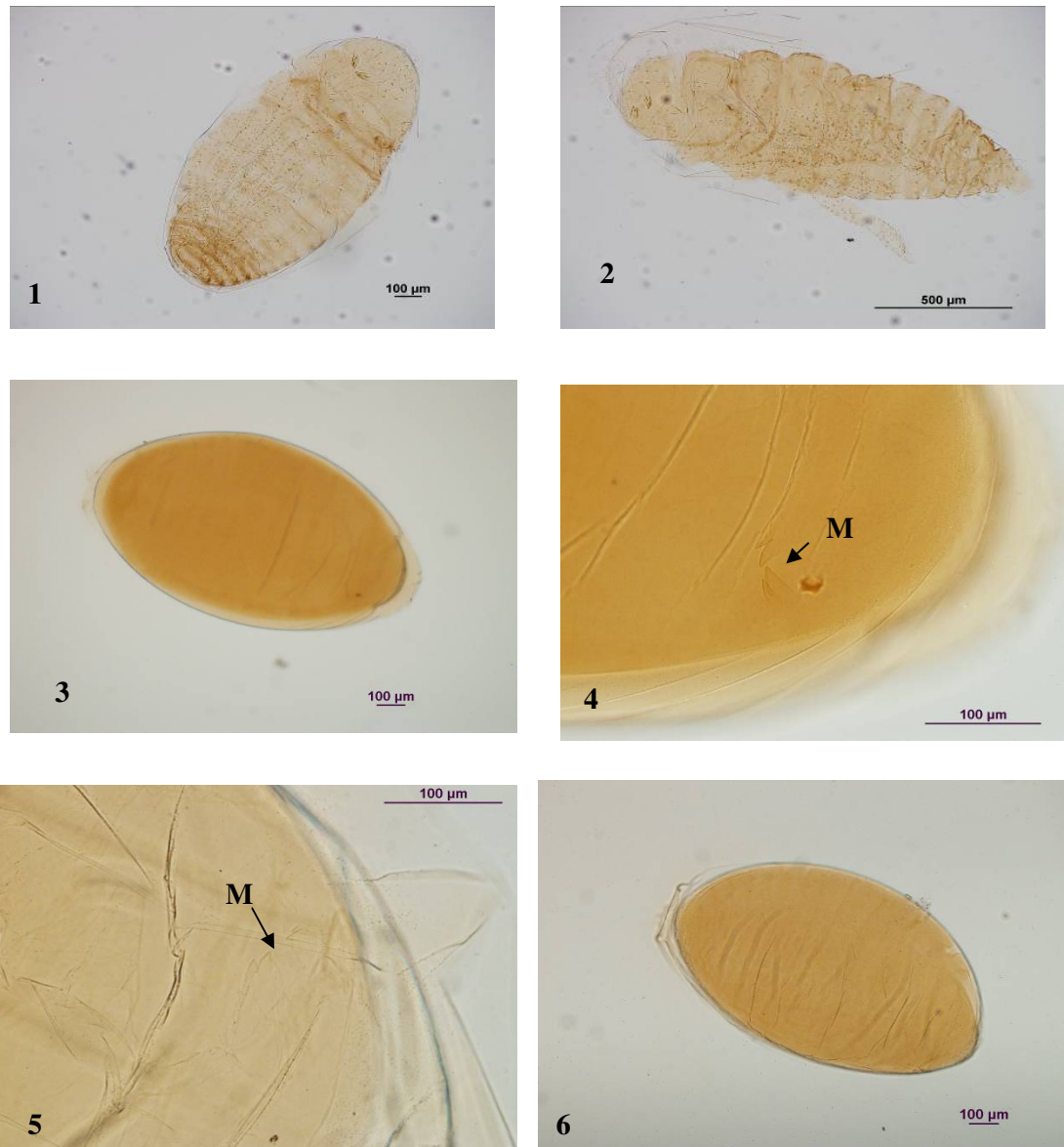


100% de mortalidad de los huevos tratados. Los mismos fueron observados durante 7 días consecutivos (la eclosión se produce en general a los 3-4 días post-oviposición). La mortalidad embrionaria fue corroborando a través de la observación de los preparados al microscopio (**Figura 4.3**). En el tratamiento con acetamiprid al 50 % de la MCRC (100 mg i.a./L), como también con cipermetrina en ambas concentraciones (25 y 12,5 mg i.a./L), se observó una diferencia significativa en el porcentaje de eclosión de los huevos con respecto al control, registrándose valores de eclosión de 54,1%; 26,7% y 37,0%, respectivamente. En los tratamientos con piriproxifen (75 y 37,5 mg i.a./L) y teflubenzurón (45 y 22,5 mg i.a./L), los porcentajes de eclosión fueron similares a los del tratamiento control.



**Figura 4.2.** Porcentaje de eclosión de huevos tratados. Los datos corresponden a valores promedios  $\pm$  ES ( $p \leq 0,05$ ).

\* Indica diferencias significativas con el control. PI= 75 mg i.a. (piriproxifen)/L; PII= 37,5 mg i.a. (piriproxifen)/L; AI= 200 mg i.a. (acetamiprid)/L; AII= 100 mg i.a. (acetamiprid)/L; CiI=25 mg i.a. (cipermetrina)/L; CiII=12,5 mg i.a. (cipermetrina)/L



**Figura 4.3** Huevos de *E. conexa* expuestos a acetamirpid  
1)- 2) Control; 3)- 4) Acetamirpid 200 mg i.a/L; 5)- 6) Acetamirpid 100 mg i.a/L  
M= mandíbulas

*b) Efectos a largo plazo de insecticidas sobre la supervivencia de los estadios inmaduros de desarrollo.* Como se muestra en la **Tabla 4.1**, el tratamiento de los huevos con acetamirpid al 50% de la MCRC (100 mg i.a/L), produjo una reducción

significativa de la supervivencia en el estadio L<sub>1</sub> con respecto al control, obteniendo solo un 10% de supervivencia. Por esta razón no fue posible continuar evaluando la toxicidad del acetamiprid en los siguientes estadios de desarrollo. Con respecto a los insecticidas IGRs (piriproxifen y teflubenzurón), a las dos concentraciones evaluadas, se puede observar que, si bien existe una reducción de la supervivencia, esas diferencias no resultan significativas en este estadio con respecto al control. En los tratamientos de cipermetrina a ambas concentraciones (25 y 12,5 mg i.a/L) no se evaluaron efectos a largo plazo en las larvas emergidas debido al número bajo de individuos sobrevivientes. Similarmente en el tratamiento de acetamiprid (200 mg i.a/L) no pudieron evaluarse debido a que se obtuvo un 100% de mortalidad de huevos.

En el estadio larval L<sub>2</sub> se observó una reducción significativa en la supervivencia para los tratamientos con piriproxifen (75 y 37,5 mg i.a/L), con valores de 55,4% y 60,2% respectivamente. Para teflubenzurón a ambas concentraciones (45 y 22,5 mg i.a./L) se obtuvieron valores de supervivencia similares al control.

En el resto de los estadios larvales L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, estado pupal y adulto (los emergidos respecto de las pupas formadas), no se observaron efectos significativos en la supervivencia para ninguno de estos IGRs con respecto al control.

Piriproxifen a ambas concentraciones evaluadas redujo significativamente el porcentaje de pupas formadas con respecto a huevos eclosionados obteniendo valores de 37,7% y 44,1% respectivamente, con respecto al control (76,1 %). Para el insecticida teflubenzurón a las dos concentraciones evaluadas los valores de porcentaje de pupas formadas sin bien observamos una reducción, estos no fueron estadísticamente significativos con respecto al tratamiento control (**Tabla 4.1**) De los adultos emergidos con respecto a huevos eclosionados solo piriproxifén (75 mg i.a./L) produjo una supervivencia menor. Los restantes tratamientos arrojaron valores similares al control.

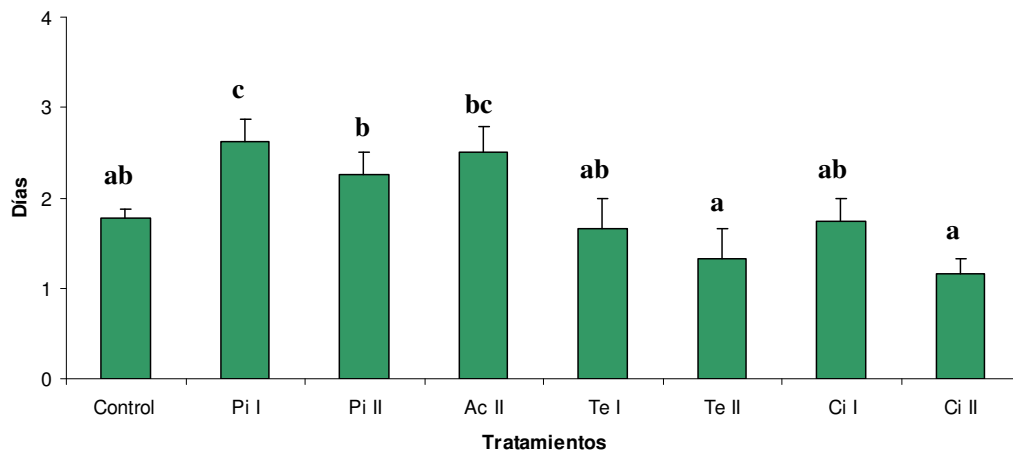
**Tabla 4.1.** Efectos secundarios de piriproxifen, teflubenzurón, cipermetrina y acetamiprid sobre la supervivencia de los estadios inmaduros y estado adulto a partir de huevos tratados de *E. connexa*. Los datos corresponden a valores medios ( $\pm$ Error Standard).

Tratamiento	Concentración (mg i.a./L)	Supervivencia por estadio (%)						Adultos emergidos (%)	
		L <sub>1</sub> <sup>(1)</sup>	L <sub>2</sub> <sup>(1)</sup>	L <sub>3</sub> <sup>(1)</sup>	L <sub>4</sub> <sup>(1)</sup>	Pupa		c <sup>(1)</sup>	d <sup>(2)</sup>
						a <sup>(1)</sup>	b <sup>(2)</sup>		
Control	0	90,8 (2,6) <b>a</b>	96,1 (1,6) <b>b</b>	94,8 (2,5) <b>a</b>	96,3 (2,4) <b>a</b>	94,7 (2,9) <b>a</b>	76,1 (4,8) <b>a</b>	89,9 (3,3) <b>a</b>	68,8 (5,2) <b>a</b>
Piriproxifen	75	71,7 (10,9) <b>a</b>	55,4 (8,9) <b>a</b>	100,0 (0,0) <b>a</b>	100 (0,0) <b>a</b>	89,9 (5,8) <b>a</b>	37,7 (7,0) <b>c</b>	96,4 (3,5) <b>a</b>	36,6 (7,4) <b>b</b>
	37,5	84,6 (5,1) <b>a</b>	60,2 (16,6) <b>a</b>	95,8 (2,5) <b>a</b>	96,4 (3,5) <b>a</b>	92,6 (4,4) <b>a</b>	44,1 (13,9) <b>bc</b>	100,0 (0,0) <b>a</b>	44,1 (13,9) <b>ab</b>
Teflubenzurón	45	77,5 (1,4) <b>a</b>	95,8 (4,1) <b>b</b>	100,0 (0,0) <b>a</b>	100,0 (0,0) <b>a</b>	100,0 (0,0) <b>a</b>	74,2 (2,2) <b>ab</b>	95,2 (4,7) <b>a</b>	70,9 (5,5) <b>a</b>
	22,5	83,2 (13,2) <b>a</b>	97,4 (2,5) <b>b</b>	94,4 (5,5) <b>a</b>	91,6 (8,3) <b>a</b>	85,5 (9,8) <b>a</b>	64,2 (20,6) <b>abc</b>	92,5 (7,4) <b>a</b>	59,5 (21,1) <b>ab</b>
Cipermetrina	25	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	12,5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Acetamiprid	200	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
$(\alpha=0,05)$	100	10,0 (8,6) <b>b</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		$p= < 0,0001$	$p= 0,005$	$p= 0,319$	$p= 0,670$	$p= 0,440$	$p= < 0,0001$	$p= 0,317$	$p= < 0,0001$
		F= 61,5	K= 14,7	K= 4,7	K= 2,3	K= 3,7	F= 54,9	K= 4,2	F= 42,3

**a)** Porcentaje de supervivencia pupal con respecto a L<sub>4</sub>. **b)** Porcentaje de pupación con respecto a huevos eclosionados. **c)** Porcentaje de adultos emergidos con respecto a pupas formadas. **d)** Porcentaje de adultos emergidos con respecto a huevos eclosionados.

<sup>(1)</sup> Kruskal–Wallis; <sup>(2)</sup> ANOVA

*c) Efectos de los insecticidas en el tiempo de desarrollo del estado de huevo. (Figura 4.4).* Los tratamientos con piriproxifen (75 y 37,5 mg i.a./L) y acetamiprid (100 mg i.a./L) produjeron un alargamiento de la duración promedio del estadio de huevo, comparados con el tratamiento control. En los tratamientos de teflubenzurón y cipermetrina a las MCRC (45 mg i.a./L y 25 mg i.a./L, respectivamente y al 50% de estas concentraciones para cada insecticida) la duración del período de huevos fue similar al control.



**Figura 4.4.** Efectos secundarios de piriproxifen, teflubenzurón, cipermetrina y acetamiprid sobre la duración del tiempo de desarrollo del estadio de huevo de *E. connexa*. Los datos corresponden a valores promedios  $\pm$  ES ( $p \leq 0,05$ ).

PI= 75 mg i.a. (piriproxifen)/L; PII= 37,5 mg i.a. (piriproxifen)/L; AI= 200 mg i.a. (acetamiprid)/L; AII= 100 mg i.a. (acetamiprid)/L; CiI=25 mg i.a. (cipermetrina)/L; CiII=12,5 mg i.a. (cipermetrina)/L

En la tabla 4.2 se muestran los valores de los efectos secundarios de los insecticidas evaluados sobre la duración del tiempo de desarrollo en los estados inmaduros. Como podemos observar sólo se pudieron evaluar los tratamientos con

piriproxifen y teflubenzuron a ambas concentraciones, ello debido a que con cipermetrina y acetamiprid no se obtuvo un número suficiente de individuos dada la elevada mortalidad en huevos y en el primer estadio larval, respectivamente.

El tiempo promedio de duración del estadio larval  $L_1$  se redujo significativamente en ambas concentraciones de teflubenzurón (45 y 22,5 mg i.a/L), si se lo compara con el control. Para los estadios larvales  $L_2$  y  $L_3$ , sólo se observó una reducción significativa con la MCRC (45 mg i.a/L) de teflubenzurón. Sin embargo, en lo que respecta al estadio  $L_4$ , esta misma concentración produjo una mayor duración del tiempo de desarrollo con respecto a la concentración de 22,5 mg i.a/L. Para el estadio de pupa este insecticida también acortó el tiempo de desarrollo. Estos efectos acumulados a lo largo de todos los estadios inmaduros, se manifiestan cuando evaluamos la duración promedio del tiempo de desarrollo total ( $L_1$ -Pupa), donde claramente se evidencia un acortamiento significativo de este parámetro con respecto al control. Ambas concentraciones de piriproxifen (75 y 37,5 mg i.a/L), produjeron un alargamiento del tiempo de desarrollo de los estadios  $L_3$  y pupa, lo que considerando el resto de los estadios inmaduros evidenciaron un alargamiento significativo del tiempo total de  $L_1$ -pupa con respecto al control (**Tabla 4.2**).

**d) Fecundidad y fertilidad:** En la **tabla 4.3**, se muestran los resultados obtenidos en la fecundidad y fertilidad acumuladas de las tres días consecutivos de ovoposición de hembras de *E. connexa*.

Ambas concentraciones de piriproxifén redujeron el número promedio de huevos puestos por hembra (fecundidad acumulada), siendo significativo para la concentración más alta (75 mg i.a./L). Este mismo insecticida provocó una disminución del 40% en el

número promedio de huevos eclosionados (fertilidad), pero la misma no resultó significativa con respecto al control (**Tabla 4.3**).

El insecticida teflubenzurón no produjo efectos en la fecundidad y fertilidad acumuladas en las hembras del depredador.

.

**Tabla 4.2** Efectos subletales de piriproxifén y teflubenzurón sobre la duración del tiempo de desarrollo de estadios inmaduros emergidos de huevos tratados de *E. connexa*. Los datos corresponden a valores medios ( $\pm$ Error Standard).

Tratamiento	Concentración (mg i.a./L)	Estadios Larvales de desarrollo				Estado Pupal	Periodo Intermuda
		L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>		
Control	0,0	2,0 (0,05) <b>b</b>	1,8 (0,03) <b>b</b>	1,8 (0,04) <b>b</b>	3,9 (0,06) <b>b</b>	3,4 (0,03) <b>b</b>	12,2 (0,20) <b>b</b>
Piriproxifén	75,0	2,1 (0,06) <b>b</b>	1,9 (0,05) <b>b</b>	2,5 (0,17) <b>c</b>	4,1 (0,14) <b>b</b>	3,8 (0,06) <b>c</b>	13,2 (0,63) <b>c</b>
	37,5	2,1 (0,07) <b>b</b>	1,9 (0,03) <b>b</b>	2,3 (0,10) <b>c</b>	3,9 (0,11) <b>b</b>	3,7(0,07) <b>c</b>	13,1 (0,50) <b>c</b>
Teflubenzurón	45,0	1,6 (0,07) <b>a</b>	1,5 (0,07) <b>a</b>	1,5 (0,07) <b>a</b>	4,3 (0,11) <b>a</b>	2,9 (0,05) <b>a</b>	11,9 (0,10) <b>a</b>
	22,5	1,5 (0,09) <b>a</b>	2 (0,11) <b>b</b>	1,8 (0,12) <b>ab</b>	3,7 (0,12) <b>c</b>	3,1 (0,12) <b>a</b>	11,0 (0,38) <b>a</b>
$\alpha= 0,05$		$p= <0,0001$	$p= <0,0001$	$p= <0,0001$	$p= <0,0001$	$p= <0,0001$	$p= <0,0001$
		K= 31,8	K= 24,5	K= 48,3	K= 29,6	K= 22,9	K= 43,4

**Tabla 4.3** Efectos secundarios de piriproxifén y teflubenzurón sobre la fecundidad y fertilidad acumuladas de las hembras de *E. connexa*. Los datos corresponden a valores medios ( $\pm$ Error estándar).

Tratamiento	Concentración (mg i.a./L)	<sup>(1)</sup> Huevos puestos	<sup>(2)</sup> Huevos eclosionados	<sup>(3)</sup> Eclosión (%)
Control	0,0	98,6 (8,1) <b>a</b>	70,6 (7,4) <b>ab</b>	70,6 (3,5) <b>a</b>
Piriproxifén	75,0	54,1 (13,7) <b>b</b>	42,3 (12,5) <b>b</b>	73,9 (11,4) <b>a</b>
	37,5	86,7 (10,2) <b>ab</b>	60,4 (7,1) <b>b</b>	70,4 (4,0) <b>a</b>
Teflubenzurón	45,0	102,0 (12,3) <b>a</b>	71,8 (12,0) <b>ab</b>	69,9 (5,2) <b>a</b>
	22,5	113,5 (16,5) <b>a</b>	97,3 (16,9) <b>a</b>	84,7 (4,9) <b>a</b>
$\alpha= 0,05$		$p= <0,0001$	$p= <0,0001$	$p= <0,0001$
		F= 67,7	F= 44,2	F= 171,9

<sup>(1)</sup> Media acumulada de tres días consecutivos de oviposición (fecundidad acumulada)

<sup>(2)</sup> Número promedio de huevos eclosionados (fertilidad acumulada)

<sup>(3)</sup> Media de la eclosión obtenida de las primeras tres oviposiciones



### 4.3 Discusión

El estudio de los efectos de los plaguicidas sobre organismos no blanco y benéficos ocupa a un importante grupo de investigadores desde hace décadas (Hassan, et al. 1985). Desde hace varios años algunos investigadores del país han orientado sus estudios a la evaluación del efecto adverso de los plaguicidas sobre artópodos benéficos (Schneider et al., 2004, 2008, 2009; Rimoldi et al., 2008; Fogel et al., 2009; Benamú et al., 2010). La evaluación de la selectividad de los insecticidas y sus efectos sobre los enemigos naturales, depende entre otros factores además del tipo de sustancia química utilizada, la concentración de la misma, la vía de exposición y la etapa de desarrollo de los organismos estudiados. Los estados protegidos de los insectos (ej. huevo), poseen una barrera que dificulta o impide el ingreso de los plaguicidas hasta el sitio específico de acción del plaguicida. El corion del huevo por ejemplo, es una membrana compuesta por proteínas esclerosadas que proporcionan resistencia mecánica e impermeabilidad para el embrión (Nation, 2008).

Los resultados de los bioensayos en huevos de *E. connexa* demuestran que tanto acetamiprid (neonicotinoide) como cipermetrina (piretroide) afectan la supervivencia del embrión. El acetamiprid a una concentración de 200 mg i.a /L (MCRC), mostró mayor efecto ovicida, en comparación con acetamiprid (100 mg i.a./L) y cipermetrina (25 mg i.a./L). Con la dilución del 50 % MCRC de acetamiprid (100 mg i.a /L) se obtuvo 50% de embriones, aunque con alta mortalidad en el estadio L<sub>1</sub>. Youn et al. (2003), obtuvieron resultados similares al exponer huevos de *Harmonia axyridis* Pallas (Coléoptera: Coccinellidae) por inmersión a imidacloprid y acetamiprid. Ambos neonicotinoides tuvieron un marcado efecto ovicida para esta especie de coccinélido. Rill et al. (2008), expusieron huevos del parasitoide *Aphytis melinus* De Bach

(Hymenoptera: Aphelinidae), a acetamiprid, sin emergencia de larvas luego de 48 h de la exposición. Así mismo, Kim et al. (2006) pulverizaron huevos del depredador *Deraeocoris brevis* Uhler (Hemiptera: Miridae) con acetamiprid, y si bien en este caso el tratamiento no afectó la eclosión de los huevos, tuvo un efecto residual sobre la supervivencia de las ninfas. Estos autores realizaron ensayos de exposición combinada (residual y oral) con este mismo insecticida, obteniendo una elevada mortalidad de estadios inmaduros (en este caso ninfas). Imidacloprid también indujo una alta mortalidad ninfas de cuarto estadio del predador *Picromerus bidens* L. (Heteroptera: pentatomidae), en ensayos por contacto con residuos del insecticida (Mahdian et al., 2007).

