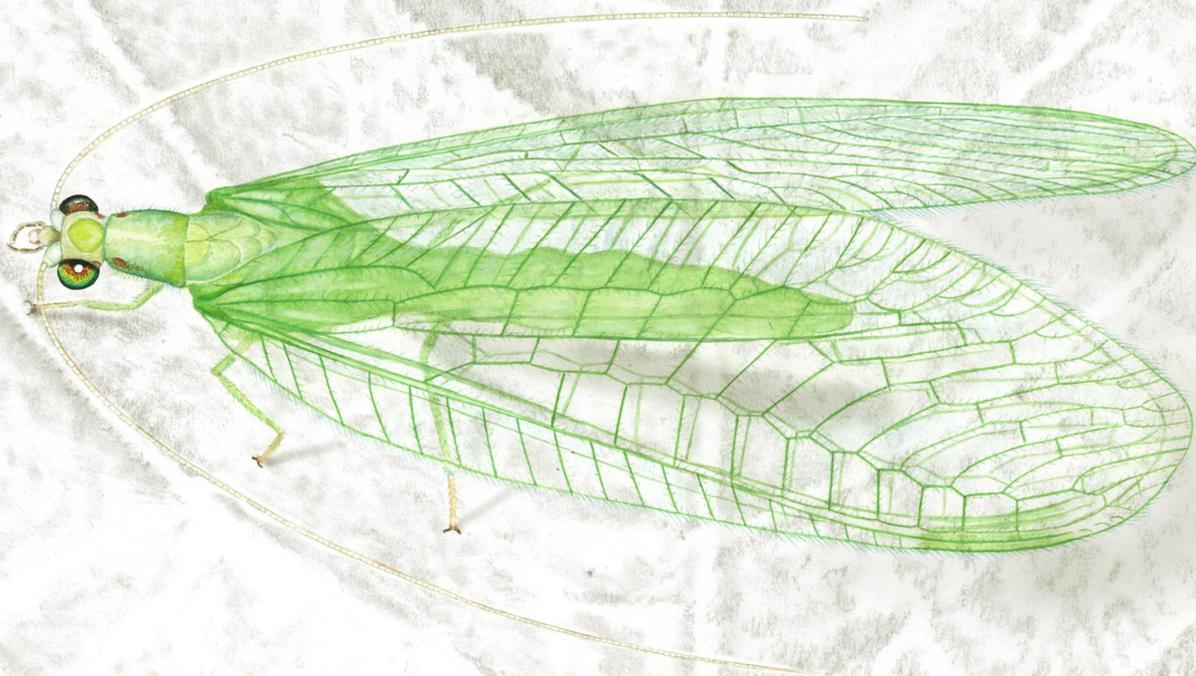




Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

**Evaluación de la tolerancia y susceptibilidad a
insecticidas convencionales y biorracionales en
Chrysoperla externa y *C. asoralis* (Neuroptera: Chrysopidae)**

Lic. Marina Haramboure



Director

Dra. Marcela Inés Schneider

Co-director

Dr. Raúl Adolfo Alzogaray

2016

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis no hubiera sido posible sin el apoyo y las becas recibidas por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas [CONICET] del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MINCyT). Agradezco también la adjudicación de la beca de Doctorado "Sandwich" Eurotango II (Erasmus Mundus Action II) por posibilitarme la realización de una estancia en la Universidad de Gante, Bélgica, bajo la dirección del Dr. Guy Smagghe.

A mis directores, Marcela Inés Schneider y Raúl Adolfo Alzogaray, por haber aceptado dirigir mi trabajo de tesis.

Al Dr. Guy Smagghe, director de Bélgica, por mostrarme de que se trata la Ciencia y enseñarme otra manera de trabajar.

A los productores Marcelo Maita, Mariana del Pino y los integrantes de "Colectivo Orgánico" por la buena predisposición los días de muestreo.