Tal como se mencionara más arriba, la cipermetrina afectó la eclosión de huevos de *E. connexa*. Las dos concentraciones ensayadas (25 y 12,5 mg i.a/L), provocaron altos porcentajes de mortalidad embrionaria (bajos porcentajes de eclosión, 26 y 37 % respectivamente), y las larvas que emergieron murieron a las 48 h de la eclosión. En ensayos de toxicidad aguda con fenvalerato sobre huevos de este mismo predador, el piretroide produjo un 40% de mortalidad (Lorca González, 2005). Por otra parte, los piretroides bifentrina y  $\lambda$ -cialotrina tuvieron efecto ovicida en ensayos con el predador *H. axyridis* (Galvan et al., 2005). Rimoldi et al. (2008), expusieron huevos de *Chrysoperla externa* Hagen (Neuroptera: Chrisopidae) a la misma concentración de cipermertrina evaluada en estos ensayos, si bien este insecticida no produjo efecto ovicida en esta especie, causó la mortalidad del 100% de las larvas emergidas 48 h después de la eclosión. De los resultados de los bioensayos realizados por Giolo et al. (2009) se desprende que la deltametrina no afecta de manera visible la supervivencia embrionaria en huevos de *C. carnea*. Sin embargo este mismo piretroide redujo en un

34% la emergencia adulta de huevos parasitados con *Trissolcus grandis* Thompson (Hymenoptera: Scelionidae) (Saber et al., 2005).

Los insecticidas reguladores de crecimiento (IGRs), actúan alterando los procesos de desarrollo de los insectos, ya sea como inhibidores de la síntesis de quitina (teflubenzurón), o bien como análogos de la hormona de juvenil (piriproxifén). Estos insecticidas en muchas situaciones además de inducir efectos letales, producen efectos subletales a nivel fisiológico y de comportamiento, los que resultan ser significativos en los enemigos naturales, alterando parámetros biológicos relacionados con el desempeño como controladores biológicos (Darvas y Polgar, 1998).

Los resultados obtenidos con, piriproxifén y teflubenzurón muestran que estos productos no afectaron la supervivencia embrionaria en ensayos con *E connexa*, en comparación con el control. En cuanto a los efectos a largo plazo en las larvas emergidas, sólo en el estadio larval L<sub>2</sub> ambas concentraciones de piriproxifén ocasionaron una reducción de la supervivencia. En el resto de los estadios larvales y en la pupa no se observó reducción en la supervivencia. La emergencia de los adultos se vio afectada a la MCRC de piriproxifén (45 mg i.a/L). La información bibliográfica precedente sobre los efectos de piriproxifén son variables para las diferentes especies de insectos benéficos como también para los estados de desarrollo evaluados.

Chen and Liu (2002) observaron una mortalidad significativa en huevos de *Chysoperla rufilabris* Burmeister (Neruroptera: Chrysopidae) a tres concentraciones de piriproxifén (10; 50 y 100 mg i.a/L). Estos autores también observaron una reducción de la formación de pupas como también en la emergencia de adultos para este predador. Rill et al. (2008), expusieron huevos, larvas y pupas del parasitoide *A. melinus* a piriproxifén, y no observaron efectos significativos sobre la supervivencia en los estados de desarrollo evaluados. Aplicaciones tópicas con piriproxifén a diferentes

concentraciones (75; 10 y 1 mg i.a/L) sobre el tercer estadio larval del parasitote *Hyposoter didymator* Thunberg (Himenoptera: Icheumonidae), redujeron significativamente la supervivencia en larvas, pupas y además afectaron la emergencia de adultos, en la tres concentraciones evaluadas (Schneider et al., 2004).

En cuanto al tiempo de desarrollo de los diferentes estados de *E. connexa*, en el presente estudio se observó un alargamiento del período de desarrollo embrionario con piriproxifén y acetamiprid. También se observaron diferencias en el tiempo de desarrollo en los estadios larvales y en el estado pupal y en la duración total del periodo intermuda comprendido desde L<sub>1</sub>-pupa tanto con piriproxifén como con teflubenzurón. Chen y Liu (2002), luego de tratar huevos de *C. rufilabris* con piriproxifén, observaron un incremento en el tiempo de desarrollo embrionario, así como la de los estadios larvales, pupa y la duración total del periodo intermuda huevo-pupa con respecto el control. En otro estudio estos mismos autores, expusieron huevos de este depredador a fenoxicarb (otro análogo de la hormona juvenil), obteniendo un 60% de eclosión, así como el alargamiento del tiempo de desarrollo embrionario, del estadio larval L<sub>3</sub>, del estadio pupal y del tiempo total de desarrollo desde el huevo al adulto (Liu y Chen, 2001). Sin embargo, Mestdagh et al. (1996) las ninfas de quinto estadio de *Podisus maculiventris* Say (Heteroptera: Pentatomide) expuestas a residuos de piriproxifén exhibieron una reducción de la duración de este estadio ninfal.

Como se mencionara más arriba, ninguna de las dos concentraciones de teflubenzurón evaluadas afectaron la tasa de eclosión de huevos de *E. connexa*. La ausencia de efecto ovicida de buprofezin, otro inhibidor de la síntesis de la quitina, fue registrada también para las especies de depredadores tales como *Stethorus punctum picipes* Casey (Coleoptera: Coccinellidae) *Geocoris* ssp. (Hemiptera: Geocoridae (James, 2004). Bueno y Freitas (2004), tampoco observaron efectos ovicidas al exponer

huevos de *C. externa* a lufenuron, otro inhibidor de la síntesis de quitina. Similares resultados fueron obtenidos por Culter et al. (2006) al exponer los huevos del depredador *P. maculiventris* a dos concentraciones de otro insecticida de este grupo, novalurón (71 y 250 mg/L).

Las concentraciones de teflubenzurón utilizadas en los bioensayos afectaron la duración del tiempo de desarrollo sobre los estadios inmaduros de *E. connexa*, provocando una reducción del tiempo total de desarrollo intermuda larval L<sub>1</sub>-pupa. Sin embargo en otras especies teflubenzuron prolongó el tiempo de desarrollo desde el estadio de pre-pupa hasta el estado adulto, como se observó con el parasitoide *Trichogramma pretiosum* Rey (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Cónsoli et al., 1998). Un efecto similar se observó en estadios larvales del depredador *P. maculiventris* expuestos a este insecticida, donde se observó un alargamiento del tiempo de desarrollo (Mohaghegh et al., 2000)

La reducción de la fecundidad y fertilidad, como así también efectos indirectos de los insecticidas en el comportamiento de oviposición sobre los insectos benéficos, pueden impactar negativamente en la regulación de las poblaciones de plagas (Desneux et al., 2007). Por otro lado, esta reducción juega un papel importante sobre parámetros demográficos de la población, como la tasa intrínseca de crecimiento poblacional ( $r$ ) y la tasa reproductiva neta ( $R_0$ ). Nuestros resultados para estas variables a través de la exposición de huevos a los insecticidas, redujeron significativamente la fecundidad en el caso del piriproxifen. Este, además de actuar a nivel de los estados inmaduros, también actúa como un efectivo supresor de la embriogénesis en la etapa adulta (Ishaaya et al., 1995). Similares resultados se obtuvieron a través de tratamiento tópico de adultos de *C. carnea* (Medina et al., 2003). Así mismo, Grafton-Cardwell y Gu (2003) observaron una reducción significativa de la fertilidad del depredador *Rodolia cardinalis* (Mulsant)

(Coleoptera: Coccinellidae), con buprofezin y piriproxifen. En otro estudio, buprofezin redujo la tasa de parasitismo de *Leptomastix dactylopii* Howard (Himenoptera: Encyrtidae) (Cloyd and Dickinson, 2006).

De los resultados de los ensayos se desprende que el acetamiprid fue el insecticida más tóxico para el estadio de huevo de *E. connexa*, ocasionando un 100 % de mortalidad embrionaria a la mayor concentración ensayada y que correspondió a la máxima recomendada para su uso a campo (MCRC). Incluso a concentraciones más bajas (100 mg i.a/L) que la MCRC se observó efecto insecticida a largo plazo en las larvas que lograron eclosionar, inhibiendo la supervivencia de las mismas drásticamente. Cipermetrina también provocó un importante efecto ovicida en ambas concentraciones, con baja supervivencia.

Los efectos subletales de los insecticidas neurotóxicos sobre los procesos de desarrollo y reproductivos han sido reportados desde hace varias décadas (Haynes, 1988), lo cual se explica teniendo en cuenta el papel de las neurohormonas en el sistema nervioso central (SCN), las cuales regulan mediante procesos enzimáticos las hormonas del crecimiento y desarrollo de los insectos

Por otro lado, considerando los resultados obtenidos podríamos afirmar que los insecticidas aquí evaluados sobre este depredador atravesarían el corion del huevo, fenómeno que también se manifiesta con los IRGs. Si bien el teflubenzurón y el piriproxifén no tuvieron efecto ovicida, estos provocaron efectos subletales, reduciendo la emergencia adulta y registrando efectos también en el tiempo de desarrollo, de modo que interfieren con determinados procesos fisiológicos relacionados con la metamorfosis, dado el papel relevante que tienen tanto la síntesis de quitina como la hormona juvenil en la metamorfosis durante los estadios inmaduros; además, en el caso particular de piriproxifen (mimético de la hormona juvenil) disminuyó la fecundidad en

las hembras adultas, lo cual es esperable considerando que la hormonas de desarrollo (ecdisona y juvenil) intervienen en los procesos de vitelogenesis, ovogénesis, espermatogénesis, entre otras (Nation, 2008).

Comparando la selectividad de los insecticidas evaluados sobre el estadio de huevo para *E. connexa* es posible concluir que teflubenzuron y piriproxifen fueron los más selectivos para este estado de desarrollo, seguido por cipermetrina y finalmente por acetamiprid.

## **CAPITULO 5**

**Evaluación de efectos toxicológicos de  
piriproxifen, teflubenzurón, acetamiprid  
y cipermetrina sobre estadios larvales de  
*Eriopsis connexa***



## 5.1 Introducción

El crecimiento y desarrollo de los insectos se produce a través del proceso de la metamorfosis, por medio del cual los estados inmaduros (larvas y pupas) pasan por sucesivos procesos de muda hasta llegar a la etapa adulta. Este crecimiento se encuentra regulado por el sistema hormonal donde tanto la hormona juvenil (HJ) como la ecdisona (hormona de la muda) juegan un papel primordial en la metamorfosis de los insectos, conociéndose a ambas como las hormonas del crecimiento y desarrollo. Además en la etapa adulta estas dos hormonas están también involucradas en los procesos reproductivos (regulando la maduración reproductiva) (Nation, 2008). Durante las etapas larvales la epidermis se separa de la vieja cutícula, y las células se van reorganizando y sintetizando proteínas para la secreción de la nueva cutícula (Dhadialla et al., 1998).

Cuando los insectos son expuestos a los insecticidas, una de las vías de ingreso de los compuestos es a través de la cutícula. Esta exposición puede provocar efectos a corto plazo, que son letales y se expresan en la mortalidad. Por otro lado los insecticidas también pueden provocar efectos a largo plazo o subletales. Estos efectos en el desarrollo de las larvas pueden inducir perturbaciones sobre los tejidos nerviosos por sustancias neurotóxicas, dado la importancia del sistema colinérgico en el desarrollo de los insectos. Por otra parte cualquier interferencia en la homeostasis de las hormonas implicadas en el desarrollo y crecimiento como pueden ser aquellos insecticidas análogos de las hormonas de la muda (ecdisona) y juvenil se traduce en una interrupción anormal del desarrollo de los insectos. Del mismo modo, cualquier interferencia en los distintos pasos que implican la participación de las hormonas como ser en la síntesis y/o reabsorción de la cutícula sería perjudicial para la supervivencia de la etapa de desarrollo. A su vez estos efectos se pueden trasladar también, una vez que los organismos han completado el ciclo de vida,

llegando a la etapa adulta, y provocar alteraciones de la capacidad reproductiva del organismo, ya sea en variaciones en la proporción sexual de los mismos como también en la reducción de la fecundidad y fertilidad de las hembras con un fuerte impacto en el crecimiento poblacional (Dhadialla et al., 1998; Desneux et al., 2007).

A la hora de evaluar la selectividad de un insecticida sobre un enemigo natural asociado a especies fitógafas, resulta relevante estudiar la toxicidad de estos compuestos sobre organismos que sobresalen como agentes potenciales de control biológico de plagas, y son responsables en parte de mantener bajo control especies plagas de interés económico. *E. connexa* sobresale en la Región Neotropical como depredador generalista y agente potencial de control biológico de plagas (Almeida-Sarmiento et al., 2007), por lo que resulta relevante estudiar la selectividad de insecticidas sobre los estadios larvales y adulto, ya que ambos estados del depredador son importantes reguladores poblacionales de insectos plaga. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el objetivo en este capítulo de la tesis fue evaluar mediante ensayos de toxicidad tópica en laboratorio los posibles efectos de piriproxifén, teflubenzurón, cipermetrina y acetamiprid sobre los estadios larvales L<sub>2</sub> y L<sub>4</sub> del depredador.

### **5.1.1. Evaluación de las máximas concentraciones recomendadas para aplicación en campo (MCRC) de piriproxifén, teflubenzurón, acetamiprid y cipermetrina sobre el segundo estadio larval de *E. connexa***

#### **Bioensayos**

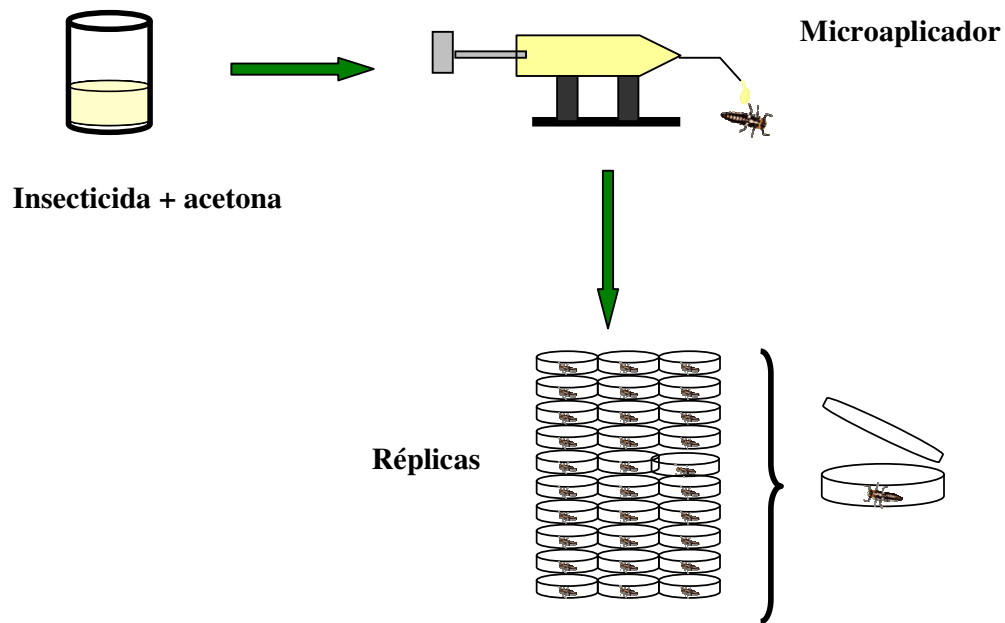
Para llevar a cabo los experimentos se utilizaron larvas de segundo estadio de  $\leq 24$  horas de edad. Las mismas correspondían a una misma cohorte y se obtuvieron de la cría de laboratorio. Una vez que las larvas emergieron, se colocaron individualmente en placas de Petri a fin de evitar canibalismo. Se les suministró *R. padi* como alimento *ad libitum* y dieta artificial como complemento alimenticio (Martos y Neimeyer, 1990).

Periódicamente fueron revisadas y el alimento fue renovado cada dos días. Las larvas fueron utilizadas para los bioensayos después de la muda al segundo estadio.

Se evaluaron las MCRC de Epingle<sup>®</sup> (10% p/v piriproxifen, 75 mg i.a/L, Summit-Agro S.A), Nomolt<sup>®</sup> (15 % p/v teflubenzurón, 45 mg i.a/L, BASF S.A.), Mospilan<sup>®</sup> (20% p/p acetamiprid, 200 mg i.a/L, Summit-Agro S.A) y Glextrin25<sup>®</sup> (25 % p/v cipermetrina, 25 mg i.a/L, Gleba S.A.). Las soluciones de insecticidas se prepararon utilizando acetona (para análisis A.C.S.) como solvente (Busvine, 1971), para el control se utilizó acetona. La solución de acetamiprid se preparó conteniendo 80% (v/v) de acetona y 20% (v/v) de agua destilada (Youn et al., 2003). La exposición de los organismos a los insecticidas se llevó a cabo por tópico, utilizando microaplicador manual Burkard (**Figura 5.1**). Se aplicaron 0,5µL de solución insecticida sobre los primeros segmentos torácicos de cada larva. Para cada uno de los tratamientos se utilizaron tres réplicas de diez individuos cada una. Se evaluó la supervivencia y la duración del tiempo de desarrollo en cada uno de los estadios y estados de desarrollo hasta que los organismos completaron el ciclo de desarrollo preimaginal, en intervalos de 24 h.

*Análisis estadístico:* Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza (ANOVA), se corroboraron las premisas del ANOVA mediante pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk, Anderson-Darling y Jaques-Vera) y la homocedasticidad de las varianzas (Barlett y Levene). Si algunas de las premisas no fue cumplida se realizaron transformaciones, logarítmica  $y = \log(x+1)$  y angular  $p' = \arcseno\sqrt{p}$ , para los datos expresados en porcentajes o proporciones. Para el análisis, a los datos sometidos a ANOVA se les aplicó la separación de medias mediante el test LSD para conocer diferencias entre todos los tratamientos. Para evaluar diferencias con el control se utilizó el test de Dunnet. En aquellos datos donde no se cumplieron los supuestos de

ANOVA, se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, realizándose la prueba bilateral de Dunn para comparaciones múltiples. Se utilizó el programa XLStat (Addinsoft XLstat para Excel, 2009). Esta metodología de análisis de datos se utilizó en todas las secciones del presente capítulo.



**Figura 5.1** Esquema de la metodología empleada en la aplicación tópica de los insecticidas sobre estadios larvales de *E. connexa*

## Resultados

**Mortalidad:** La **tabla 5.1** muestra los resultados de porcentajes de supervivencia discriminados por estadios y estados de desarrollo y la supervivencia total (acumulada durante todo el tiempo preimaginal), obtenidos del ensayo tópico sobre el segundo estadio larval de *E. connexa*.

De manera general podemos decir que la supervivencia de L<sub>2</sub>, se vió afectada por todos los insecticidas evaluados, siendo significativa esta reducción para acetamiprid, cipermetrina y teflubenzurón. El tratamiento con acetamiprid produjo un 100% de mortalidad a las 24 h postratamiento. La cipermetrina y el teflubenzurón también afectaron significativamente la supervivencia del estadio larval L<sub>2</sub>, en un 63,3% y 83% (promedios) respectivamente con respecto al control (100%). Se observó una reducción de la supervivencia durante el tercer estadio larval solamente en el tratamiento con teflubenzurón. En L<sub>4</sub>, pupas y adultos no se observaron variaciones en la supervivencia en ninguno de los tratamientos. Al evaluar la supervivencia acumulada considerando el periodo intermuda (L<sub>2</sub>-pupa) se observa que se produjo una reducción significativa del parámetro en los cuatro tratamientos con insecticidas, esto debido a la sumatoria de las reducciones parciales en cada uno de los estadios del predador.

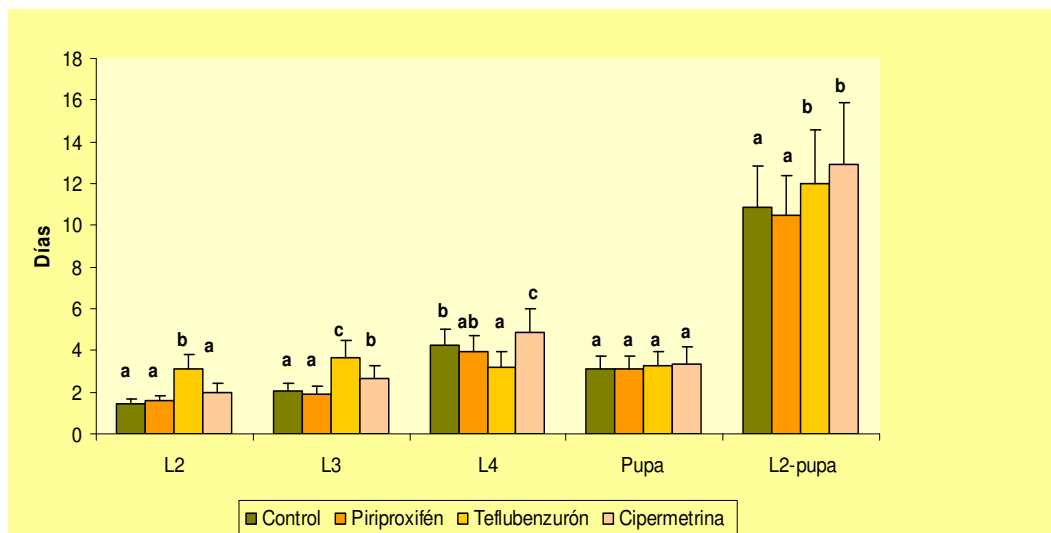
*Efectos sobre el tiempo de desarrollo.* Los resultados del tiempo promedio de duración de cada uno de los estadios inmaduros y el tiempo promedio de desarrollo total (L<sub>2</sub>- pupa), de *E. connexa* a partir de ensayo tópico sobre el estadio larval L<sub>2</sub>, se muestran en la **figura 5.1**. El insecticida teflubenzurón prolongó el tiempo de desarrollo de los estadios larvales L<sub>2</sub> y L<sub>3</sub>, pero no el del estadio larval L<sub>4</sub>, donde observamos que la duración de este estadio fue menor que el control incluso menor que para el resto de los insecticidas. Por otra parte, se observa un “alargamiento” en el tiempo de desarrollo intermuda (desde larva L<sub>2</sub>-pupa), con un valor promedio de 12 días con respecto al control (11 d) y a los tratados con el insecticida piriproxifén (10 d). La exposición a cipermetrina también prolongó el tiempo de desarrollo preimaginal, lo cual se evidenció significativamente en los estadios larvales L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub>, que sumados al resto de los estadios larvales y el estado pupal, provocaron un alargamiento significativo en tiempo de desarrollo desde larva L<sub>2</sub>-pupa, con una duración promedio de 13 días.

**Tabla 5.1** Toxicidad de piriproxifén, teflubenzurón, cipermetrina y acetamiprid sobre la supervivencia de los estados inmaduros y adulto. Los resultados corresponden al ensayo tópico sobre el segundo estadio larval de *E. connexa*. Los datos corresponden a valores medios ( $\pm$ Error estándar).

Tratamiento	Concentración (mg i.a./L)	Supervivencia por estado de desarrollo (%)					
		Estadios Larvales			<sup>(2)</sup> Pupa	Adultos emergidos	<sup>(1)</sup> Intermuda L <sub>2</sub> - Pupa
		<sup>(1)</sup> L <sub>2</sub>	<sup>(2)</sup> L <sub>3</sub>	<sup>(2)</sup> L <sub>4</sub>			
Control	0	100,0 (0,0) <b>a</b>	100,0 (0,0) <b>b</b>	100,0 (0,0) <b>a</b>	100,0 (0,0) <b>a</b>	100,0 (0,0)	100,0 (0,0) <b>a</b>
Piriproxifén	75	90,9 (5,2) <b>ab</b>	97,2 (2,7) <b>b</b>	100,0 (0,0) <b>a</b>	19,6 (3,0) <b>a</b>	100,0 (0,0)	85,3 (2,8) <b>b</b>
Teflubenzurón	45	83,3 (8,8) <b>bc</b>	71,8 (7,7) <b>a</b>	94,4 (5,5) <b>a</b>	88,3 (7,2) <b>a</b>	100,0 (0,0)	51,6 (13,0) <b>c</b>
Cipermetrina	25	63,3 (6,6) <b>c</b>	100,0 (0,0) <b>b</b>	100,0 (0,0) <b>a</b>	100,0 (0,0) <b>a</b>	100,0 (0,0)	63,3 (6,6) <b>c</b>
Acetamiprid	200	0,0 (0,0) <b>d</b>	-----	-----	-----	-----	0,0 (0,0) <b>d</b>
$(\alpha=0,05)$		$p= < 0,0001$	$p= 0,025$	$p= 0,392$	$p= 0,172$		$p= < 0,0001$
		F= 56,6	K= 9,31	K= 3,00	K= 4,99		F= 108,0

<sup>(1)</sup> ANOVA; <sup>(2)</sup> Kruskal–Wallis

Para el tratamiento con piriproxifén no se observaron diferencias significativas en los tiempos promedios parciales de desarrollo de cada estadio, y para el periodo intermuda (.L<sub>2</sub>-pupa). El tiempo de desarrollo pupal fue similar para los tres insecticidas ensayados, como para el control.



**Figura 5.1.** Efectos de los insecticidas piriproxifén, teflubenzurón y cipermetrina sobre la duración de los estadios inmaduros (L<sub>2</sub>- L<sub>3</sub>- L<sub>4</sub>- pupa). Ensayo de exposición tópico sobre estadio larval L<sub>2</sub> de *E. connexa*. Los datos corresponden a valores promedios (Error estándar).

### 5.1.2. Evaluación de concentraciones inferiores a la MCRC de acetamiprid sobre el segundo estadio larval de *E. connexa*.

En base a los resultados obtenidos a partir del ensayo tópico sobre el estadio larval L<sub>2</sub> con el insecticida acetamiprid, el cual produjo un 100% de mortalidad cuando fue aplicado a la MCRC (200 mg i.a./L), se evaluaron posteriormente los posibles efectos de concentraciones menores de este insecticida.

La metodología de exposición al tóxico fue la misma descrita en el presente capítulo (sección 5.1.1.). Las concentraciones de exposición fueron 100, 50, 20, 10, 5, y

1 mg. i.a. (acetamiprid)/L, correspondiendo al 50, 25, 10, 5, 2.5, y 0,5% de la MCRC de este insecticida, respectivamente. Para cada una de las concentraciones se utilizaron 3 réplicas con 10 larvas cada una.

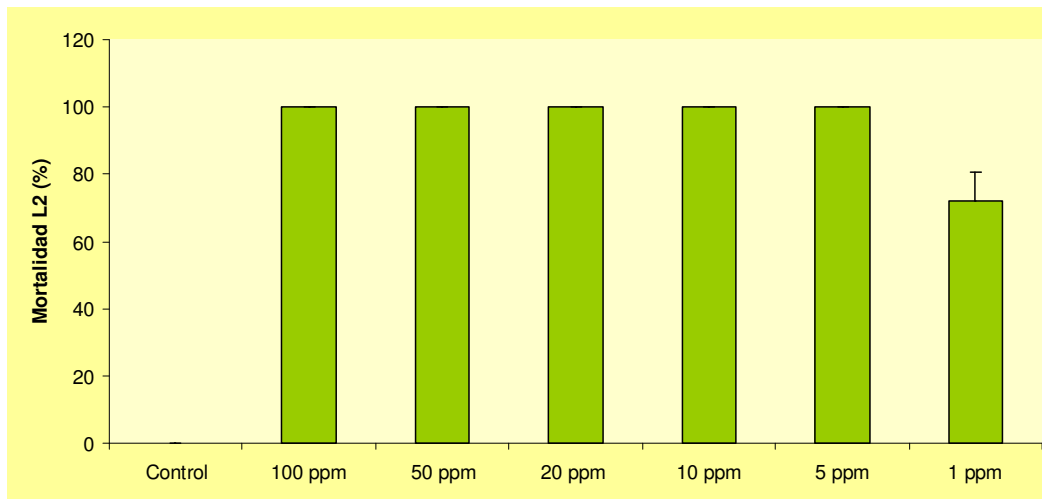
En estos experimentos se evaluó la mortalidad en cada estadio de desarrollo larval y para el estado pupal; y para aquellos individuos que llegaron a completar el ciclo de vida, se evaluó la duración del período intermuda ( $L_2$ -pupa), la fecundidad y la fertilidad de las hembras adultas.

Para el análisis estadístico de los datos se siguió el procedimiento descrito en la sección 5.5.1 del presente capítulo.

### **Resultados**

Como se puede observar en la **figura 5.2**, las concentraciones inferiores a la MCRC (200 mg i.a/L) del insecticida neonicotinoide acetamiprid, 100, 50, 20, 10 y 5 mg i.a/L, provocaron una mortalidad larvaria del 100% de los organismos expuestos ( $L_2$ ) y esto se evidenció a las 24 hs de exposición tópica. La concentración de 1 mg i.a/L, causó un 72 % de mortalidad larval. Debido a que no se obtuvieron organismos vivos, aún a la concentración más baja ensayada ( 1 mg i.a/L), el número de individuos sobrevivientes fue muy bajo (%), no se pudieron evaluar efectos subletales en el tiempo de desarrollo preimaginal y en la fecundidad y fertilidad de las hembras.





**Figura 5.2** Porcentaje de mortalidad de concentraciones subletales del insecticida neonicotinoide acetamiprid (100, 50, 20, 10, 5 y 1 mg i.a/L), sobre el estadio larval L<sub>2</sub> de *E. connexa*. Los datos corresponden a valores promedios (Error estándar)

### 5.1.3 Evaluación de las máximas concentraciones recomendadas para el campo (MCRC) de prirproxifen, teflubenzurón, acetamiprid y cipermetrina sobre el cuarto estadio larval de *E. connexa*

#### *Bioensayos*

Para el estudio de toxicidad tóxica de insecticidas se utilizaron larvas de cuarto estadio de  $\leq 24$ h de edad, las mismas se obtuvieron de la cría masiva en laboratorio a partir de una generación de huevos pertenecientes a la misma cohorte. Una vez que las larvas emergieron, se colocaron individualmente en placas de Petri y se les suministró pulgón de la avena *ad libitum* como presa y como complemento nutricional dieta artificial a base de hígado vacuno (Martos y Neimeyer, 1990). Las placas de Petri se revisaron periódicamente renovándose el alimento cada dos días hasta que las larvas mudaron al cuarto estadio larval (L<sub>4</sub>), objeto de estudio en este bioensayo.

Las soluciones de insecticidas fueron aplicadas por tópico mediante un microaplicador manual Burkard<sup>®</sup> sobre los primeros segmentos torácicos de las larvas, topicando 1 $\mu$ L de solución de insecticida (**Figura 5.1**). Para la preparación de las

soluciones de insecticidas se utilizó acetona (para análisis A.C.S.) como solvente (Busvine, 1971), para el control se utilizó acetona. La solución de acetamiprid se preparó en medio conteniendo 80% (v/v) de acetona y 20% (v/v) de agua destilada (Youn et al., 2003).

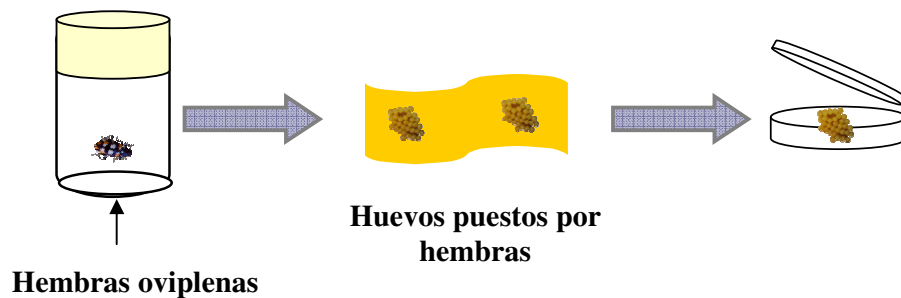
Se evaluaron las MCRC de Epingle<sup>®</sup> (10% p/v piriproxifen, 75 mg i.a/L, Summit-Agro S.A), Nomolt<sup>®</sup> (15 % p/v teflubenzurón, 45 mg i.a/L, BASF S.A.), Mospilan<sup>®</sup> (20% p/p acetamiprid, 200 mg i.a/L, Summit-Agro S.A) y Glextrin25<sup>®</sup> (25 % p/v cipermetrina, 25 mg i.a/L Gleba S.A.). Para cada uno de los tratamientos se emplearon 3 réplicas de 10 larvas cada una.

Cada 24 h y hasta que los organismos completaron el ciclo de vida preimaginal, se evaluó la supervivencia y tiempo de desarrollo en cada uno de los estadios inmaduros y la duración del tiempo intermuda entre el estadio larval L<sub>4</sub> y el estado de, pupa y del periodo intermuda (L<sub>4</sub>-pupa).

**Fecundidad y Fertilidad:** En los tratamientos en los cuales los organismos sobrevivientes completaron su ciclo de desarrollo se evaluó la fecundidad y fertilidad de las hembras, analizando la oviposición durante cinco días consecutivos posteriores a la individualización de las hembras oviplenas. Para esto, una vez que los individuos llegaron a adultos se colocaron juntos por tratamiento en recipientes plásticos (“ponederos”) y se les suministró como alimento el pulgón de la avena (*R. padi*) *ad libitum* para favorecer el desarrollo ovárico de las hembras (imprescindible para la separación de sexos). Luego de cinco días se revisaron los adultos y se separaron diez hembras oviplenas como mínimo por tratamiento. Cada hembra fue individualizada y colocada en vasos de plástico de 7 cm de alto x 5 cm de diámetro, forrados interiormente con papel madera como sustrato de oviposición (**Figura 5.3**), cubiertos la

parte superior con “voile” para permitir la circulación de aire y evitar escape de los individuos. Durante los primeros cinco días se revisaron los recipientes para observar la presencia de huevos, que fueron separados y colocados en placas de Petri. Diariamente para cada hembra y en cada oviposición se registró la fecundidad (número de huevos puestos) y la fertilidad (número de larvas emergidas). Durante el periodo de evaluación las hembras fueron alimentadas con pulgón de la avena *ad libitum* y como suplemento nutricional se les suministró dieta artificial a base de hígado vacuno (Martos y Neimeyer, 1990) y pasas de uva, a fin de evitar la reabsorción de huevos por parte de las mismas.

Para el análisis estadístico de los datos se siguió el procedimiento descrito en la sección 5.5.1 del presente capítulo.



**Figura 5.3.** Esquematización de la metodología de evaluación de la fecundidad y la fertilidad.

## Resultados

**Mortalidad:** Los resultados de las observaciones de supervivencia de los estados inmaduros de *E. connexa* a partir del ensayo de toxicidad tóxica sobre el cuarto estadio larval se presentan en la **Tabla 5.2**

El compuesto mimético de la hormona juvenil piriproxifén no afectó la supervivencia del estadio larval L<sub>4</sub>, como tampoco las pupas y los adultos, obteniendo valores similares al control (100%). El inhibidor de la quitina teflubenzurón, si bien causó una reducción en la supervivencia del estadio de exposición L<sub>4</sub>, esta no fue significativa, obteniendo un valor de 74,7%. La supervivencia durante el estado pupal y la emergencia adulta no se vieron afectadas por este insecticida. El piretroide cipermetrina afectó significativamente la supervivencia ocasionando una reducción del 75%, debido al número tan bajo de individuos sobrevivientes no fue posible evaluar los restantes estadios como tampoco los efectos subletales del tratamiento. Finalmente el neonicotinoide acetamiprid, causó un 100% de mortalidad sobre todos los individuos expuestos (L<sub>4</sub>) luego de 24 horas de exposición.

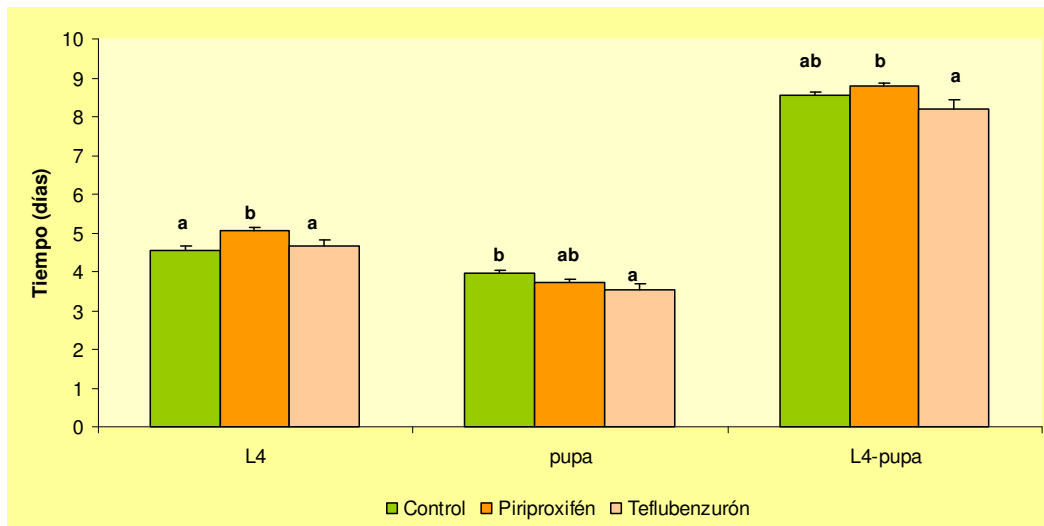
Tratamiento	Concentración (mg i.a/L)	% supervivencia			Emergencia adulta
		L <sub>4</sub>	Pupa	L <sub>4</sub> -Adulto	
Control	0	100,0 (0,0) <b>b</b>	100,0 (0,0) <b>a</b>	100,0 (0,0) <b>b</b>	100,0 (0,0)
Piriproxifén	75	100,0 (0,0) <b>b</b>	100,0 (0,0) <b>a</b>	100,0 (0,0) <b>b</b>	100,0 (0,0)
Teflubenzurón	45	74,7 (16,5) <b>ab</b>	96,9 (3,0) <b>a</b>	71,9 (15,3) <b>ab</b>	100,0 (0,0)
Cipermetrina	25	25,5 (4,3) <b>a</b>	-----	25,5 (4,3) <b>a</b>	-----
Acetamiprid	200	0,0 (0,0) <b>a</b>	-----	0,0 (0,0) <b>a</b>	-----
	<i>p</i> =0,05	<i>p</i> = 0,008	<i>p</i> = 0,368	<i>p</i> = 0,008	
		K=13,7	K= 2,0	K=13,7	

**Tabla 5.2** Efectos de piriproxifén, teflubenzurón, cipermetrina y acetamiprid, sobre los estados inmaduros y los adultos de *E. connexa* expuesta a los insecticidas en el cuarto estadio larval. Los datos corresponden a valores medios ( $\pm$ Error estándar)

**Efectos sobre el tiempo de desarrollo:** Las evaluaciones a largo plazo (efectos subletales) sobre posibles efectos del insecticida sobre el desarrollo preimaginal como también en la fecundidad y fertilidad de las hembras se realizaron únicamente para los reguladores del crecimiento (piriproxifén y teflubenzurón), ya que los individuos tratados

alcanzaron a completar el ciclo de vida. Por el contrario, estas evaluaciones no fueron posibles en individuos tratados con cipermetrina y acetamiprid, como consecuencia de la elevada mortalidad.

En la **figura 5.4**, puede observarse que el insecticida piriproxifén extendió el tiempo de desarrollo del estadio larval L<sub>4</sub> con respecto al control, mientras que para el insecticida teflubenzurón no mostró diferencias significativas con el control para este punto final. El teflubenzurón redujo el tiempo de desarrollo de la pupa, con respecto al tratamiento control, al igual que el piriproxifén, pero esta reducción no fue significativamente diferente al control. En cuanto al tiempo de desarrollo total (L<sub>4</sub>-pupa), el piriproxifén produjo un alargamiento que resultó mayor que el obtenido en individuos tratados con teflubenzurón, obteniéndose valores de 8,8d y 8,2d respectivamente. Sin embargo estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas.



**Figura 5.4** Efectos secundarios de los insecticidas piriproxifén y teflubenzurón sobre el tiempo de desarrollo de los estados inmaduros, L<sub>4</sub>, pupa y periodo intermuda L<sub>4</sub>-pupa de *E. connexa*. Los resultados corresponden a ensayo de exposición tópico sobre estadio larval L<sub>4</sub> de *E. connexa*. Los datos corresponden a valores medios ( $\pm$ Error estándar).

**Efectos sobre la fecundidad y fertilidad.** La fecundidad y fertilidad acumulada de hembras fue evaluada durante cinco días posteriores a la individualización de las hembras grávidas (**Tabla 5.3**).

Los resultados obtenidos para este punto final muestran que el número de huevos puestos (fecundidad acumulada) en el tratamiento con teflubenzurón fue significativamente menor que el obtenido en el control. El insecticida piriproxifén si bien también redujo la fecundidad (41%), ésta no resultó significativa con respecto al control. En lo que respecta al número de larvas emergidas (fertilidad acumulada), ésta fue significativamente menor en ambos tratamientos con ambos productos y en comparación con el control. Sin embargo, los valores de porcentaje de eclosión indican que solamente el tratamiento con teflubenzurón resultó significativamente menor al control y al observado en el tratamiento con piriproxifén.

**Tabla 5.3** Toxicidad de piriproxifén y teflubenzurón sobre la fecundidad y fertilidad acumuladas de hembras sobrevivientes, a partir de ensayo tópico sobre estadio L4 de *E. connexa*. Los datos corresponden a valores medios ( $\pm$ Error estándar).

Tratamientos	Concentración (mg i.a/L)	<sup>(1)</sup> Fecundidad	<sup>(2)</sup> Fertilidad	<sup>(3)</sup> Eclosión (%)
Control	0	95,2 (15,4) <b>a</b>	74,3 (12,4) <b>a</b>	77,8 (3,9) <b>a</b>
Piriproxifén	75	55,8 (12,4) <b>ab</b>	39,7 (8,7) <b>b</b>	68,2 (3,9) <b>a</b>
Teflubenzurón	45	45,8 (11,6) <b>b</b>	17,3 (3,9) <b>b</b>	46,7 (7,6) <b>b</b>
( $\alpha=0,05$ )		$p= <0,0001$	$p= <0,0001$	$p= <0,0001$
		F= 25,6	F= 241,2	F= 164,2

<sup>(1)</sup>Puesta acumulada primeras cinco oviposiciones (fecundidad acumulada).

<sup>(2)</sup>Número promedio de huevos eclosionados (fertilidad acumulada).