A la gente del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores, directora y vicedirectora, profesores, investigadores, personal de apoyo, compañeros becarios y pasantes. En especial a mis compañeras Luciana Mirande, Emilia Pérez, María Noel Ferraris, Cecilia Gabellone, Natalia Francesena, por tantas cosas compartidas, buenas y también malas, pero compartidas al fin. Mi más especial agradecimiento a Luciana, no solo por su amistad sino también por su compañerismo y por haber estado noches en vela trabajando conmigo en los últimos días de escritura. Y a Emilia, no sólo por su amistad sino por su gran sinceridad y apoyo. Al grupo de amigos que en corto tiempo me demostraron que se puede contar con ellos, ya sea para escucharme, ayudarme con una tabla de Word!, o lo que sea, sé que puedo contar con ellos y agradezco haber conectado con ustedes: Marianita Pascua, Mariángeles Alonso, Nadia Salas, Estefanía Rizo, Consuelo Vallina, Franco D'Auro, Augusto Salas, Matías Rusconi, Bruno Fusaro.

Quiero expresar mi gratitud a Santiago Plischuk, Carlos Lange, Claudia López Lastra, Juan García, Emilio Topa, Poppy Estivariz, Guillermo Reboledo, Aníbal Suriano, Gastón Cavallo, Jorge Barneche, por haberme apoyado, escuchado, aconsejado y haberme hecho sentir que no estaba sola. A Guillermo Reboledo por los viajes a los campos y las medialunas a la vuelta. A Pilar Alda y Nicolás Bonel, por haber compartido conmigo sus historias y brindarme consejos valiosos. Un muy especial agradecimiento a Hernán Pereira, por haberme ayudado en la "defensa cerrada" y que todo haya salido bien, por quedarse por si algo en la conexión salía mal, y por tener siempre la solución!

A mis compañeros y amigos multiculturales de Bélgica, con los cuales viví mis momentos más felices y de los que también aprendí muchísimo.

Y por último y no menos importante, a mis padres porque sin ellos no sería la persona que soy hoy, no tendría los valores que tengo y porque siempre me alentaron en mis avances en la carrera. Gracias.

Contenidos	Páginas
Resumen	IV
Abstract	VII
Capítulo I: Introducción General	1
<i>I.1. Plagas agrícolas y uso de plaguicidas</i>	2
<i>I.1.1. Problemas asociados al uso de plaguicidas</i>	2
<i>I.2. Plaguicidas convencionales</i>	3
<i>I.2.1. Uso de plaguicidas convencionales en Argentina</i>	4
<i>I.3. El Manejo Integrado de Plagas</i>	6
<i>I.3.1. Insecticidas biorracionales</i>	7
<i>i. Insecticidas reguladores del crecimiento de los insectos (IGR)</i>	7
<i>ii. Plaguicidas botánicos</i>	8
<i>ii. Neonicotinoides</i>	9
<i>I.4. Resistencia, tolerancia, susceptibilidad</i>	10
<i>i. Resistencia a piretroides</i>	12
<i>I.5. Control biológico</i>	12
<i>I.5.1. Enemigos Naturales</i>	15
<i>I.5.2. Neurópteros</i>	16
<i>I.5.2.1. Crisópidos de Argentina</i>	18
<i>I.6. Objetivo general</i>	23
<i>I.6.1. Objetivos específicos</i>	23
<i>I.7. Objetivo general</i>	23
Capítulo II: Materiales y métodos generales	25
<i>II.1. Recolección de organismos a campo</i>	26
<i>II.1.2.i. Colonias de crisópidos: colectas y cría de organismos en laboratorio</i>	27
<i>II.1.2.ii. Cría y mantenimiento del pulgón de los cereales <i>Ropalosiphum padi</i></i>	28
<i>II.1.2.iii. Condiciones de cría de insectos y bioensayos</i>	28
<i>II.2. Diseño experimental</i>	29
<i>II.3. Análisis estadísticos</i>	30
Capítulo III: Estudio de las especies de <i>Chrysoperla Steinmann (1964)</i> presentes en el Cinturón Hortícola Platense	32
<i>III.1. Introducción</i>	33
<i>III.2. Materiales y métodos</i>	35
<i>III.2.1. Colecta de especies en el CHP</i>	35
<i>III.2.2. Identificación taxonómica de ejemplares de <i>Chrysopidae</i></i>	35
<i>III.3. Resultados</i>	36
<i>III.4. Discusión</i>	38
Capítulo IV: Toxicidad de insecticidas en poblaciones de campo y laboratorio de <i>Chrysoperla externa (Neuroptera: Chrysopidae)</i>	39
<i>IV.1. Introducción</i>	40
<i>IV.2. Materiales y métodos</i>	41
<i>IV.2.1. Insectos</i>	41
<i>IV.2.2. Insecticidas, preparación de soluciones</i>	41
<i>IV.2.3. Ensayos de toxicidad sobre larvas del tercer estadio</i>	42
<i>IV.2.4. Análisis estadístico</i>	42
<i>IV.3. Resultados</i>	43