<sup>(3)</sup>Media de la eclosión obtenida de las primeras cinco oviposiciones.

#### 5.1.4. Evaluación de concentraciones inferiores a la MCRC de acetamiprid sobre el cuarto estadio larval de *E. connexa*.

Los tratamientos con acetamiprid a la MCRC (200 mg i.a./L) sobre el estadio larval L<sub>4</sub> de *E. connexa*, provocaron el 100% de mortalidad a las 24 h de exposición (Sección 5.1.3). Como consecuencia, se diseñaron los bioensayos con concentraciones inferiores de acetamiprid con la finalidad de evaluar los posibles efectos subletales de este producto sobre la L<sub>4</sub> del depredador. Las concentraciones evaluadas fueron: 100, 50, 20, 10, 5 y 1 mg (acetamiprid)/L. Las soluciones de insecticida fueron preparadas utilizando acetona (para análisis A.C.S.) como solvente y para el tratamiento control se utilizó acetona. La aplicación del insecticida se realizó de manera tópica con microaplicador manual Burkard<sup>®</sup> colocando sobre los primeros segmentos torácicos 1µL de solución de insecticida. (**Figura 5.1**). Para cada uno de los tratamientos se utilizaron tres réplicas de 10 individuos cada una.

Se evaluaron como puntos finales, la mortalidad, y en aquellos casos donde los organismos sobrevivieron y llegaron a completar el ciclo de vida, se evaluaron como efectos subletales: la duración del tiempo de desarrollo de los estadios y estados inmaduros y el tiempo completo desde el estadio larval (L<sub>4</sub>) hasta el adulto, como también la fecundidad y fertilidad acumulada de hembras sobrevivientes durante cinco días consecutivos a la identificación de las hembras ovíparas. Para la evaluación de la fecundidad y fertilidad se siguió la misma metodología descrita en la sección 5.1.3 del presente capítulo (**Figura 5.3**).

Para el análisis estadístico de los datos se siguió el procedimiento descrito en la sección 5.5.1 del presente capítulo.

## Resultados

La **tabla 5.4** muestra los valores de supervivencia obtenidos a partir de los tratamientos por tóxico de L<sub>4</sub> de *E. connexa* con concentraciones de acetamiprid inferiores a la MCRC.

Las concentraciones de acetamiprid de 100 y 50 mg i.a./L provocaron un 100% de mortalidad de L<sub>4</sub>. Del tratamiento con 20 mg i.a./L se obtuvo un 6,6% de supervivencia, por lo que no se pudieron seguir evaluando efectos a largo plazo. A partir del tratamiento con 10 mg de acetamiprid/L se obtuvo un 54,1 % de supervivencia, que resultó menor que la del control (93%). En individuos tratados con concentraciones de acetamiprid de 5 y 1 mg i.a./L, se obtuvieron valores de supervivencia de 79,3 y 95,2% respectivamente, que no presentaron diferencias significativas con el control. Las pupas provenientes de estos ensayos no mostraron efectos en la supervivencia y el porcentaje de emergencia de adultos fue similar a la obtenida en el control. La supervivencia total desde el estadio larval L<sub>4</sub> hasta adulto fue significativamente menor en comparación con el control, para individuos tratados con las concentraciones de 10 y 5 mg i.a./L de acetamiprid. En tanto que la menor concentración evaluada (1 mg/L) no evidenció diferencias significativas con el control (Tabla 5.4).

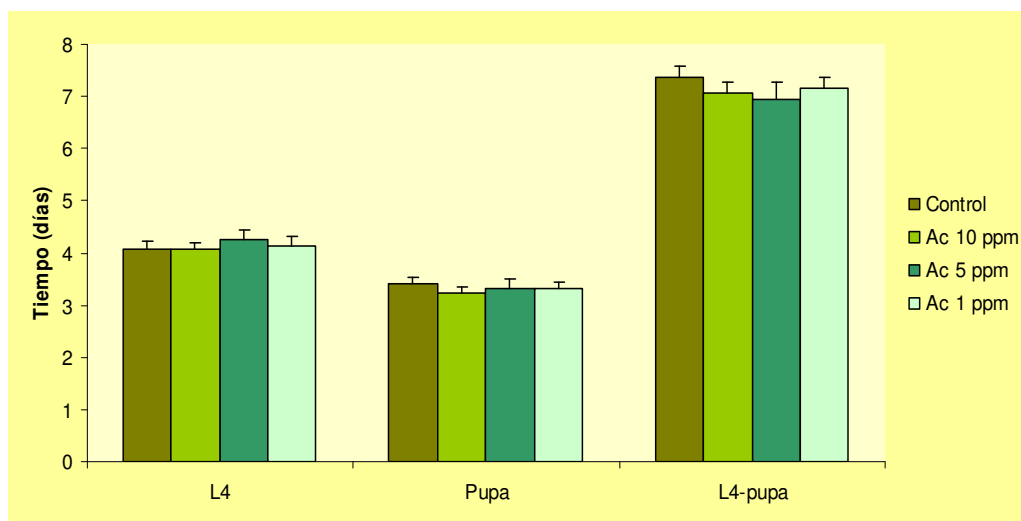
Para las concentraciones de 1, 5 y 10 mg/L de acetamiprid (1, 5 y 10 mg/L) con las que los individuos tratados completaron el ciclo de vida, se evaluaron posibles efectos sobre el tiempo de desarrollo en los estadios inmaduros y el período L<sub>4</sub>- pupa. Como se muestra en la **figura 5.5**, los resultados obtenidos para este parámetro no evidencian diferencias significativas en ninguna de las tres concentraciones con respecto al control.



Tabla 5.4 Efectos de acetamiprid en concentraciones inferiores a la MCRC sobre la supervivencia de diferentes estadios de *E. connexa*. Los resultados corresponden al ensayo por tópico sobre el estadio larval L<sub>4</sub> de *E. connexa*. Los datos corresponden a valores medios ( $\pm$ Error estándar).

Tratamiento	Supervivencia (%)			Emergencia adulta
	<sup>(1)</sup> L <sub>4</sub>	<sup>(1)</sup> Pupa	<sup>(2)</sup> L <sub>4</sub> - Adulto	
Control	93,3 (3,3) <b>c</b>	96,2 (3,7) <b>a</b>	90,0 (5,7) <b>a</b>	100 (0,0)
Acetamiprid 100 (mg/L)	0,0 (0,0) <b>a</b>	-----	-----	-----
Acetamiprid 50 (mg/L)	0,0 (0,0) <b>a</b>	-----	-----	-----
Acetamiprid 20 (mg/L)	6,6 (6,6) <b>ab</b>	-----	-----	
Acetamiprid 10 (mg/L)	54,1 (4,1) <b>abc</b>	86,6 (13,3) <b>a</b>	45,8 (4,1) <b>c</b>	100 (0,0)
Acetamiprid 5 (mg/L)	79,3 (10,4) <b>bc</b>	86,6 (7,2) <b>a</b>	69,9 (10,3) <b>b</b>	100 (0,0)
Acetamiprid 1 (mg/L)	95,2 (4,7) <b>c</b>	89,9 (5,2) <b>a</b>	84,9 (0,7) <b>ab</b>	100 (0,0)
( $\alpha=0,05$ )	$p= 0,005$	$p= 0,697$	$p= <0,0001$	
	K= 18,3	K= 1,4	F= 139,4	

<sup>(1)</sup> Kruskal-Wallis; <sup>(2)</sup> ANOVA



**Figura 5.5.** Efectos de concentraciones de acetamiprid inferiores a la MCRC (10, 5 y 1 ppm) sobre el tiempo de desarrollo de los estados inmaduros de *E. connexa*, a partir de ensayo tópico sobre estadio larval L<sub>4</sub>. Los datos corresponden a valores medio ( $\pm$ Error estándar).

ppm= partes por millón (mg i.a./L)

**Efectos en la fecundidad y fertilidad.** Los resultados de los parámetros reproductivos de hembras sobrevivientes a partir de ensayos de exposición tópica sobre el estadio larval L<sub>4</sub>, se muestran en la (Tabla 5.6). Para la concentración de 10 mg i.a./L de acetamiprid, que corresponde al 5% de la MCRC (200 mg i.a./L), se observó una reducción significativa en el número de huevos puestos (fecundidad) comparado con el control, como también en el número de huevos eclosionados (fertilidad).

En cuanto a las concentraciones más bajas de acetamiprid evaluadas (5 y 1 mg i.a./L) la fecundidad acumulada (número de huevos puestos), si bien mostró una reducción con respecto al control, ésta no fue significativa. El número de huevos eclosionados de esas posturas (fertilidad), para el caso de la concentración de 5 mg/L de acetamiprid no evidenció diferencias significativas con el tratamiento control. Sin

embargo, sí se observaron diferencias significativas en la concentración de 1 mg/L de acetamiprid.

**Tabla 5.6.** Efecto de acetamiprid a concentraciones inferiores a la MCRC sobre la fecundidad y fertilidad acumuladas en adultos de *E. connexa*. Los resultados corresponden a ensayos de exposición tópica sobre el estadio larval L<sub>4</sub> del depredador. Los datos corresponden a valores medios ( $\pm$ Error estándar)

Tratamientos	Concentración (mg i.a/L)	<sup>(1)</sup> Fecundidad	<sup>(2)</sup> Fertilidad	<sup>(3)</sup> Eclosión (%)
Control	0	165,8 (22,9) <b>a</b>	137,6 (20,8) <b>a</b>	82,9 (3,1) <b>a</b>
Acetamiprid	10	86,2 (25,8) <b>b</b>	58,5 (24,1) <b>b</b>	56,3 (13,0) <b>b</b>
Acetamiprid	5	151,2 (23,5) <b>ab</b>	99,8 (19,2) <b>ab</b>	65,1 (4,6) <b>ab</b>
Acetamiprid	1	101,2 (21,0) <b>ab</b>	66,4 (12,6) <b>b</b>	69,7 (7,9) <b>ab</b>
( $\alpha=0,05$ )		$p= <0,0001$ F= 32,4	$p= <0,0001$ F= 25,6	$p= <0,0001$ F= 91,6

<sup>(1)</sup>Puesta acumulada durante cinco días consecutivos de oviposición (fecundidad acumulada).

<sup>(2)</sup>Número promedio de huevos eclosionados (fertilidad acumulada).

<sup>(3)</sup>Media de la eclosión obtenida de las cinco oviposiciones.

## 5.2 Discusión

Tal como se mencionara en la introducción, uno de los objetivos centrales del Manejo Integrado de Plagas (MIP) es abordar distintas técnicas para controlar el desarrollo de poblaciones de plagas en los cultivos. Entre las técnicas que contempla el MIP, sobresale el Control Biológico y Control Químico con plaguicidas selectivos (baja toxicidad hacia organismos no blanco), buscando la compatibilización de estas técnicas para su uso conjunto en el control de las plagas, asegurando la sustentabilidad de los agroecosistemas. Para ésto es importante evaluar *a priori*, mediante ensayos ecotoxicológicos (laboratorio, campo, semi-campo), la selectividad de los insecticidas utilizando enemigos naturales o especies no blanco en general como “organismo

diagnóstico” para evaluar su susceptibilidad, a productos insecticidas a través de distintas técnicas de exposición en los diferentes estados de desarrollo.

Varios autores (Vogelezang-Stoute, 2003; Desneux et al., 2007) coinciden en que los insecticidas biorracionales suelen ser más compatibles con los enemigos naturales que los insecticidas de amplio espectro, principalmente debido a su persistencia en el ambiente. Sin embargo, existen antecedentes acerca de los efectos adversos de estas nuevas sustancias químicas sobre depredadores y parasitoides ya sea por su toxicidad aguda o efectos subletales que afectan por ejemplo el desempeño de los enemigos naturales (comportamiento, capacidad de búsqueda, reproducción) como agentes del control biológico.

De acuerdo con los resultados de los bioensayos de toxicidad de insecticidas por tópico sobre los estadios larvales ( $L_2$  y  $L_4$ ) de *E. connexa*, queda en evidencia que ambos estadios larvales de esta especie muestran una elevada susceptibilidad a la MCRC (200 mg i.a./L) de acetamiprid. Esta alta susceptibilidad al acetamiprid se hace más evidente a partir de los resultados de los ensayos con  $L_2$ , en los que se obtuvo un 72% de mortalidad luego de la exposición a una concentración 200 veces más bajas (1 mg i.a./L) que la MCRC. En cambio, los resultados de los bioensayos con el cuarto estadio larval ( $L_4$ ) muestran una significativa reducción de la supervivencia luego del tratamiento con concentraciones de entre 100 a 20 mg/L. En cambio, para las concentraciones de 10, 5 y 1 mg i.a./L la supervivencia fue de 54%, 79% y 95% respectivamente.

La elevada toxicidad del acetamiprid para *E. connexa* suscribe los resultados obtenidos por otros autores (Young et al., 2003; Grafton-Cardwell and Gu, 2003; Lucas, et al., 2004; Papparichos & Milonas, 2008; van de Veire y Tirry, 2003; Kim et al., 2006) con diferentes neonicotinoides (imidacloprid, thiacloprid y thiamethoxan) ensayados a

través de distintas vías de exposición, en distintas especies de coccinélidos y diferentes predadores de otros órdenes en laboratorio. Por ejemplo, los estudios de exposición tópica sobre los cuatro estadios larvales de *H. axydiris* a acetamiprid, arrojaron 100% de mortalidad. Los mismos resultados se obtuvieron cuando fueron expuestas al neonicotinoide imidacloprid (50 ppm) (Young et al., 2003). Por otro lado, ensayos de exposición residual con acetamiprid e imidacloprid sobre el depredador coccinélido *R. cardinalis* produjeron una mortalidad total sobre larvas de segundo estadio (Grafton-Cardwell and Gu, 2003). Así mismo, Lucas, et al. (2004) cita una mortalidad larval de 80% y 100% con imidacloprid sobre el tercer estadio larval de *Coleomegilla maculata* Timberlake (Coleoptera: Coccinellidae) Más recientemente, estudios realizados con larvas de *Hippodamia undecimnotata* Schneider (Coleoptera: Coccinellidae) expuestos a dosis subletales de carbofuran e imidacloprid, a través de la presa redujeron la supervivencia a 67,6% y 52,2% respectivamente (Paparichos & Milonas, 2008). Estadios larvales (L<sub>1</sub>-L<sub>2</sub>) del depredador *Orius laevignatus* Fieber (Heteroptera: Anthocoridae) fueron expuestos a distintos neonicotinoides (acetamiprid, thiacloprid, imidacloprid y thiamethoxan) en laboratorio, todos éstos compuestos causaron una mortalidad total de las larvas en un periodo de exposición de cuatro días. Los mismos resultados se obtuvieron al exponer estadios larvales L<sub>2</sub> y L<sub>3</sub> del depredador *Macrolophus caliginosus* Wagner (Heteroptera: Miridae) a los insecticidas imidacloprid, acetamiprid y thiamethoxan (van de Veire y Tirry, 2003). Kim et al. (2006), también reportan elevada mortalidad (56%, 72% y 74%) con acetamiprid (178 ppm) a las 24, 48 y 72 h de exposición, respectivamente en ninfas de segundo estadio del depredador *D. brevis* mediante ensayo tópico en laboratorio al insecticida.

El piretroide cipermetrina (25 mg ia/L) afectó de manera significativa la supervivencia de los estadios larvales L<sub>2</sub> y L<sub>4</sub> de *E. connexa*, obteniéndose valores de

mortalidad de 63% y 25% respectivamente. Los resultados de los ensayos de exposición tópica con este insecticida demuestran que el estadio larval L<sub>4</sub> resulta ser más susceptible que el estadio L<sub>2</sub>. Los antecedentes bibliográficos sobre efectos secundarios de piretroides en estadios inmaduros de enemigo naturales en general no son muy abundantes y muchos de ellos han sido realizados sobre el estado adulto. Michaud y Grant (2003), expusieron mediante tratamiento tópico residual larvas de primer estadio de cuatro especies de coccinélidos: *Curinus coeruleus* Mulsant, *Cycloneda sanguinea* L., *H. axyridis*, y *Olla v-nigrum* Mulsant a distintos piretroides (bifentrina, fenpropatrina, zeta-cipermetrina y permetrina). En todas las especies estos cuatro piretroides ocasionaron el 100 % de mortalidad de las larvas expuestas. Por otra parte, Galvan et al. (2005) evaluando larvas de primer y tercer estadio de *H. axyridis* expuestas a dos piretroides (bifentrina y  $\lambda$ -cialotina), no observaron supervivencia. Del mismo modo, el cuarto estadio ninfal del depredador *P. bidens* fue altamente susceptible a deltametrina vía residual (Mahdian et al. 2007). Por otro lado, los insecticidas cyflutrin y fenpropatrin resultaron ser altamente tóxicos hacia larvas de segundo estadio de *R. cardinalis* expuestas a hojas de algodón tratadas, provocaron la muerte luego del primer día de exposición (Grafton-Cardwell and Gu, 2003). En ensayos de elección de dieta sobre larvas neonatas de *C. externa*, cipermetrina redujo significativamente la supervivencia acumulada total (de larva L<sub>1</sub> a adulto), debido principalmente a la reducción de la supervivencia de los estadios L<sub>1</sub> y estado pupa. Sin embargo la exposición de larvas L<sub>3</sub> de *C. externa* a cipermetrina vía ingestión (presa tratadas) no afectó de manera significativa la supervivencia de este estadio de desarrollo (Rimoldi, 2009). Zanuncio et al. (2003) expusieron ninfas de tercer estadio del depredador *Supputius cincticeps* Stal (Heteroptera: Pentatomidae) a permetrina causando una reducción en la supervivencia entre los 4 y 6 días de exposición.

Los insecticidas reguladores de crecimiento interfieren en el desarrollo cuando la exposición se produce durante las etapas inmaduras (larvales o ninfales). De los resultados de los ensayos con *E. connexa* se desprende que el piriproxifen y el teflubenzuron afectan la supervivencia de los estadios larvales L<sub>2</sub> y L<sub>4</sub>, siendo el segundo estadio larval el más susceptible a ambos insecticidas.

Los resultados de los bioensayos por tópico sobre el estadio larval L<sub>2</sub> con teflubenzurón, muestran una reducción significativa en la supervivencia del estadio larval L<sub>2</sub>, como también del estadio larval L<sub>3</sub> en comparación al control. Por otra parte, la supervivencia total, esta también se vio afectada en un 51%. Los resultados de los bioensayos por tópico con L<sub>4</sub> muestran cierta reducción de la supervivencia, pero esta no fue significativa comparada con el control, como tampoco se observaron diferencias significativas de ésta en el total. Evaluado sobre otros predadores, el Teflubenzurón redujo la supervivencia de los estadios larvales del parasitoide *T. pretiosum* en ensayos por tópico (Campiche et al. 2006; Cónsoli et al. 1998). Diferentes inhibidores de la síntesis de quitina también afectan la supervivencia en otros coccinélidos; por ejemplo, el diflubenzurón resultó tóxico para larvas de *C. sanguinea* y *H. axyridis* en ensayos por contacto con residuos sobre hojas de cítricos, al doble de la máxima concentración recomendada para campo, y también en bioensayos por tópico con larvas de *C. sanguinea* a la MCRC (Michaud, 2002). El diflubenzurón a diferentes concentraciones (50, 100 y 200 mg/L), en ensayos por inmersión, afectó significativamente la supervivencia de larvas de primer y segundo estadio de *H. axyridis*, mientras que en larvas de tercer estadio sólo se observó una reducción de la supervivencia con la concentración más alta ensayada, no observándose efectos significativos en la supervivencia de larvas del cuarto estadio (Ruiz-Sánchez, et al. 2010). Este insecticida a la MCRC (60 g/hl) también causó un 50% de mortalidad en larvas de tercer estadio (L<sub>3</sub>)

de *C. carnea* mediante aplicación tópica (Medina et al., 2003). También buprofezin (1,18 Kg/ha), otro inhibidor de la síntesis de quitina, provocó una alta mortalidad larval al segundo estadio de desarrollo en el depredador *R. cardinalis* a través de la vía residual de exposición (Grafton-Cardwell y Gu, 2003). Sin embargo, este mismo insecticida a una concentración de 320 mg/L, resultó inocuo a larvas del parasitoide *A. melinus* cuando la exposición fue vía residual (hojas tratadas), alcanzando todos los organismos a completar su ciclo de vida (Rill et al., 2008). Otros inhibidores de la quitina como novalurón (250 mg/L) y lufenuron (10 g/100 L) fueron altamente tóxicos para el segundo estadio ninfal de *P. maculiventris* y primer, segundo y tercer estadio larval de *C. externa* (Culter et al., 2006; Bueno y Freitas, 2004).

En los resultados de los ensayos por tópico con piriproxifén con el estadio larval L<sub>2</sub>, se observa una reducción en la supervivencia de los individuos expuestos que no resultó significativa para el estadio en cuestión, pero sí lo fue en el momento de evaluar la supervivencia total que resultó del 85%. En el ensayo por tópico con larvas de cuarto estadio L<sub>4</sub> de *E. connexa*, el piriproxifén no afectó la supervivencia, registrándose valores de supervivencia similares a los del control (100%). Este insecticida a concentraciones desde 10 a 100 mg/L, también resultó inocuo para larvas de tercer estadio de *C. externa* tratadas por tópico, y tampoco causó efectos en la supervivencia vía ingestión y por contacto residual para el quinto estadio ninfal del depredador *O. leavignatus* (Medina et al., 2003; Mestdagh et al., 1996). Sin embargo en ensayos de larvas del depredador coccinélido *R. cardinalis* expuestas a residuos de hojas de cítricos tratadas con piriproxifén (0,12 Kg/ha), produjeron una reducción en la supervivencia impidiendo que un número importante llegara a la edad adulta (Grafton-Cardwell and Gu, 2003). Piriproxifén (100 mg/L) redujo significativamente la tasa de supervivencia en larvas de tercer estadio de *C. rufilabris* (Chen and Liu 2001), y fue altamente tóxico



hacia ninfas de cuarto estadio del depredador *P. bidens* a una concentración de 25 mg/L (Mahdian et al., 2007). Teniendo en cuenta efectos sobre parasitoides, no se observaron efectos en la supervivencia en larvas de *A. melinus* expuestas a hojas tratadas con piriproxifén (17 mg/L) (Rill et al., 2008). Por otro lado, tampoco se detectaron efectos en la supervivencia en larvas de *Eretmocerus eremicus* (Hymenoptera: Aphelinidae), que emergieron completamente de ninfas de mosca blanca expuestas a este insecticida (1,45 ml/L) (Hoddle et al., 2001). Sin embargo piriproxifén (75 mg/L) fue ligeramente tóxico para larvas de tercer estadio de *Hyposoter didymator* (Hymenoptera: Ichneumonidae) (Schneider et al., 2004).

Aunque la supervivencia no se vea afectada, los insecticidas pueden manifestar efectos negativos a largo plazo sobre otros parámetros de vida. Los efectos sobre la tasa de desarrollo en los enemigos naturales ya sea por un retraso o alargamiento en la duración del desarrollo, podrían ocasionar una desincronización en el tiempo con el fitógago plaga, influyendo en las relaciones depredador-presa, huésped-parasitoide. Además estos efectos a largo plazo también podrían impactar en la reproducción de los insectos llevando a una reducción en la descendencia, influyendo en la tasa de crecimiento poblacional.

Observando los resultados en conjunto es posible visualizar que el impacto de los insecticidas ensayados sobre el tiempo promedio de desarrollo de cada uno de los estados inmaduros de *E. connexa* resultó bastante variable. La cipermetrina, aplicada en ensayos por tópico sobre L<sub>2</sub>, prolongó la duración de los estadios larvales L<sub>2</sub> y L<sub>4</sub> y el tiempo total intermuda (L<sub>2</sub>-pupa). Similares resultados obtuvieron Michaud y Grand (2003), en ensayos por tópico con zeta-cipermetrina sobre larvas de distintas especies de coccinélidos, observando un alargamiento en el tiempo de desarrollo larval. La duración del desarrollo desde la etapa de huevo hasta adulto se alargó en tratamiento

con  $\lambda$ -cialotrin cuando fueron tratados los estadios inmaduros del parasitoide *T. pretiosum* (Cónsoli et al., 1998). Por otro lado, Permetrina redujo la duración del tercer estadio ninfal pero incrementó la duración del quinto estadio en el depredador *S. cincticeps* (Zanucio et al., 2003). Sin embargo, en ensayos de toxicidad oral con cipermetrina, este insecticida no afectó el tiempo de desarrollo del primer y tercer estadio larval de *C. externa* (Rimoldi, 2009). En ensayos con otros insecticidas neurotóxicos como spinosad e indoxicarb, sobre el primer estadio larval de *H. axyridis*, estos también prolongaron el tiempo de desarrollo sobre este depredador (Galvan et al., 2005)

Los resultados de los bioensayos muestran que el inhibidor de síntesis de quitina teflubenzurón afecta el tiempo de desarrollo de los estadios inmaduros de *E. connexa*. En los ensayos por tópico sobre L<sub>2</sub>, este insecticida prolongó el tiempo de desarrollo de los estadios larvales L<sub>2</sub> y L<sub>3</sub>, fenómeno que afectó el tiempo de desarrollo total (L<sub>2</sub>-pupa). Sin embargo en el estadio larval L<sub>4</sub> se produjo un acortamiento del tiempo de desarrollo con respecto al control. Según Michaud, (2002) las larvas de *C. sanguinea* expuestas a residuos de diflubenzurón mostraron un retardo en el tiempo de desarrollo. Ruiz-Sánchez et al. (2010), expusieron larvas y pupas de *H. axyridis* a tres concentraciones diferentes de diflubenzurón por inmersión y observaron un aumento significativo en el tiempo de desarrollo en el primer y segundo estadio larval a la mayor concentración ensayada (200 mg/L). En los bioensayos con L<sub>4</sub> de *E. connexa* por tópico con teflubenzurón se observó una reducción en el tiempo de desarrollo de los estadios inmaduros, pero solo fue significativa para el estadio de pupa. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Grafton-Cardwell y Gu (2003), que observaron una disminución del tiempo de desarrollo desde los estadios larvales hasta adulto cuando

expusieron larvas del depredador *R. cardinalis*, a residuos de buprofezin (inhibidor de la síntesis de quitina) por contacto.

En el presente trabajo, el insecticida piriproxifen (mimético de la hormona juvenil) aplicado por tópico sobre L<sub>2</sub>, no indujo variaciones en el tiempo de desarrollo de *E. connexa*. En el ensayo con el estadio larval L<sub>4</sub>, solo produjo un alargamiento en el tiempo de desarrollo de ese estadio (L<sub>4</sub>). Chen y Liu (2001) expusieron todos los estadios larvales del depredador *C rubilabris* a priproxifen, observando un alargamiento del tiempo de desarrollo del primer y tercer estadio larval, y un acortamiento en el periodo de desarrollo del segundo estadio larval. Estos mismos autores evaluaron otro mimético de la hormona juvenil como el fenoxicarb con el mismo predador, obteniendo un alargamiento el tiempo de desarrollo en el segundo y tercer estadio larval. Sin embargo, en el primer estadio no hubo diferencias con el control (Liu and Chen, 2001). Larvas de tercer estadio de *H. didymator* tratadas con este insecticida mostraron un retraso en el tiempo de desarrollo (Schneider et al., 2004). Sin embargo este insecticida redujo el tiempo de desarrollo desde larvas a adultos de *R. cardinallis* y no afectó este parámetro en larvas del parasitoide *A. melinus* (Grafton-Cardwell y Gu, 2003; Rill et al., 2008).

En base a los resultados obtenidos sobre la fecundidad y la fertilidad, de los individuos sobrevivientes a la exposición durante el cuarto estadio larval (L<sub>4</sub>) se observó una reducción significativa en la fecundidad acumulada y en la fertilidad cuando fueron expuestos al insecticida acetamiprid a la concentración de 10 mg i.a./L correspondiente al 5% de la MCRC (200 mg i.a./L). Esto coincide con lo citado por Grafton-Cardwell y Gu (2003), quienes observaron una reducción de la fecundidad en los organismos expuestos a acetamiprid, imidacloprid y thiametoxan, en ensayos de contacto residual y presa tratada sobre *R. cardinalis*. Del mismo modo, la fecundidad se

redujo en ensayos sobre *H. undecimnotata* cuando este depredador fue alimentado con áfidos tratados con concentraciones subletales de imidacloprid y carbofurán; si bien la fertilidad no fue afectada (Paparichos y Milonas, 2008). Por otro lado el producto también redujo la la fecundidad en hembras del parasitoide *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Moura et al., 2006). Por el contrario, no se observó ningún efecto negativo sobre la fecundidad y fertilidad de hembras de *D. brevis*, cuando el insecticida fue ensayado a través de la aplicación tópica sobre ninfas de este depredador. Este insecticida tampoco provocó efectos secundarios sobre los parámetros reproductivos del depredador *P. bidens* (Kim et al., 2006; Madhian et al., 2007).

El teflubenzurón también redujo la fecundidad y fertilidad acumulada de hembras de *E. connexa*, cuando la exposición fue sobre el estadio larval L<sub>4</sub> de *E. connexa*. Efectos sobre la reproducción también han sido citados en hembras del parasitoide *T. pretiosum*, con una reducción importante en la capacidad de parasitismo, cuando la exposición al insecticida se produjo durante los estados inmaduros (Consoli et al., 1998). La opovisión y el número de huevos eclosionados se redujo significativamente con tratamientos de novaluron sobre el depredador *P. maculiventirs* (Culter et al., 2006). Sin embargo, otros inhibidores de la quitina como diflubenzurón y triflumurón no afectaron la fecundidad y la fertilidad del depredador *C. carnea* y del parasitoide *H. didymator* respectivamente (Medina et al., 2003, 2007).

El insecticida piriproxifén fue el que en menor medida afectó la fecundidad, ya que la reducción observada no fue significativa. Sin embargo se observó una reducción en la fertilidad con respecto al control. Piriproxifén tampoco afectó la fecundidad del parasitoide *A. melinus* (Rill et al., 2008). En otros estudios con hembras *A. melinus* que sobrevivieron el tratamiento con piriproxifen, se observó una capacidad de parasitismo

similar al tratamiento control, pero se redujo la fertilidad (Suma et al. 2009). Pruebas con el compuesto mimético de la muda fenoxicarb, mostraron una disminución en la tasa de reproducción de *F. candida* (Camoiche et al., 2006).

El insecticida acetamiprid resultó altamente tóxico para ambos estadios larvales evaluados, no sólo a la MCRC, sino también a concentraciones menores. Todas las concentraciones de acetamiprid ensayadas resultaron tóxicas para el estadio larval L<sub>2</sub>. Sin embargo en el ensayo tóxico del estadio larval L<sub>4</sub> para las tres últimas concentraciones (10, 5 y 1 mg/L) evaluadas obtuvimos organismos sobrevivientes. El acetamiprid también afecta la reproducción de *E. connexa* y resultó en general el producto menos selectivo de todos los evaluados para los estadios larvales de *E. connexa*.

La susceptibilidad de la L<sub>2</sub> y L<sub>4</sub> de *E. connexa* a la cipermetrina fue diferente en ambos estadios, resultando más tóxica para L<sub>4</sub>. En general este insecticida resultó poco selectivo selectivo para ambos estadios larvales y afectó el tiempo de desarrollo de los estadios inmaduros cuando fue aplicado en L<sub>2</sub>.

El piriproxifén y el teflubenzurón resultaron los más selectivos para los estadios larvales de *E. connexa*, comparados con la cipermetrina y el acetamiprid. Se observó una marcada diferencia en la susceptibilidad de ambos estadios a estos productos, siendo el estadio larval L<sub>2</sub> más susceptible que el L<sub>4</sub>. También se observaron efectos secundarios no deseados, principalmente en los parámetros evaluados a largo plazo como la tasa de desarrollo y la reproducción. Comparando teflubenzurón con piriproxifen, este último resultó ser el más compatible para los estadios larvales L<sub>2</sub> y L<sub>4</sub> de *E. connexa*.

## **CAPITULO 6**

**Evaluación de efectos toxicológicos de  
piriproxifén, teflubenzurón, acetamiprid  
y cipermetrina sobre pupas de  
*Eriopsis connexa*.**

## **6- Evaluación de efectos toxicológicos de piriproxifen, teflubenzurón, acetamiprid y cipermetrina sobre pupas de *E. connexa***

### **6.1 Bioensayos**

La evaluación de los efectos tóxicos de piriproxifen, teflubenzurón, acetamiprid y cipermetrina sobre pupas del depredador se realizó utilizando la vía de exposición por tópico.

Los organismos utilizados para el estudio se obtuvieron de la cría masiva de laboratorio criados separadamente a partir de una cohorte de huevos coetáneos. Se utilizaron pupas de  $\leq 24$  h de edad. Se evaluaron las MCRC de los insecticidas de Epingle<sup>®</sup> (10% p/v piriproxifen, 75 mg i.a/L, Summit-Agro S.A), Nomolt<sup>®</sup> (15 % p/v teflubenzurón, 45 mg i.a/L, BASF S.A.), Mospilan<sup>®</sup> (20% p/p acetamiprid, 200 mg i.a/L, Summit-Agro S.A) y Glextrin25<sup>®</sup> (25 % p/v cipermetrina, 25 mg i.a/L Gleba S.A.), y para acetamiprid además se evaluó el 50% de la MCRC (100 mg i.a./L). La aplicación de los insecticidas se realizó con microaplicador manual Burkard<sup>®</sup> colocando 1µl de solución sobre cada una de las pupas. Cada tratamiento consistió en 30 pupas. Se utilizó acetona (para análisis A.C.S.) como solvente (Busvine, 1971), para el control se utilizó acetona. La solución de acetamiprid se preparó en medio conteniendo 80% (v/v) de acetona y 20% (v/v) de agua destilada (Youn, et al 2003).

Cada 24 h se evaluaron los efectos en la supervivencia y tiempo de desarrollo de los organismos expuestos y emergencia adulta. Para aquellos organismos que llegaron al estadio adulto se evaluaron los efectos sobre la fecundidad y fertilidad de las hembras sobrevivientes, analizando la oviposición durante cuatro días consecutivos posteriores a la individualización de las hembras grávidas. También se evaluaron efectos teratológicos como malformaciones o anormalidades.

## 6.2 Resultados

Los datos obtenidos de ensayos tópicos en pupas del predador *E. connexa* se resumen en la **tabla 6.1**.

Ninguno de los insecticidas produjo una reducción significativa en la supervivencia pupal.

En los individuos tratados con acetamiprid, piriproxifén y cipermetrina, se observaron efectos subletales teratológicos malformaciones, aunque la mayor proporción de malformaciones se observaron entre los individuos tratados con el neonicotinoide acetamiprid.

La mayor parte de los individuos expuestos a la MCRC de acetamiprid (200 mg i.a./L), no completaron el proceso de muda al estado adulto, presentando anomalías en el proceso de metamorfosis (100%). Se observaron diversas malformaciones como estados intermedios de desarrollo (quedando la parte anterior la región de la cabeza como adulto, la parte del tórax y abdomen como pupa). En otros casos se observó la formación de la parte anterior del adulto (cabeza y los dos primeros pares de patas) mientras que los élitros se formaron parcialmente, quedando unidos al pupario manteniendo las características pupales en la parte posterior de los mismos (**Figura 6.2**)

También se observaron malformaciones y anomalías en la metamorfosis (96%) a la concentración de 100 mg i.a./L (50% de la MCRC) de este insecticida. En este caso aquellos individuos que lograron emerger completamente del pupario, presentaron los élitros más reducidos, no logrando cubrir éstos el tórax y abdomen. Otros individuos no lograron desprenderse de algunos restos del pupario que quedaron adheridos a los élitros. (**Figura 6.3**). Estos efectos subletales impactaron negativamente



sobre el desempeño reproductivo de los adultos sobrevivientes normales (8,3 % para la concentración de 100 mg i.a./L), que no produjeron descendencia (**Tabla 6.1**)

El piriproxifén (75 mg i.a /L), también provocó anormalidades en la metamorfosis de los individuos expuestos (pupa-adulto:46%). Si bien el número de individuos malformados no fue significativo con respecto al control, se observaron individuos en estadios intermedio de desarrollo (pupa-adulto) y adultos malformados (adultos con élitros separados, con incapacidad para desprenderse de los restos de la pupa) (**Figura 6.4**). El 38,4% de los adultos sobrevivientes normales no ovipusieron, a pesar de la presencia de hembras con desarrollo ovárico (abdomen abultado) (**Tabla 6.1**).

En los individuos expuestos a cipermetrina (25 mg i.a/L), se observó un 7% de anormalidades en la metamorfosis, que representa una diferencia no significativa respecto del control. En los adultos normales emergidos (48%), se evaluaron la fecundidad y fertilidad acumulada de los cuatro primeros días consecutivos luego de identificación de las hembras grávidas. Este insecticida si bien redujo en un el número de huevos puestos (fecundidad), esta no fue significativa con respecto al control. Sin embargo, se observó una reducción del 60% en el número de huevos eclosionados (fertilidad), que resultó estadísticamente significativa con respecto al control (**Tabla 6.1**).

Por último el teflubenzurón no causó efectos teratológicos (0%) en las pupas expuestas. Sin embargo se observaron efectos significativos sobre la fertilidad (número de huevos eclosionados) de las hembras, donde se obtuvo un 53% de reducción con respecto al control. Si bien hubo reducción en la fecundidad, esta no fue significativa en comparación con el control (**Tabla 6.1**)

**Tabla 6.1.** Efectos letales y subletales de piriproxifén, teflubenzurón, cipermetrina y acetamiprid, sobre el estadio de pupa del predador *E. connexa*. Los datos corresponden a valores promedios (Error Standard).

Tratamientos	Concentración (mg i.a/L)	Supervivencia pupas (%) <sup>(a)</sup>	Adultos normales (%) <sup>(a)</sup>	Individuos malformados (%) <sup>(a)</sup>	<sup>(a)</sup> Fecundidad <sup>(1)</sup>	<sup>(b)</sup> Fertilidad <sup>(1)</sup>	<sup>(a)</sup> Eclosión (%) <sup>(1)</sup>
Control	0	91,1 (5,2) <b>ab</b>	88,3 (3,2) <b>b</b>	0,0 (0,0) <b>a</b>	65,7 (9,2) <b>b</b>	57,1 (8,3) <b>a</b>	85,7 (3,3) <b>b</b>
Piriproxifén	75	80,0 (10,8) <b>ab</b>	38,4 (3,2) <b>ab</b>	45,3 (5,2) <b>abc</b>	0,0 (0,0) <b>a</b>	-----	-----
Teflubenzurón	45	84,2 (4,6) <b>ab</b>	80,5 (4,2) <b>b</b>	0,0 (0,0) <b>a</b>	35,25 (11,3) <b>b</b>	26,5 (8,4) <b>b</b>	49,0 (15,8) <b>a</b>
Cipermetrina	25	59,2 (25,9) <b>a</b>	48,1 (22,5) <b>ab</b>	7,4 (3,7) <b>ab</b>	27,6 (8,9) <b>ab</b>	20,4 (6,0) <b>b</b>	63,9 (18,8) <b>ab</b>
Acetamiprid	200	100,0 (0,0) <b>b</b>	0,0 (0,0) <b>b</b>	100,0 (0,0) <b>c</b>	-----	-----	-----
	100	100,0 (0,0) <b>b</b>	8,3 (8,0) <b>b</b>	95,8 (4,1) <b>bc</b>	-----	-----	-----
$\alpha = 0,005$		$p = 0,140$	$p = 0,014$	$p = 0,006$	$p = 0,002$	$p = <0,0001$	$p = 0,098$
		K= 8,3	K= 14,3	K= 16,1	K= 15,3	F= 24,8	K= 4,6

<sup>(1)</sup> Número de huevos (media acumulada) de los primeros cuatro días de oviposición (fecundidad acumulada).

<sup>(2)</sup> Media acumulada del número de huevos eclosionados (fertilidad acumulada).

<sup>(3)</sup> Media de la eclosión obtenida de las oviposiciones

<sup>(a)</sup> Kruskal–Wallis; <sup>(b)</sup> ANOVA



**Figura 6.2** Malformaciones en individuos de *E. connexa* expuestos a acetamiprid (200 mg i.a /L) mediante aplicación tópica en pupa



**Figura 6.3** Malformaciones en individuos de *E. connexa* de expuestos a acetamiprid (100 mg i.a /L) mediante aplicación tópica en pupas.



**Figura 6.4** Malformaciones en individuos de *E. connexa* expuestos a piriproxifén (75 mg i.a /L) mediante aplicación tópica en pupas.

### 6.3 Discusión

Los enemigos naturales (depredadores y parasitoides) por si solos no siempre pueden mantener las poblaciones de fitófagos por debajo del nivel de daño económico, por lo que es necesario utilizar estrategias de control biológico y muchas veces intervenir con plaguicidas, para obtener un control exitoso de las plagas en los cultivos. Sin embargo, determinar la compatibilidad de los plaguicidas con agentes de control biológico es un tema polémico (Stark y Banks, 2003). La mayor parte de los estudios se basan en el esquema propuesto por la Organización Internacional de Lucha Biológica (IOLB) que clasifica a los plaguicidas en cuatro categorías de acuerdo a la toxicidad que causan sobre los enemigos naturales; pero en estos estudios solo se toma como punto final de evaluación, la mortalidad o la capacidad benéfica (Hassan 1994, 1998). Este tipo de estudios, si bien son importantes, se encuentran restringidos a los efectos letales y se pasa por alto o se subestiman los efectos subletales que ocasiona la exposición de los insectos benéficos a los plaguicidas, que incluso se pueden manifestar simultáneamente (Stark et al. 2007).

Los efectos subletales se definen como aquellos efectos que alteran la fisiología, bioquímica y aspectos comportamentales de los individuos que logran sobrevivir a la exposición de un plaguicida, ya sea la concentración máxima de campo o inferiores a ésta (Desneux et. al 2007).

Teniendo en cuenta lo antes mencionado, los resultados obtenidos sobre la exposición de pupas a los insecticidas de *E. connexa*, no presentaron una reducción significativa en la supervivencia. Si embargo, los organismos que lograron sobrevivir mostraron claros efectos subletales, que se manifestaron como fenómenos teratológicos, como desarrollo anormal y malformaciones en los individuos tratados con acetamiprid, piriproxifén y cipermetrina.

Este fenómeno ha sido abordado en la literatura por diferentes investigadores y para distintos taxones de enemigos naturales. Las pupas del parasitoide *H. dydimator* tratadas con piriproxifén a una concentración más baja de la MCRC, produjo una disminución significativa en la emergencia adulta, y los individuos que lograron emerger mostraron caracteres intermedios de pupa y adulto (Schneider et al. 2003). Del mismo modo, en ensayos con ninfas del depredador *P. maculiventris* expuestas a piriproxifén, los adultos emergidos presentaron alas malformadas y el pronoto hundido (Mestdagh et al. 1996). Darvas y Polgar (1998) obtuvieron adultos con deformidades en las alas cuando trataron pupas de *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae). Estos resultados coinciden con los obtenidos en la presente tesis con este mismo insecticida. Fenoxicarb (mimético de la hormona juvenil) también ocasionó malformaciones en pupas y larvas de *Apis mellífera* L. (Hymenoptera: Apoidea) (DeRuijter y VanderSteen, 1987). Por otro lado Ahmad et al. (2003), reportaron malformaciones en los depredadores crisópidos *C. septempunctata* y *C. carnea* expuestos al insecticida botánicoazaridactina.