IV.3.1. Cipermetrina	43
IV.3.1.1. Mortalidad larval	43
IV.3.1.2. Mortalidad pupal	43
IV.3.1.3. Período intermuda tercer estadio larval – estado pupal	45
IV.3.1.4. Período intermuda estado pupal – estado adulto	46
IV.3.1.5. Parámetros reproductivos	47
IV.3.2. Acetamiprid	48
IV.3.2.1. Mortalidad larval	48
IV.3.2.2. Mortalidad pupal	49
IV.3.2.3. Período intermuda tercer estadio larval – estado pupal	50
IV.3.2.4. Parámetros reproductivos	51
IV.3.3. Azadiractina	51
IV.3.3.1. Mortalidad larval	51
IV.3.3.2. Mortalidad pupal	53
IV.3.3.3. Período intermuda tercer estadio larval – estado pupal	53
IV.3.3.4. Parámetros reproductivos	54
IV.4. Discusión	54
Capítulo V: Evaluación de tolerancia de <i>Chrysoperla externa</i> a insecticidas piretroides	58
V.1. Introducción	59
V.2. Materiales y Métodos	61
V.2.1. Colonias de <i>C. externa</i>	61
V.2.2. Reactivos	62
V.2.3. Toxicidad de zeta-cipermetrina en larvas del tercer estadio de <i>C. externa</i>	63
V.2.4. Cromatografía gaseosa	63
V.2.5. Actividad enzimática	64
V.2.6. Secuencia parcial de ADN complementario (ADNc)	65
V.2.7. Análisis estadísticos	67
V.3. Resultados	68
V.3.1. Toxicidad de zeta-cipermetrina en larvas de tercer estadio de <i>Chrysoperla externa</i>	68
V.3.2. Cromatografía gaseosa	69
V.3.3. Actividad enzimática	70
V.3.4. Secuencia parcial de ADNc	71
V.4. Discusión	74
Capítulo VI: Estudios comparativos de la toxicidad de insecticidas entre larvas y pupas de <i>Chrysoperla asoralis</i> y <i>C. externa</i> (Neuroptera: Chrysopidae)	78
VI.1. Introducción	79
VI.2. Materiales y métodos	80
VI.2.1. Insectos	80
VI.2.2. Insecticidas, preparación de soluciones	80
VI.2.3. Evaluación de toxicidad sobre el tercer estadio larval	81
VI.2.4. Evaluación de toxicidad sobre el estado pupal	81
VI.2.5. Análisis estadísticos	82
VI.3. Resultados	82

<i>VI.3.1. Evaluación de toxicidad sobre el tercer estadio larval</i>	82
<i>VI.3.1.2. Mortalidad</i>	82
<i>VI.3.1.3. Tiempo de desarrollo intermuda tercer estadio larval – pupa</i>	84
<i>VI.3.1.4. Tiempo de desarrollo intermuda pupa – adulto</i>	85
<i>VI.3.1.5. Período preoviposición</i>	86
<i>VI.3.1.6. Fecundidad y fertilidad</i>	87
<i>VI.3.2. Evaluación de toxicidad sobre el estado pupal</i>	89
<i>VI.3.2.1. Mortalidad</i>	89
<i>VI.3.2.2. Tiempo de desarrollo intermuda pupa - adulto</i>	89
<i>VI.3.2.3. Período preoviposición</i>	90
<i>VI.3.2.4. Fecundidad y fertilidad</i>	91
<i>VI.3.3. Comparación de susceptibilidad entre estados de desarrollo tratados</i>	93
<i>VI.4. Discusión</i>	94
Capítulo VII: Conclusiones	97
<i>Referencias</i>	100