En otro estudio, larvas de *H. axyridis* expuestas a dos neonicotinoides (tiametoxam y clotianidina), mostraron síntomas neurotóxicos como temblores, parálisis y pérdida de coordinación (Moser y Obryck, 2009). En ensayos de exposición tópica sobre pupas de *H. axyridis*, acetamiprid fue altamente tóxico y no permitió la emergencia adulta (Youn et al. 2003). Sin embargo, resultó inocuo en pupas de *T. pretiosum* y moderadamente tóxico para distintas especies del género *Eretmocerus* ssp. (Moura et al. 2006; Sugiyama et al., 2011). El neonicotinoide imidacloprid tampoco fue tóxico para pupas del parasitoide *H. dydimator* (Medina et al. 2007).

Los resultados obtenidos en la presente tesis, corroboran el fenómeno de reducción en la fecundidad y fertilidad de adultos expuestos a los IGRs, piriproxifén y

teflubenzurón en los adultos normales. El diflubenzurón (inhibidor de la síntesis de la quitina) redujo significativamente los parámetros reproductivos del parasitoide ichneumónido *H. dydimator* cuando fueron expuestos al estado pupal y mediante aplicación tópica (Schneider et al. 2003). Piriproxifén, inhibió la emergencia de los adultos de *R. cardinalis* cuando se aplicó en pupas de este depredador (Mendel et al. 1994). Por otra parte, el piriproxifén inhibió la capacidad de parasitismo del parasitoide *Leptomastix dactylopii* Howard (Hymenoptera: Encyrtidae), sin dejar progenie por parte de las hembras sobrevivientes (Suma et al., 2009). Por el contrario, tanto el piriproxifén y el diflubenzurón no afectaron la fecundidad y la fertilidad del crisópido *C. carnea* (Medina et al. 2003).

La cipermetrina redujo la supervivencia de pupas de *E. connexa* en un 35%, aunque esta reducción no fue significativa con respecto al control. El piretroide fenvelerato fue levemente nocivo para pupas de este mismo depredador (Lorca-González, 2005). Por el contrario, la cipermetrina no produjo efectos en la supervivencia y en la emergencia del adultos del crisópido *C. externa*, cuando el tratamiento fue realizado sobre pupas (Rimoldi, 2009). Bifentrin redujo significativamente la emergencia de adultos a partir de pupas tratadas del coccinélido *H. axyridis* (Galvan et al., 2005). En pupas de distintas especies de *Ertmocerus ssp.* el piretroide permetrina fue levemente tóxico para éste parasitoide (Sugiyama et al. 2011).

En los bioensayos con cipermetrina se observó una reducción en la fecundidad y fertilidad, siendo significativa la reducción de esta última (número de huevos eclosionados con respecto a los huevos puestos). Los antecedentes bibliográficos sobre los efectos de distintos piretroides son variados, de acuerdo con las especies de benéficos considerados. En este sentido Consoli et al. (1998) citaron una reducción en la fecundidad de *T. pretiosum* cuando fueron expuestos a  $\lambda$ -cyalotrina. La fecundidad de

*O. insidiosus* también fue reducida por ciflutrina. Sin embargo la fecundidad y fertilidad no se vio afectada por permetrina sobre el depredador *S. cincticeps* (Zanucio et al., 2003). La deltametrina no produjo efectos sobre pupas de *C. carnea* y tampoco alteró los parámetros reproductivos (Giolo et al., 2009)

Los insecticidas biorracionales se caracterizan por tener un modo de acción diferente al de los convencionales, con una mayor selectividad, menor persistencia en el ambiente, por lo que estos productos se proclaman como de bajo impacto en el ambiente y sobre los organismos no blanco como es el caso de los enemigos naturales; piezas clave para estrategias de Control Biológico, en programas de Manejo Integrado de Plagas (Ishaaya et al., 2007).

De los insecticidas aquí evaluados tanto acetamiprid, piriproxifén y teflubenzurón pertenecen al grupo de plaguicidas de tercera generación y son considerados biorracionales debido principalmente a su modo de acción diferente a los convencionales. El piriproxifén actúa mimetizando la hormona juvenil durante las etapas inmaduras de los insectos, provocando disrupciones en la metamorfosis, supresión de la embriogénesis y en la formación de adultos (Ishaaya et al., 1994). Por esto es de esperar que este insecticida produjera malformaciones en las pupas, obteniendo organismos con características intermedias (pupa-adulto) y para los adultos normales la supresión de la fecundidad.

Los insecticidas neonicotinoides actúan sobre los receptores de acetilcolina (nAChR) de tipo nicotínico de los insectos, provocando excitación y parálisis seguida de muerte. La selectividad de estos compuestos está relacionada, con la mayor afinidad que le confieren los receptores de acetilcolina en los insectos en comparación con la de los vertebrados (Tomizahwa y Casida, 2005) y por esto fueron categorizados como biorracionales por la USEPA (Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos).

Ahora bien, de acuerdo a los resultados obtenidos con acetamiprid, se observaron efectos teratológicos en todos los individuos expuestos. Teniendo en cuenta el modo de acción y los resultados obtenidos sobre los otros estados inmaduros del depredador (capítulos 4 y 5) es de esperar que los individuos tratados mueran inmediatamente luego de la exposición. La presencia de efectos teratogénicos podría justificarse considerando que en el Sistema Nervioso Central se sintetizan las neurohormonas que regulan diferentes procesos enzimáticos y entre ellos, los centros de producción de las hormonas del crecimiento y desarrollo. Por lo tanto, es posible que el acetamiprid tenga algún efecto sobre los procesos fisiológicos relacionados con la metamorfosis del depredador.

La susceptibilidad de pupas depredador *E. connexa* a los insecticidas aquí evaluados en laboratorio es relevante, debido a los efectos subletales observados durante los bioensayos. El acetamiprid y el piriproxifen fueron los insecticidas menos selectivos para el estado de pupa. Con el acetamiprid se obtuvo un alto porcentaje de individuos malformados, incluso con la concentración correspondiente al 50% de la MCRC. El piriproxifén, además de provocar efectos teratológicos, mostró efectos sobre la reproducción, ya que ninguno de los organismos normales dejó descendencia.

En cuanto a la cipermetrina, si bien la supervivencia de pupas de *E. connexa* no fue significativa con el control, de todos los insecticidas evaluados, provocó una reducción del 40%. Si observamos una disminución significativa en la fertilidad de los adultos sobrevivientes. En este caso sólo se obtuvo un 7% de organismos con malformaciones. En cuanto a la selectividad de cipermetrina, esta fue mayor que acetamiprid y piriproxifén para el estado de pupa.

Por último el insecticida teflubenzurón fue el más selectivo de todos los estudiados, ya que no provocó efectos teratológicos, aunque se observó una reducción en la fertilidad de los individuos sobrevivientes.



## CAPITULO 7

**Evaluación de efectos toxicológicos de  
piriproxifén, teflubenzurón, acetamiprid  
y cipermetrina sobre adultos de *Eriopsis  
connexa***

## **7- Evaluación de efectos toxicológicos de piriproxifén, teflubenzurón, acetamiprid y cipermetrina sobre adultos de *Eriopis connexa*.**

### ***Consideraciones generales***

La susceptibilidad a los insecticidas varía en función del estado de desarrollo de los individuos evaluados, a menudo los adultos suelen ser menos susceptibles que los estados inmaduros (Delberke et al., 1997; Michaud, 2002; Michaud y Grant, 2003). Esta diferencia en la susceptibilidad radica principalmente: 1) en que los estados inmaduros deben atravesar por varias etapas en su ciclo de vida hasta alcanzar la fase reproductiva, 2)- en general, la cutícula de los estados inmaduros es más permeable debido a una baja quitinización y 3)- los procesos enzimáticos relacionados con la detoxificación son menos activos que en los adultos. Por el contrario, en una población donde los adultos ya están establecidos, son éstos los que van a contribuir a la descendencia y al crecimiento de la población (Stark et al., 2004).

Los ensayos de exposición a insecticidas con adultos del depredador, se diseñaron teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los bioensayos con los estados inmaduros de *E. connexa* (Capítulos 4, 5 y 6), de manera de completar el perfil toxicológico de los insecticidas que son objeto del estudio.

### **7.1 Bioensayos**

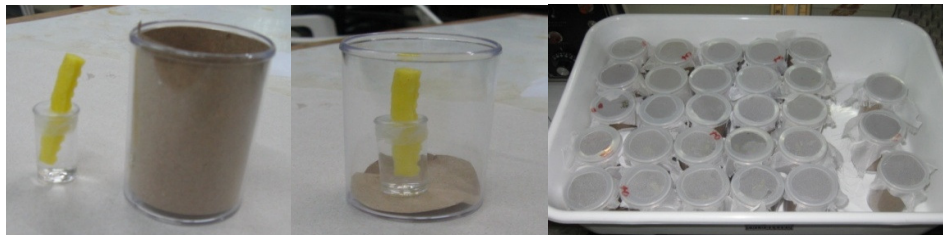
Para llevar a cabo los experimentos se utilizaron adultos procedentes de misma cohorte y con  $\leq 5$  días de edad. Una vez emergidos los adultos se colocaron 30 individuos en recipientes de plástico (“ponedero”) (15 cm de alto X 18 cm diámetro) cubiertos con voile en la parte superior de los mismos para facilitar la ventilación. Se les suministró presa (*R. padi*) *ad libitum* y como suplemento alimenticio se adicionó dieta

artificial (Martos y Neimeyer, 1990) y pasas de uva. Los “ponederos” se llevaron a cámara de cría durante 5 días para favorecer la cópula y asegurar la presencia de hembras oviplenas (desarrollo ovárico). Durante este tiempo se los revisó y se reemplazó el alimento *ad libitum* de forma tal de impedir la reabsorción de huevos. Al quinto día se separaron cada uno de los adultos para iniciar el bioensayo.

Se evaluaron las MCRC (Máxima Concentración Recomendada para su uso en el Campo) de los siguientes productos comerciales: Epingle<sup>®</sup> (10% p/v piriproxifén, 75 mg i.a/L, Summit-Agro S.A), Nomolt<sup>®</sup> (15 % p/v teflubenzurón, 45 mg i.a/L, BASF S.A.), Mospilan<sup>®</sup> (20% p/p acetamiprid, 200 mg i.a/L, Summit-Agro S.A) y Glextrin25<sup>®</sup> (25 % p/v cipermetrina, 25 mg i.a/L Gleba S.A.).

La forma de exposición a los insecticidas se realizó mediante un ensayo crónico por ingestión, suministrado las soluciones de insecticidas mediante agua de beber. Los organismos estuvieron expuestos a los plaguicidas durante 72 h renovándose cada día las soluciones (Viñuela et al., 2001). Luego del tiempo transcurrido se les suministró solo agua destilada y abundante presa (*R. padi*) y dieta artificial. La unidad experimental consistió en un recipiente de plástico (7 cm alto y 5 cm diámetro) forrado con papel madera el cual sirvió de sustrato de oviposición para las hembras y facilitar el conteo de los huevos. Dentro de éste se colocó otro recipiente de 5 cm<sup>3</sup> conteniendo las soluciones de insecticidas y todo el recipiente se cubrió con voile para permitir la ventilación y evitar que los organismos se escapen (**Figura 7.1**). El ensayo se realizó durante 15 días y se utilizaron tres réplicas de 10 individuos cada tratamiento

Los puntos finales evaluados fueron: mortalidad, fecundidad y fertilidad



**Figura 7.1** Unidad experimental para ensayo de toxicidad oral con adultos *E. connexa*, ingestión a través de agua de beber.

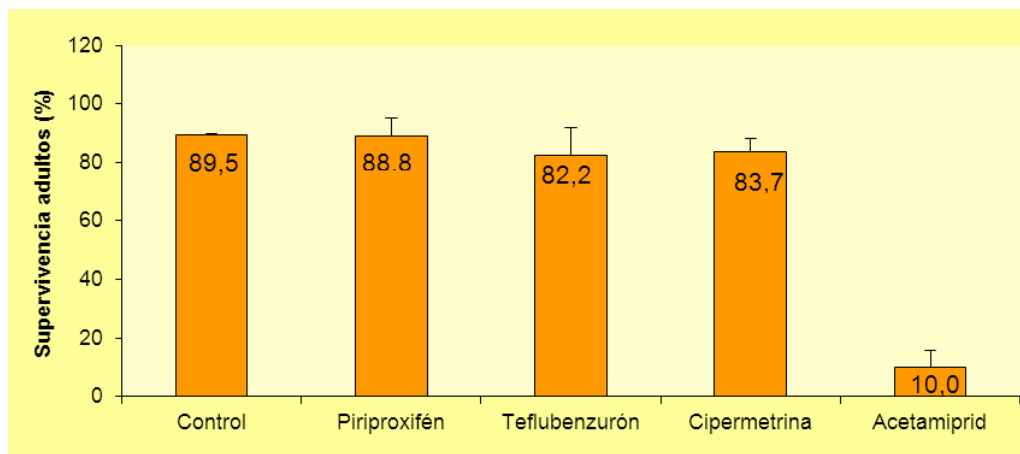
### *Análisis estadístico*

Los datos fueron sometidos a Análisis de la varianza (ANOVA), corroborando a priori las premisas del ANOVA mediante pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk, Anderson-Darling y Jaques-Vera) y la homocedasticidad de las varianzas (Barlett y Levene). Para aquellos datos donde no se cumplieron las premisas del ANOVA, se realizaron transformaciones, logarítmica  $y = \log(x+1)$  y angular:  $p' = \arcseno\sqrt{p}$ , para los datos expresados en porcentajes o proporciones. Para el análisis a posteriori de los datos sometidos a ANOVA, se realizó la separación de medias mediante el test LSD para conocer diferencias entre todos los tratamientos y para evaluar diferencias con el control se utilizó el test de Dunnet. Una vez transformados los datos, si se siguieron sin cumplir los supuestos del ANOVA, se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, realizándose la prueba bilateral de Dunn para comparaciones múltiples. Se utilizó el programa XLStat (Addinsoft XLstat for Excel, 2009)

### **7.2 Resultados y Discusión**

En la **Figura 7.2** se presentan los resultados de supervivencia de adultos expuestos a insecticidas. El acetamiprid redujo la supervivencia de adultos en un (90%),

mientras que el piriproxifén, teflubenzurón y cipermetrina, no afectaron significativamente la supervivencia de los adultos con respecto al control..



**Figura 7.2.** Supervivencia de los adultos de *Eriopsis connexa* expuestos a insecticidas por ingestión a través del agua de beber. Los datos corresponden a valores promedios ( $\pm$ Error estándar)

Debido a que los insecticidas piriproxifén, teflubenzurón y cipermetrina no afectaron la supervivencia fue posible evaluar los efectos en los parámetros reproductivos (fertilidad y fecundidad) de los adultos. Durante el tiempo de desarrollo del ensayo (15 días) se revisaron periódicamente los recipientes; en el caso de encontrar huevos, éstos se separaron y observaron bajo lupa binocular para registrar fecundidad y fertilidad durante las primeras cinco oviposiciones con la finalidad de obtener información sobre los efectos provocados por la exposición a los insecticidas. Los resultados de fecundidad y fertilidad se muestran en la **Tabla 7.1**.

En líneas generales, tanto la fecundidad como la fertilidad fueron afectadas por los IGRs (piriproxifén y teflubenzurón). En la quinta oviposición estos insecticidas redujeron el número de huevos puestos por día con respecto al control, pero al evaluar la fecundidad acumulada no se evidenciaron diferencias significativas con el control. El

piriproxifén y el teflubenzurón también redujeron la fertilidad diaria a partir de la cuarta y quinta oviposición respectivamente. En el tratamiento con piriproxifén también se observó una reducción en la fertilidad acumulada. Al expresar los resultados de estos bioensayos en porcentaje de eclosión, puede observarse una disminución de este porcentaje en función del número de oviposición, siendo el piriproxifén el insecticida que más afectó este parámetro (30-60% de reducción) desde la primera a la quinta oviposición. Estos resultados concuerdan con lo esperado, ya que la exposición a los insecticidas fue posterior a la cópula y desarrollo ovárico con lo cual las primeras oviposiciones correspondieron a los oocitos desarrollados previo al tratamiento y por esto se evidencia una reducción en la capacidad reproductiva después de las primeras oviposiciones y un efecto directo en la eclosión de los huevos desde la primera puesta.

Los coccinélidos son organismos sinovigénicos (desarrollan su huevos a largo de su vida adulta), regulando la reproducción de acuerdo a la presencia de presa, entre otras variables (Hodek and Honěk, 2010). Por lo tanto era esperable que los efectos se hiciesen evidentes a partir de la nueva producción de oocitos por parte de las hembras. Por otro lado, este insecticida es un mímico de la hormona juvenil (HJ), involucrada en los procesos de metamorfosis, pero también en los procesos reproductivos de los insectos (espermatogénesis, vitelogénesis, ovogénesis, etc.). Por lo tanto, la presencia de estos compuestos se correlaciona con fenómenos como la metamorfosis incompleta, efectos ovicidas y supresión de la embriogénesis (Dhadialla et al., 1998)

**Tabla 7.1** Toxicidad de piriproxifén, teflubenzurón y cipermetrina sobre la fecundidad y fertilidad acumulada de hembras sobrevivientes de *E. connexa* a partir de ensayo de adultos. Los datos corresponden a valores medios ( $\pm$ Error estándar).

Tratamiento	Concentración (mg i.a/L)	<sup>(1)</sup> Fecundidad					Fecundidad acumulada
		1°	2°	3°	4°	5°	
Control	0	17,2 (1,6) <b>ab</b>	18,6 (2,1) <b>a</b>	13,4 (2,3) <b>a</b>	15,4 (3,0) <b>a</b>	19,1(3,6) <b>b</b>	83,7(5,5) <b>a</b>
Piriproxifén	75	20,6 (2,9) <b>ab</b>	15,3 (3,6) <b>a</b>	12,9 (3,5) <b>a</b>	11,0 (3,6) <b>a</b>	10,2 (3,5) <b>a</b>	70,2(11,1) <b>a</b>
Teflubenzurón	45	16,0 (3,7) <b>b</b>	19,2(2,4) <b>a</b>	14,6 (1,9) <b>a</b>	11,6 (2,8) <b>a</b>	7,8 (2,6) <b>a</b>	69,3(7,8) <b>a</b>
Cipermetrina	25	22,3 (2,3) <b>a</b>	13,0(2,7) <b>a</b>	11,6 (1,8) <b>a</b>	15,1 (3,1) <b>a</b>	12,5 (2,7) <b>ab</b>	74,8(6,7) <b>a</b>
$\alpha= 0,05$		$p = <0,0001$ F= 359,5	$p=0 217$ K= 4,4	$p=0 ,510$ K= 2,3	$p= 0,437$ K=-2,7	$p= 0,08$ K= 6,6	$p= <0,0001$ F= 69,7
	Concentración (mg i.a/L)	<sup>(2)</sup> Fertilidad					Fertilidad acumulada
Control	0	13,3 (1,5) <b>ab</b>	13,4 (2,0) <b>b</b>	10,9 (2,0) <b>a</b>	11,7 (2,3) <b>b</b>	12,6 (2,9) <b>b</b>	60,7 (6,2) <b>a</b>
Piriproxifén	75	10,4 (1,6) <b>ab</b>	6,6 (2,6) <b>a</b>	7,1(2,6) <b>a</b>	5,7(2,2) <b>a</b>	6,5 (2,5) <b>a</b>	36,4(7,8) <b>b</b>
Teflubenzurón	45	9,9 (3,0) <b>b</b>	11,8(2,4) <b>b</b>	7,7(1,8) <b>a</b>	6,5(2,3) <b>ab</b>	6,1(2,1) <b>a</b>	42,2(7,8) <b>ab</b>
Cipermetrina	25	17,0 (2,3) <b>a</b>	8,0(2,5) <b>ab</b>	8,0 (1,5) <b>a</b>	10,9(2;4) <b>ab</b>	7,5 (2,0) <b>ab</b>	52,0(5,6) <b>ab</b>
$\alpha= 0,05$		$p = <0,0001$ F=29,0	$p = 0,050$ K= 7,8	$p = 0,315$ K= 3,5	$p = 0,072$ K= 4,7	$p = 0,130$ K= 5,6	$p= <0,001$ F= 41,4
	Concentración (mg i.a/L)	Eclosión (%)					Eclosión (%)
Control	0,	77,1 (4,9) <b>b</b>	70,9 (6,8) <b>b</b>	80,8 (5,5) <b>b</b>	72,0 (9,3) <b>b</b>	52,8(8,9) <b>a</b>	71,5 (4,5) <b>a</b>
Piriproxifén	75	53,8 (7,3) <b>a</b>	36,4 (8,1) <b>a</b>	34,5 (9,4) <b>a</b>	28,8 (7,8) <b>a</b>	26,2(9,2) <b>a</b>	50,9(6,2) <b>b</b>
Teflubenzurón	45	48,2 (11,6) <b>a</b>	59,3 (10,3) <b>b</b>	43,1 (10,8) <b>a</b>	31,1(11,3) <b>a</b>	36,2 (13,0) <b>a</b>	54,7(8,4) <b>ab</b>
Cipermetrina	25	75,4 (7,4) <b>b</b>	58,8(9,2) <b>ab</b>	64,2 (6,9) <b>ab</b>	65,5(8,4) <b>b</b>	47,8(8,5) <b>a</b>	69,7(4,8) <b>a</b>
$\alpha= 0,05$		$p = 0,040$ K= 8,3	$p = 0,051$ K= 7,7	$p = 0,004$ K= 3,1	$p = 0,003$ K= 13,1	$p = 0,371$ K= 14,0	$p= <0,0001$ F=66,9

<sup>(1)</sup> Número de huevos puestos durante las cinco primeras oviposiciones

<sup>(2)</sup> Número de huevos eclosionados de las cinco primeras oviposiciones

Liu y Stansly (2004) observaron efectos de dos IGRs sobre la fertilidad en el coccinélido *Delphastus cataline* Horn (Coleptera: Coccinellidae) cuando alimentaron a los adultos de este depredador con huevos de mosca blanca tratados con piriproxifén y buprofenzin. En el caso de buprofenzin también afectó la fecundidad de las hembras, mientras que en aquellos adultos tratados con piriproxifén, luego de alimentarlos con huevos no tratados el efecto se revirtió. Piriproxifén no afectó la supervivencia de adultos de *C. carnea*, pero ejerció un efecto negativo sobre la eclosión de los huevos provenientes de hembras tratadas por ingestión (Medina et al., 2003). Del mismo modo, este insecticida resultó moderadamente tóxico para adultos el parasitoide *Coccophagus lycimnia* Walker (Hymenoptera: Aphelinidae), pero inhibió drásticamente la producción de progenie (Suma et al., 2009). Por el contrario, en adultos de *P. bidens* la supervivencia no fue afectada como tampoco la reproducción (Mahdian et al., 2007). Estos antecedentes coinciden con las observaciones de Rill et al. (2008), sobre la ausencia de toxicidad del piriproxifén sobre el parasitoide *A. melinus*.

Existen amplios antecedentes sobre los impactos negativos en la supervivencia y otros efectos que provocan los neonicotinoides en distintas especies de enemigos naturales incluidos los coccinélidos, a través de distintas vías de exposición, ya sea por contacto tóxico, residual o ingestión (Cloyd y Dickinson, 2006; Moura et al., 2006; Bacci et al., 2007; Lucas et al., 2009; Moser y Obrycki, 2009; Cloyd y Bethke, 2011).

Los resultados de los bioensayos de toxicidad oral del acetamiprid por ingestión, muestran que este producto, resultó altamente tóxico para los adultos de *E. connexa*, obteniéndose un 90 % de mortalidad a las 24 horas de exposición. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores a partir de ensayos con diferentes especies. Acetamiprid fue muy tóxico para los adultos de *H. axyridis* (Youn et al., 2003) y en ensayos con el parasitoide *A. colemani* causó el 100% de mortalidad, 24 h después



de su aplicación (Stara et al., 2010), así como alta mortalidad en ensayos con el parasitoide *A. melinus* (Rill et al., 2008). Los resultados de los ensayos realizados con los IGR's piriproxifén y buprofezin (inhibidores de la síntesis de quitina), señalan la ausencia de efectos sobre la supervivencia de este parasitoide (Rill et al., 2008). Los resultados obtenidos por estos autores con los IGRs coinciden con los obtenidos en los bioensayos realizados con *E. connexa*, en los que puede verse claramente que el piriproxifén así como el teflubenzurón no afectan la supervivencia del depredador. Resultados similares fueron obtenidos por Grafton-Cardewwell y Gu (2003) a través de ensayos por contacto con residuos de piriproxifén y buprofezin en adultos de *R. cardinalis*. Estos autores observaron que ambos IGRs no afectaron la tasa de supervivencia y que solamente el piriproxifén redujo el tamaño de la progenie, y reportaron una reducción en la supervivencia en ensayos con imidacloprid por tópico. En este mismo trabajo se realizaron ensayos por ingestión sobre *R. cardinalis*; los IGRs tampoco afectaron la supervivencia, mientras que los neonicotinoides (acetamiprid e imidacloprid), fueron altamente tóxicos al depredador mediante esta vía de exposición. En ensayos con el coccinélido *H. undecimnotata* Papachristos y Molinas (2008) observaron una reducción de la supervivencia en ambos sexos luego de la exposición al neonicotinoide imidacloprid. Finalmente, en un estudio a campo, Naranjo and Key (2005) observaron que el acetamiprid redujo la supervivencia de diecisiete especies de depredadores, mientras que piriproxifén y buprofezin solamente redujeron la supervivencia de cuatro de ellas de modo significativo.

Los resultados de los ensayos por ingestión muestran que la cipermetrina resultó inocua para adultos de *E. connexa*. Estos resultados difieren de los de otros autores, que señalan la toxicidad de varios piretroides para diferentes especies de depredadores y parasitoides (Elzen et al., 2000; Tillman y Mulrooney, 2000; Stara et al., 2010; Mahdian

et al., 2007). Esta discrepancia podría justificarse sobre la base del efecto repelente de la cipermetrina en adultos de *E. connexa*. La ausencia de toxicidad se debe entonces a la falta de exposición del adulto de *E. connexa* al insecticida debido a su efecto repelente para esta especie; un fenómeno similar al observado en adultos de la araña *Alpaida veniliae* (Araneae: Araneidae), que aparentemente se relaciona con el producto formulado y no con el ingrediente activo *per se* (Benamú, 2010). Otros estudios muestran, a través de ensayos de laboratorio, que la longevidad de adultos del depredador *S. cicticeps* no es afectada por la permetrina (Zanucio et al., 2003). En ensayos de toxicidad aguda y residual con el depredador *Pristhesancus plagipennis* (Hemiptera: Reduviidae) (Walker), la cipermetrina resultó moderadamente tóxica. (Grundy et al., 2000).

Los efectos letales o subletales de los insecticidas sobre los adultos de los enemigos naturales, son relevantes a la hora de considerar el crecimiento poblacional, ya que la alteración de los parámetros reproductivos impacta directamente en los parámetros demográficos (tasa intrínseca de crecimiento poblacional y tasa neta reproductiva) condiciona el crecimiento poblacional de la especie en cuestión, reduciendo o eliminando las poblaciones del mismo a nivel local. Este tipo de alteración tan radical pone en riesgo el equilibrio de las relaciones tróficas presentes en los agroecosistemas, como las relaciones depredador-presa, hospedador-parasitoide. La desestabilización de las relaciones tróficas es la consecuencia principal del uso irracional de los plaguicidas. Es por ello que los programas de Manejo Integrado de Plagas tienden a compatibilizar con la mayor eficiencia posible las técnicas de control disponibles para cada caso en particular, que engloban el control cultural, el biológico, así como el químico a través de la correcta evaluación de los efectos secundarios de los pesticidas existentes, además de la incorporación de nuevos principios activos, más

selectivos y por ende de menor impacto sobre los enemigos naturales de las plagas y sobre organismos no blanco.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente capítulo, podemos concluir que acetamiprid fue altamente tóxico para los adultos de *E. connexa*. Teniendo en cuenta las evaluaciones con los IGRs (piriproxifén y teflubenzurón), los adultos resultaron ser los menos susceptibles a los IGRs e incluso a la cipermetrina (amplio espectro). Los IGRs, afectaron la capacidad reproductiva de las hembras (fecundidad y fertilidad), teniendo más efecto el piriproxifén que redujo la eclosión entre un 30 y 60%.

# **CAPITULO 8**

# **CONCLUSIONES**

Sobre la base de los resultados de los bioensayos con acetamiprid, cipermetrina, piriproxifén y teflubenzurón, sobre los diferentes estadios del desarrollo del depredador *Eriopis connexa*, es posible concluir:



El neonicotinoide acetamiprid fue altamente tóxico para el depredador *E. connexa*, afectando todos los estados de desarrollo del depredador. La concentración mayor evaluada MCRC (200 mg i.a/L) causó un efecto letal en huevos, larvas y adultos. El 50% de la MCRC, redujo la tasa de eclosión de los huevos, el tiempo de desarrollo embrionario y produjo efectos a largo plazo en larvas inhibiendo la supervivencia de las mismas. Concentraciones menores de acetamiprid (100 a 1 mg i.a/L), causaron el 100% de mortalidad en larvas de segundo y cuarto estadio larval. La mortalidad de las larvas de cuarto estadio se produjo en las concentraciones de (20 a 100 mg i.a/L), los parámetros reproductivos se redujeron en concentraciones de 10 a 1 mg i.a/L. Se observaron efectos teratológicos (malformaciones y anormalidades) en todas las pupas tratadas y adultos emergentes.



El piretoride cipermetrina si bien resultó ser inocuo para los adultos, mostró una toxicidad elevada sobre los estados inmaduros, principalmente sobre los estadios larvales. En las concentraciones evaluadas (25 y 12,5 mg i.a./L) redujo la eclosión de huevos. En los estadios larvales L<sub>2</sub> y L<sub>4</sub>, redujo la supervivencia, la cual fue más drástica sobre el cuarto estadio larval. En los efectos a largo plazo prolongó el tiempo de desarrollo de los estadios larvales L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub> y el acumulado

(L2- pupa). En los ensayos con pupas redujo la supervivencia y afectó la fertilidad.



El mimético de la hormona juvenil, piriproxifén, no tuvo efectos ovicidas sobre el depredador. Sin embargo se observaron efectos a largo plazo en la supervivencia de larvas eclosionadas, alargamiento de la duración estadio de huevo y reducción del porcentaje de pupas formadas. Así mismo, se inhibió la emergencia de adultos a partir de huevos tratados. Sin embargo, no afectó la supervivencia sobre los estadios larvales ( $L_2$  y  $L_4$ ). En cuanto a efectos a largo plazo prolongó el tiempo de desarrollo de  $L_4$  y redujo la fertilidad y la fecundidad de hembras sobrevivientes. En los tratamientos con pupas produjo importantes efectos subletales, malformaciones y anormalidades, y los adultos normales emergidos no dejaron descendencia. Piriproxifén resultó ser inocuo para los adultos, teniendo en cuenta solo la supervivencia, afectó la capacidad reproductiva de las hembras (fecundidad y fertilidad), que redujo la eclosión entre un 30 y 60%.



El inhibidor de la síntesis de la quitina, teflubenzurón, tampoco produjo efectos ovicidas. Sobre larvas emergidas redujo la supervivencia del estadio  $L_2$  y redujo el tiempo de desarrollo de los estadios larvales y del total de los estados inmaduros. Por otro lado redujo la supervivencia y prolongó el tiempo de desarrollo en larvas de segundo estadio y los parámetros reproductivos se vieron afectados en los ensayos de exposición tópica sobre  $L_4$ . Sin embargo este

insecticida no produjo efectos secundarios sobre las pupas, y adultos reduciendo solamente la fertilidad de los adultos emergidos de pupas y de los adultos expuestos por vía ingestión.



El piriproxifén y teflubenzurón muestran una baja toxicidad hacia el depredador, resultando éstos los menos nocivos del grupo de productos estudiados. La baja toxicidad del piriproxifén y teflubenzurón para *E. connexa* permitiría su uso conjunto con el depredador en programas de MIP.



El acetamiprid es considerado un insecticida bioracional y ha sido incorporado como tal en los agroecosistemas de la región para reemplazar a los productos convencionales de amplio espectro como los organoclorados y organofosforados. Sin embargo, los resultados de los bioensayos muestran su alta toxicidad para *E. connexa*, incluso más tóxico que la cipermetrina que pertenece al grupo de los insecticidas convencionales. Por tanto su incorporación en programas de MIP debería ser cuestionada y considerado como no apto para MIP y más aún, ya particularmente en agroecosistemas en donde se pretenda conservar enemigos naturales como el depredador *E. connexa*.

\*Estudios de toxicidad en condiciones de semicampo y campo serían recomendables a futuro a fin de completar el perfil toxicológico de estos compuestos previo a la implementación de programas MIP.

\*La utilización de bioensayos en laboratorio como herramienta diagnóstico para evaluar los posibles efectos de los insecticidas sobre los insectos benéficos aporta información de base, la cual podrían ser incluidos en las evaluaciones de riesgo para el registro de los plaguicidas en Argentina.



**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

-Addinsoft. 2009. XLstat for Excel.

-Almeida-Sarmiento R., Pallini A., Venzon M., Fonseca de Souza O.F., Molina-Rugama A.J., Lima de Oliveira C. 2007. Functional Response of the predator *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) to different prey types. Brazilian Archives of Biology and Technology 50: 121-126.

-Bacci L Crespo A.L.B., Galvan T.L, Pereira E.J.G., Picanco M.C., Silva G.A. and Chediak M. (2007) Toxicity of insecticides to the sweetpotato whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) and its natural enemies. Pest Mangment Science 63: 699-706.

-Benamú M., Schneider, M.I and Sanchez, N. 2010. Effects of the herbicide glyphosate on biological attributes of *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae), in laboratory. Chemosphere 78: 871-876.

-Benamú, M. 2010: Composición y estructura de la comunidad de arañas en el sistema de cultivo de soja transgénica. Tesis Doctoral en Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). La Plata – Buenos Aires, Argentina. Pp.: 218

-Biddinger D.J., Weber D.C., Hull L.A. 2009. Coccinellidae as predators of mites: Stethorini in biological control. Biological Control 51: 268–283.

-Botto E. 1997. Control de plagas en cultivos protegidos en la Argentina. Posibilidades de su aplicación. Resúmenes VII Jornadas sobre cultivos protegidos. La Plata, 21-22 Nov. 1997.

-Botto E., Ceriani S., López S., Saini E., Cedola C., Segade G., Viscarret M. 1998. Control biológico de plagas hortícolas en ambientes protegidos. La experiencia hasta el presente. Revista de Investigaciones Agropecuarias (RIA) 29(1): 83-98.

- Bueno A.F. and. Freitas S. 2004. Effect of the insecticides abamectin and lufenuron on eggs and larvae of *Chrysoperla externa* under laboratory conditions. *BioControl* 49: 277–283.
- Busvine J. R. (1971). A critical review of the techniques for testing insecticides. CAB. London.
- Cáceres S., Gnoatto I.L., Ishikawa A. 1984. Dinámica Poblacional de insectos y ácaros en tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) para primicia producido bajo cobertura plástica y a campo. Soc. Arg. Oler. Resúmenes VII Reunión Nacional y I Internacional. San Pedro (Bs. As.). Set. 1984. p. 100.
- Cáceres S., Ishikawa A., Ramírez M.H., Lenscak M.P. 1995. Estimación de niveles de presencia de polilla del tomate *Scrobipalpus absoluta* (Meyrick). XIII Congreso Argentino de Horticultura. Las Termas de Río Hondo, Sgo. del Estero; 11-14 Sep., 1995. Resúmenes p. 95.
- Cáceres S. 2004. Moscas blancas del complejo *Bemisia tabaci* en cultivos hortícolas de Corrientes. Estrategias de manejo. En: Mosca blanca. Jornadas de actualización. 5 de Julio de 2004 INTA. 15 p.
- Cáceres S. 2005. Eficiente control biológico de la mosca blanca en Corrientes. Boletín INTA Informa N° 366.
- Campiche S., Becker-van Slooten K., Ridreau C., Tarradellas J. 2006. Effects of insect growth regulators on the nontarget soil arthropod *Folsomia candida* (Collembola) *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63: 216–225.
- CASAFE. 2009. Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes: Guía de productos fitosanitarios. Tomo 1. CASAFE. Buenos Aires. Argentina

- Cappello V.Y., Fortunato N. 2008. Dirección Provincial de Recursos Naturales, Programa de Gestión Ambiental en Agroecosistemas. Organismo Provincial para el Desarrollo Sustentable.
- CFHB (Censo flori-hortícola bonaerense).2005. Informe de avance del Censo Flori-hortícola de la Provincia de Buenos Aires. Ministerio de Asuntos Agrarios, Secretaria de Agricultura y Ganadería. [www.maa.gba.gov.ar](http://www.maa.gba.gov.ar)
- Chen, T.Y., Liu T.X. 2002. Susceptibility of immature stages of *Chrysoperla rufilabris* (Neurop., Chrysopidae) to pyriproxyfen, a juvenile hormone analog. *Journal of Applied Entomology* 126: 125-129.
- Chindah A.C., Sikoki F.D., Ijeoma V.A. 2004. Toxicity of an organophosphate pesticide (Chloropyrifos) on a common Niger delta wetland fish, *Tilapia guineensis* (Blecker 1862). *Journal of Applied Science and Environmental Management* 8(2): 11–17.
- Cieza R.I. 2004. Asesoramiento profesional y manejo de nuevas tecnologías en unidades de producción hortícolas del Gran La Plata. *Scientia Agraria* v5: 79-85.
- Cloyd R. and Dickinson A. 2006. Effect of Insecticides on Mealybug Destroyer (Coleoptera: Coccinellidae) and Parasitoid *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae), Natural Enemies of Citrus Mealybug (Homoptera: Pseudococcidae). *Journal of Economic Entomology*. 99(5): 1596-1604.
- Cloyd R. A. and James A Bethke J. A. (2011). Impact of neonicotinoid insecticides on natural enemies in greenhouse and interiorscape environments. *Pest Management Science* 67: 3–9.
- Cohen S. 1990. Epidemiology of whitefly-transmitted viruses. En: Gerling, D. (Ed.). *Whiteflies: their bionomics, pest status and management*. Intercept Ltd. Andover, UK, pp 211-225.

- Colamarino I., Curcio N., Ocampo F., del Torran C. 2006. La producción hortícola en la Argentina, SAGPyA, 2006.
- Cónsoli F.L., Parra J.R.P., Hassan S.A. 1998. Side-effects of insecticides used in tomato fields on the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym., Trichogrammatidae), a natural enemy of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep., Gelechiidae). Journal of Applied Entomology 122: 43-47.
- Cutler G.C., Scott-Dupree C.D., Tolman J.H. and Harris C.R. 2006. Toxicity of the insect growth regulator novaluron to the non-target predatory bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). Biological Control 38: 196–204.
- Darvas B., Polgar L.A. 1998. Novel type insecticides: specificity and effects on non-target organisms, pp. 188-259. En: I. Ishaaya y D. Degheele (Eds.). Insecticides with novel modes of action. Springer. Berlin.
- Delbeke F., Vercruyse P., Tirry L., deClercq P. and Degheele D. 1997. Toxicity of diflubenzuron, pyriproxyfen, imidacloprid and diafenthiuron to the predatory bug *Orius laevigatus* (Het.: Anthocoridae). Entomophaga 42:349–358.
- Delfino M.A. 1994. Descripción de dos nuevas especies de *Uroleucon* (Homoptera: Aphididae). Revista Chilena de Entomología 21: 31-40.
- Delfino M.A., Monelos H.L., Peri P.L., Buffa L.M. 2007. Áfidos (Hemiptera, Aphididae) de interés económico en la provincia de Santa Cruz. Revista de Investigaciones Agropecuarias (RIA) 36: 147-154.
- De Ruijter A, Vandersteen J. 1987. A field study on the effect on honeybee brood of insegar (fenoxycarb) applied on blooming apple orchards. Apidologie 18: 356-357.
- Desneux N., Decourtye A., Delpuech J.M. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. Annual Review of Entomology 52: 81-106.

- Desneux N., Wajnberg E., Wyckhuys K.A.G., Burgio G., Arpaia S., Narváez-Vasquez C.A., Gonzalez-Cabrera J., Catalán-Ruescas D., Tabone E., Frandon J., Pizzol J., Poncet C., Cabello T., Urbaneja A. 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of Pest Science* 83: 197-215.
- Devine G.J., Furlong M.J. 2007. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. *Agriculture and Humman Values* 24: 281-306.
- Darvas, B., and L.A. Polgar. 1998. Novel type insecticides: specificity and effects on non-target organisms. En: Ishaaya, I. and D. Degheele (editores). *Insecticides with novel modes of action*. Springer, Berlin. Pp. 188- 259.
- Dhadialla T.S., Carlson G.R., Le D.P. 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual of Review Entomology* 43: 545-569.
- Duarte Gómez W., Zenner de Polanía I. 2009. Tabla de vida del cucarrón depredador *Eriopis connexa connexa* (Germar). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 12 (2): 147-155.
- Elbert A., Nauen R., Leicht W. 1998. Imidacloprid, a novel chloronicotinyl insecticide: biological activity and agricultural importance. En: Ishaaya I., Degheele D. (Eds.). *Insecticides with novel modes of action: mechanism and application*. New York: Springer. pp 50–73.
- Elzen G W. (2001). Lethal and sublethal effects of insecticide residues on *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) and *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae). *Journal of Economic Entomology* 94:55–59.
- Environmental Protection Agency (EPA). [www.epa.org](http://www.epa.org)
- Estay, P. 2000. Polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick). <http://alerce.inia.cl/docs/Informativos/-informativo09.pdf>

- Etchegaray J., Barrios S. 1979. Ciclo de vida de *Eriopis connexa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Coccinellidae). Anales del Museo de Historia Natural de Valparaíso (Chile) 12: 185–194.
- Evans E.W. 2009. Lady beetles as predators of insects other than Hemiptera. Biological Control 51: 255-267.
- Federici B.A. 2007. Bacteria as biological control agents for insects: economics, engineering, and environmental safety, pp. 25-51. En: Gressel J., Vurro M. (Eds.). Novel Biotechnologies for Biocontrol Enhancement and Management. Springer, Dordrecht, Germany
- Ferkovich S.T., Venkatesan T., Shapiro J.P., Carpenter J.E. 2007. Presentation of artificial diet: effects of composition and size of prey and diet domes on egg production by *Orius insidiosus* (Heteroptera: Anthocoridae). Florida Entomologist 90(3): 502-508.
- Fogel M., Rimoldi F., Pineda S., Schneider M., Ronco A. 2009. Side Effects of teflubenzuron and chlorfenapyr in *Eriopis connexa* eggs (Coleoptera: Coccinellidae) Communication of Applied Biological Science 74(2): 419-424.
- Food and Agriculture Organization. 1975. Rep. FAO Panel of experts on integrated pest control, 5th, Oct. 15–25, 1974. Rome, Italy: FAO-UN, Meeting Rep. 1975/M/2. 41 pp
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2001. Crop Protection. <http://www.fao.org/ag/guides/subject/h.htm>.
- Gabarra R. 2002. Control Integrado de moscas blancas y pulgones en cultivos de invernadero. Phytoma España 135: 84-86.
- Galvan T. L., Koch R. L., Hutchison W. D. 2005. Toxicity of commonly used insecticides in sweet corn and soybean to multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). Journal of Economic Entomology 98(3): 780-789.

-Galvan T.L., Koch R.L., Hutchison W.D. 2005. Effects of spinosad and indoxacarb on survival, development, and reproduction of the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control* 34:108–114.

-Giolo F.P., Medina P., Grutzmacher A.D., Viñuela E. 2009. Effects of pesticides commonly used in peach orchards in Brazil on predatory lacewing *Chrysoperla carnea* under laboratory conditions. *BioControl* 54: 625-635.

-Giorgi J.A., Vandenberg N.J., McHugh J.V., Forrester J.A., Slipinski S.A., Miller K.B., Shapiro L.R., Michael F., Whiting M.F. 2009. The evolution of food preferences in Coccinellidae. *Biological Control* 51: 215–231.

-Grafton-Cardwell, E. E., and P. Gu. 2003. Conserving vedalia beetle, *Rodolia cardinalis* (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae), in citrus: a continuing challenge as new insecticides gain registration. *Journal of Economic Entomology* 96: 1388- 1398.

-Grundy P.R., Maelzer D., Collins P.J., and Hassan E.. 2000. Potential for integrating eleven agricultural insecticides with the predatory bug *Pristhesancus plagipennis* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Economic Entomology* 93(3): 584-589.

-Gyenge J., Edelstein J.E., Salto C.E. 1998. Ecología, comportamiento y bionomía. Efectos de la temperatura y la dieta en la biología de *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae). *Annual of Society of Entomology Brasil* 27(3) 345.

-Hassan S.A., Bigler F., Blaisinger H. 1985. Standard methods to test the side-effects of pesticides on natural enemies of insects and mites. *EPPA Bull.* 15: 214-255.

-Hassan S.A. 1994. Activities of the IOBC/WPRS working group Pesticides and beneficial organisms. *IOBC/ wprs Bull.* 17(10): 1-5.

-Hassan, S. A., B. Hafes, P. E. Degrande, and K. Herai. 1998. The side effects of pesticides on the egg parasitoid *Trichogramma caecoeciae* Marchal (Hym.,

Trichogrammatidae), acute dose-response and persistence tests. *Journal of Applied Entomology* 122: 569-573.

-Haynes K.F. 1988. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annual of Review Entomology* 33: 149-168.

-Hodek I., Honek A. 1996. *Ecology of Coccinellidae*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

-Hodek I., Honek A. 2009. Scale insects, mealybugs, whiteflies and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha) as prey of ladybirds. *Biological Control* 51: 232–243.

-Hodek, I. and Honěk, 2010. *Ecology of Coccinellidae*. Kluwer Academic Publisher (Eds). 458 pgs.

-Hoddle M. S., Van Driesche R. G., Lyon S. M., and Sanderson J. P. 2001. Compatibility of insect growth regulators with *Eretmocerus eremicus* (Hymenoptera: Aphelinidae) for whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) control on poinsettias. *Biological Control* 20, 122- 131.

-INDEC. [www.indec.mecon.gov.ar](http://www.indec.mecon.gov.ar)

-Ishaaya A., De Cock A. and Degheele D.1994. Pyriproxyfen, a potent suppressor of egg hatch and adult formation of the greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* 87 (5): 1185-1189.

-Ishaaya I., Barazani A., Kontsedalov S. and Horowitz A.R. (2007). Insecticides with novel modes of action: Mechanism, selectivity and cross-resistance. *Entomological Research* 37 148–152.

-James D.G. 2004. Effect of buprofezin on survival of immature stages of *Harmonia axyridis*, *Stethorus punctum picipes* (Coleoptera: Coccinellidae), *Orius tristicolor* (Hemiptera: Anthocoridae), and *Geocoris* spp. (Hemiptera: Geocoridae). *Journal of Economic Entomology* 97(3): 900-904.



-Kerting K., Van Wijngaarden R. 1992. Effects of chloropyrifos on a microecosystem. *Environmental Contamination and Toxicology* 11: 365-372.

-Kim D-S., Brooks D.J., Riedl H. 2006. Lethal and sublethal effects of abamectin, spinosad, methoxyfenozide and acetamiprid on the predaceous plant bug *Deraeocoris brevis* in the laboratory. *BioControl* 51: 465-484.

-Kogan M. 1998. Integrated pest management: Historical perspectives and contemporary developments. *Annual of Review Entomology* 43: 243-70.

-Kogan M., Jepson P. 2007. Perspectives in ecological theory and integrated pest management. Kogan M., Jepson P. (Eds.). Cambridge University Press, USA. 588 pp.

-Liu T-X., Chen T-Y. 2001. Effects of the insect growth regulator fenoxycarb on immature *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae). *Florida Entomologist* 84: 628-633.

-Liu T-X. and Stansly P. A. 2004. Lethal and sublethal effects of two insect growth regulators on adult *Delphastus catalinae* (Coleoptera: Coccinellidae), a predator of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). *Biological Control* 30: 298–305.

-López S.N., Evans G.A. 2008. Nuevos registros de especies del género *Eretmocerus* (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoide de *Trialeurodes vaporariorum* y el complejo *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) en Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 67: 185-187.

-Lorca Gonzalez R.M. 2005. Toxicidad de insecticidas sobre *Eriopsis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae). Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Escuela de Agronomía. Memoria de título, Santiago, Chile.

-Lucas E., Giroux S., Demougeo S., Duchesne R.-M. and Coderre D. 2004. Compatibility of a natural enemy, *Coleomegilla maculata lengi* (Col., Coccinellidae)

and four insecticides used against the Colorado potato beetle (Col., Chrysomelidae). Journal of Applied Entomology 128, 233–239.

-Luna M.G., Sánchez N.E., Pereyra P.C. 2007. Parasitism of *Tuta absoluta* (Lepidoptera, Gelechiidae) by *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera, Braconidae) under laboratory conditions. Environmental Entomology 36(4): 887-893.

-Mahdian K., Van Leeuwen T., Tirry L., De Clercq P. 2007. Susceptibility of the predatory stinkbug *Picromerus bidens* to selected insecticides. BioControl 52: 765-774.

-Martos A., Niemeyer H.M. 1990. Dos estudios sobre crianza masal del coccinélido *Eriopis connexa* Germar. Revista Peruana de Entomología 32: 50-52.

-Mathews G.A. 1984. What is a pest?. Pest management. Longman Group Limited. Burnt Mill, Harlow, UK. 1-3.

-Medina P., Smaghe G., Budia F., Tirry L., Viñuela E. 2003. Toxicity and absorption of azadirachtin, diflubenzuron, pyriproxyfen, and tebufenozide after topical application in predatory larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). Environmental Entomology 32(1): 196-203.

-Medina P., Morales J.J., Budia F., Adan A., Del Estal P., Viñuela E. 2007. Compatibility of endoparasitoid *Hyposoter didymator* (Hymenoptera: Ichneumonidae) protected stages with five selected insecticides. Journal of Economic Entomology 100(6): 1789-1796.

-Mendel Z., Blumberg D., Ishaaya I. 1994. Effects of some insect growth regulators on natural enemies of scale insects (Hom.: Coccoidea). Entomophaga 39 (2): 199-209.

-Mestdagh I., de Clercq P., Degheele D. 1996. Susceptibility of the predatory bug *Podisus maculiventris* Say (Heteroptera: Pentatomidae) to pyriproxyfen residues on sweet pepper plants. Parasitica 52 (4): 153-161.

- Michaud, J. P. 2002. Relative toxicity of six insecticides to *Cycloneda sanguinea* and *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Entomological Science* 37: 83-93.
- Michaud J. P., and Grant A. K. 2003. Sub-lethal effects of a copper sulfate fungicide on development and reproduction in three coccinellid species. *Journal Insect Science* 3: 1-6.
- Michel B. 1992. Information sur quelques Coccinellidae (Coleoptera) du Paraguay. *Cot. Fibr. Trop.* 47: 301-304.
- Michels G.L.Jr., Flanders R.V, Bible J.B. 1997. Overwintering survival of seven imported coccinellids in the Texas high plains. *Southwestern-Entomologist* 22: 157-166.
- Miller J.C. 1995. A comparison of techniques for laboratory propagation of a South American ladybeetle, *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological control: Theory and Applications in pest management* 5(3): 462-465.
- Mohaghegh, J., De Clercq, P., Tirry, L., 2000. Toxicity of selected insecticides to the spined soldier bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 10, 33-44.
- Mommaerts V., Reynders S., Boulet J., Besard L., Sterk G., Smagghe G. 2010. Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. *Ecotoxicology* 19: 207-210.
- Montes F. 1970. Biología y morfología de *Eriopis connexa* Germar, 1824 y *Adalia bipunctata* Linnaeus, 1758 (Coleoptera). *Publicaciones del Centro de Estudios Entomológicos, Universidad de Chile* 10: 43-56.
- Moser S.E., Obrycki J.J. 2009. Non-target effects of neonicotinoid seed treatments; mortality of coccinellid larvae related to zoophytophagy. *Biological Control* 51: 487-492.

- Moura A.P., Carvalho G.A., Pereira A.E., Rocha L.C.D. 2006. Selectivity evaluation of insecticides used to control tomato pests to *Trichogramma pretiosum*. *BioControl* 51: 769-778.
- Naranjo S.E. and H Akey D.H. 2005. Conservation of natural enemies in cotton: comparative selectivity of acetamiprid in the management of *Bemisia tabaci*. *Pest Management Science* 61:555–566.
- Nation J.L. 2008. Reproduction. En: Nation J.L (Ed.). *Insect physiology and biochemistry*. CRC Publisher. New York, USA. 497-498.
- Nieto Nafriá J.M., Delfino M.A., Mier Durante M.P. 1994. La afidofauna de la Argentina: su conocimiento en 1992. Universidad de León, León, España. 235 pp.
- Obrycki J.J., Kring T.J. 1998. Predaceous Coccinellidae in biological control. *Annual of Review Entomology* 43: 295-321.
- Obrycki J.J., Harwood J.D., Kring T.J., O’Neil R.J. 2009. Aphidophagy by Coccinellidae: application of biological control in agroecosystems. *Biological Control* 51: 244-254.
- Oliveira N.C, Wilcken C.F., de Matos C.A. 2004. Ciclo biológico e predação de três espécies de coccinelídeos (Coleoptera, Coccinellidae) sobre o pulgão-gigante-do-pinus *Cinara atlantica* (Wilson) (Hemiptera, Aphididae). *Revista Brasileira de Entomologia* 2: 185-187.
- Papachristos D., Milonas P. (2008). Adverse effects of soil applied insecticides on the predatory coccinellid *Hippodamia undecimnotata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control* 47: 77–81.
- Pineda S., Budia F., Schneider M., Gobbi A., Viñuela V., Valle J., Del Estal P. 2004. Effects of Two Biorational insecticides: spinosad and methoxyfenozide on cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. *Journal of Economic Entomology*. 97, 1906–1911

-Polack L.A. 2005. Manejo Integrado de Moscas Blancas. Boletín Hortícola Año 10, 31: 23-30.

-Polack L.A. 2008. Interacciones tritróficas involucradas en el control de plagas de cultivos hortícolas. Tesis Doctoral, FCNyM, UNLP. 172 pp.

-Quiroga D., Arretz P., Araya J.E. 1991. Sucking insects damaging jojoba, *Simmondsia chinensis* (Link) Shneider, and their natural enemies, in the North Central and Central Regions of Chile. Crop Protection 10: 469-472.

-Rill S.M., Grafton-Cardwell E.E., Morse J.G. 2008. Effects of two insect growth regulators and a neonicotinoid on various life stages of *Aphytis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae). BioControl 53: 579-587.

-Rimoldi F., Schneider M.I., Ronco A.E. 2008. Susceptibility of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) to conventional and biorational insecticides. Environmental Entomology 37: 1252-1257

-Rimoldi F. 2009. Evaluación ecotoxicológica de pesticidas usados en el paquete tecnológico Soja RR, sobre el sistema *Rachiplusia nu-Chrysoperla externa*. Tesis doctoral de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.

-Romanelli G.P., Virla E.G., Duchowicz P.R., Gaddi A.L., Ruiz D.M, Bennardi D.O., del V. Ortiz E., Autino J.C. 2010. Sustainable synthesis of flavonoid derivatives, QSAR, study and insecticidal activity against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae). Journal of Agriculture and Food Chemistry 58: 6290-6295.

-Ruiz-Sánchez E., Caamal-Eb L., Cristóbal-Alejo J., Munguía-Rosales R., Pérez-Gutiérrez A. 2010. Survivorship and development of immature *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) exposed to diflubenzuron Agrociencia 44: 373-379.

- Saber M., Hejazi M.J., Kamali K., Moharramipour S. 2005. Lethal and sublethal effects of fenitrothion and deltamethrin residues on the egg parasitoid *Trissolcus grandis* (Hymenoptera: Scelionidae). *Journal of Economic Entomology* 98(1): 35-40.
- SAGPyA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. 2006. <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/00/agricultura/otros/hortalizas/produccion/hortalizas>.
- Sarandon S. 2002. Agroecología. El camino hacia una agricultura sustentable. (Ed). Sarandon, S. Ediciones Científicas Americanas. 557 pp.
- Schneider M.I., Smagghe G., Viñuela E. 2003a. Susceptibility of *Hyposoter didymator* (Hymenoptera: Ichneumonidae) adults to several IGRs pesticides and spinosad by different exposure methods. *IOBC/wprs Bull.* 26(5):111-122.
- Schneider M.I., Smagghe G., Gobbi A., Viñuela E. 2003b. Toxicity and pharmacokinetics of seven novel insecticides on pupae of *Hyposoter didymator* (Hymenoptera: Ichneumonidae), a parasitoid of early larval instars of lepidopteran pests. *Journal of Economic Entomology* 96(4): 1054-1065.
- Schneider M.I., Smagghe G., Pineda S., Viñuela E. 2004a. Action of insect growth regulator insecticides and spinosad on life history parameters and absorption in third instar larvae of the endoparasitoid *Hyposoter didymator*. *Biological Control* 31 (2): 189-198.
- Schneider M.I., Smagghe G., Viñuela, E. 2004b. Comparative effects of several insect growth regulators and spinosad on the different developmental stages of the endoparasitoid *Hyposoter didymator* (Thunberg) *IOBC/wprs Bull.* 27 (6): 13-20.
- Schneider M.I., Guy Smagghe G., Pineda S., Viñuela E. 2008. The ecological impact of four IGR insecticides in adults of *Hyposoter didymator* (Hym., Ichneumonidae): pharmacokinetics approach. *Ecotoxicology* 17: 181-188.

- Schneider M.I., Sanchez N., Pineda S., Chi H., Ronco A. 2009. Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). *Ecological Approach Chemosphere* 76: 1451-1455.
- Scorsetti A.C., Humber R.A., García J.J., López Lastra C.C. 2007. Natural occurrence of entomopathogenic fungi (Zygomycetes: Entomophthorales) of aphid (Hemiptera: Aphididae) pests of horticultural crops in Argentina. *BioControl* 52 (5): 641-655.
- Scorsetti A.C., Humber R.A., De Gregorio C., López Lastra, C.C. 2008. New records of entomopathogenic fungi (Ascomycota: Hypocreales) infecting *Bemisia tabaci* (Gennadius) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae), pest of horticultural crops in Argentina. *BioControl* 53: 787-796.
- Silva R. 2009. Viabilidade de dietas artificiais e presas para *Eriopsis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae). Tesis de maestria, Universidad Federal de Vicosa, Minas Gerais, Brasil.
- Spiro T.G., Stigliani W.M. 2004. Química medioambiental. Segunda edición. Pearson Educación S.A. (editorial). Madrid, España. 619 pp.
- Stark J. D., Banks J. E. and Acheamponga S. 2004. Estimating susceptibility of biological control agents to pesticides: influence of life history strategies and population structure. *Biological Control* 29: 392-398.
- Stark J.D., Vargas R., Banks J.E. 2007. Incorporating ecologically relevant measures of pesticide effect for estimating the compatibility of pesticides and biocontrol agents. *Journal of Economic Entomology* 100(4): 1027-1032.
- Sugiyama K., Saito T., Katayama H. 2011. Effect of insecticides on the mortalities of three whitefly parasitoid species, *Eretmocerus mundus*, *Eretmocerus eremicus* and *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Applied Entomology and Zoology* 46: 311-317.

- Sullivan J.J., Goh K.S. 2008. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. *Journal of Pesticide Science* 33(4): 339-350. DOI: 10.1584/jpestics.R08-02
- Suma P., Zappala L., Mazzeo G., Siscaro G. 2009. Lethal and sub-lethal effects of insecticides on natural enemies of citrus scale pests. *BioControl* 54: 651-661.
- Stara J., Ourednickova J., Kocourek F. 2010. Laboratory evaluation of the side effects of insecticides on *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphidiidae), *Aphidoletes aphidimyza* (Diptera: Cecidomyiidae), and *Neoseiulus cucumeris* (Acari: Phytoseidae). *Journal Pesticide Science* 1: 25-31.
- Stark, J.D., Banks, J.E., 2003. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annual Review of Entomology* 48, 505–519.
- Stuebaker G.E., Kring T.J. 2003. Effects of insecticides on *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae), measured by field, greenhouse and petri dish bioassays. *Florida Entomologist* 86: 178-185.
- Symondson W.O., Sunderland K.D., Greenstone M.H. 2002. Can generalist predators be effective biocontrol agents?. *Annual of Review Entomology* 47: 561-594.
- Tillman, P. G., and J. E. Mulrooney. 2000. Effect of selected insecticides on the natural enemies *Coleomegilla maculata* and *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae), *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae) and *Bracon mellitor*, *Cardiochiles nigreps*, and *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae) in cotton. *Journal of Economic Entomology* 93: 1638-1643.
- Tripplehorn C.A., Johnson N.F. 2005. Borror and DeLong's. *Introduction to the Study of Insects*. Thomson Brooks/Cole, Belmont, California, USA.
- Toledo A.V., Scorsetti A.C., Dikgolz V.E., López Lastra C.C. 2004. *Paecilomyces fumosoroseus* y *Nomuraea rileyi* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) hongos patógenos de insectos plaga de la agricultura en la Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 39 (1-2): 21-26.



- Tomizawa M., Otsuka H., Miyamoto T., Yamamoto I. 1995. Pharmacological effects of imidacloprid and its related compounds on the nicotinic acetylcholine receptor with its ion channel from the Torpedo electric organ. *Journal of Pesticide Science* 20: 49-56.
- Tomizawa M. and Casida J.E. 2005. Neonicotinoid Insecticide Toxicology: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review Pharmacology and Toxicology* 45:247-68
- Van de Veire M, Tirry L (2003) Side effects of pesticides on four species of beneficial used in IPM in glasshouse vegetables crops: “worst case” laboratory tests. *IOBC/WPRS Bull* 26(5):41-50
- Van Driesche R.G., Hoddle M.S., Center T.D. 2007. Control de Plagas y Malezas por Enemigos Naturales. USDA Eds. 751 pp.
- Van Lenteren J.C., Woetts J. 1998. Biological and integrated pest control in greenhouses. *Annual of Review Entomology* 33: 239-269.
- Viñuela E., Medina M.P., Schneider M.I, Gonzalez M., Budia F., Adán A., Del Estal P. 2001. Comparison of side-effects of spinosad, tebufenozide and azadirachtin on predators *Chrysoperla carnea* and *Podisus maculiventris* and the parasitoids *Opius concolor* and *Hyposoter didymator* under laboratory conditions. *IOBC WPRS Bull.* 24: 25-34.
- Viscarret M.M., Botto E. 1997. Descripción e identificación de *Trialeurodes vaporariorum* (Westowd) y *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). *Revista Chilena de Entomología* 23: 51-58.
- Viscarret M. 2000. Estudios biológicos sobre Aleyrodidae (Insecta: Hemiptera) con especial énfasis en el complejo *Bemisia tabaci* y su posible control biológico. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. U.B.A.

- Viscarret M., López S.N., Botto E.N. 2001. Estudios fitotóxicos y de tablas de vida y fecundidad sobre el biotipo ARG1 del complejo *B. tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). Revista de la Sociedad Entomológica Argentina 60(1-4): 167-176.
- Vogelezang-Stoute, E. 2003. The Authorisation of Pesticides in the Light of Sustainability .In: PESTICIDES: Problems, Improvements, Alternatives, Frank den Hond , Peter Groenewegen, Nico M. van Straalen (Eds), pgs 31-52. Editors.Blackwell Den Hong, F.; Groenewegen,
- Ware G.W. 1983. Pesticide. Theory and Application. Freeman and company (Eds). San Francisco, USA. 308 pp.
- Weber D.C., Lundgren J.G. 2009. Assessing the trophic ecology of the Coccinellidae: their roles as predators and as prey. Biological Control 51: 199-214.
- Youn Y.N., Seo M.J., Shin J.G., Jang C., Yub Y.M. 2003. Toxicity of greenhouse pesticides to multicolored Asian lady beetles, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). Biological Control 28: 164-170.
- Zanuncio T. V., Serrao E. J., Zanuncio J. C., Guedesa R. N. C. 2003. Permethrin-induced hormesis on the predator *Supputius cincticeps* (Stal, 1860) (Heteroptera: Pentatomidae). Crop Protection 22 (2003) 941–947.
- Zar J.H. 1996. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, New Jersey.