RESUMEN

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) es un sistema de toma de decisiones para la selección de estrategias de manera armoniosa para el control de artrópodos fitófagos. Este manejo se basa en el análisis del costo/beneficio, teniendo en cuenta los intereses y el impacto en los productores, la sociedad y el medio ambiente. Entre las diferentes estrategias implementadas por el MIP, se encuentran: el control cultural (métodos mecánicos de labranza, manejo de suelos, rotación de cultivos, etc.), el control fitogenético (uso de cultivos resistentes a plagas y mejoramiento genético), el control etológico (control autocida, uso de feromonas sexuales, repelentes, etc.), el control químico y el control biológico. El control biológico es una estrategia de control de plagas en la que se utilizan poblaciones de organismos (enemigos naturales) para reducir la densidad poblacional del artrópodo fitófago, por debajo del Nivel de Daño Económico, ya sea temporal o permanentemente. Esta medida de control se basa en las relaciones existentes entre diferentes especies en los agroecosistemas (relación depredador-presa y hospedador-parasitoide, hospedador-entomopatógeno). El género *Chrysoperla* Steinmann (Neuróptera: Chrysopidae) es el más importante dentro de los neurópteros, por el uso de estos especímenes como agentes de control biológico en programas de MIP. *Chrysoperla carnea* Stephens, ampliamente distribuida en la zona Holártica, es la especie más comercializada como agente de control biológico, de esta familia.

En Argentina, se han registrado cuatro especies del género *Chrysoperla*: *C. externa* Hagen, *C. asoralis* Banks, *C. argentina* González Olazo & Reguilón y *C. defreitasi* Brooks. En el presente trabajo, se amplió la distribución de las especies *C. argentina* y *C. asoralis* en el país, citándolas por primera vez en el Cinturón Hortícola Platense (CHP), provincia de Buenos Aires, y en asociación con el cultivo de pimiento. Ensayos de insecticidas sobre *C. asoralis* y *C. externa*, permitieron observar una mayor susceptibilidad a insecticidas en la primera.

Existen reportes que demuestran que *C. externa* presenta una alta adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales, alto potencial reproductivo, eficiente capacidad de búsqueda de la presa y está asociada a varios cultivos agrícolas. Las larvas de esta especie son enemigos naturales efectivos de áfidos, mosca blanca, trips, ácaros y lepidópteros. Estas características hacen de *C. externa* un buen candidato para control biológico en nuestro país. Durante los últimos años, ha sido promovida su cría masiva y consecuente liberación en campo, en varios países de Sudamérica. Estudios previos han demostrado su tolerancia a insecticidas, por lo que podría ser usada exitosamente en programas en los que se requieran compatibilidad al control químico y el biológico.

El control de plagas en Argentina se basa principalmente en el uso de plaguicidas de amplio espectro, principalmente organofosforados, carbamatos y piretroides. El uso extensivo, y muchas veces el desconocimiento y/o el uso irresponsable de estos plaguicidas, ha llevado al surgimiento de resistencia en muchas poblaciones de plagas. Como consecuencia, ocurren fallas de control, que a su vez conducen a malas prácticas, como el aumento de las dosis o de la frecuencia de las aplicaciones. La resistencia a plaguicidas por parte de las plagas ha sido estudiada extensamente por su importancia en términos económicos, ya que reduce la efectividad de control de un tratamiento químico. Otra consecuencia de estas actividades son los efectos negativos sobre las poblaciones de enemigos naturales. Pero también es sabido que los enemigos naturales pueden desarrollar resistencia, lo cual significaría una oportunidad para integrar el control biológico y químico en agroecosistemas donde las plagas deben controlarse indefectiblemente con este tipo de insecticidas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad, resistencia y tolerancia a diferentes insecticidas, de *C. externa* y *C. asoralis*, presentes en el CHP. Se hizo énfasis en el estudio de los mecanismos de resistencia a piretroides en *C. externa*. También se estudió la presencia de especímenes en el área de diferentes especies de *Chrysoperla* spp.

Los ensayos sobre las especies de crisópidos consistieron en la aplicación tópica de insecticidas, considerando los estados larva y pupa. Se prepararon soluciones basándose en las Máximas Concentraciones Recomendadas de Campo (MCRC) de cada insecticida, y luego se obtuvieron diluciones de las mismas. Los insecticidas utilizados fueron cipermetrina, acetamiprid, piriproxifén y azadiractina.

Cuando se evaluaron dos colonias de *C. externa*, una de campos tratados con insecticidas de amplio espectro y otra de laboratorio, ambas colonias mostraron la misma susceptibilidad a los insecticidas y una muy baja mortalidad con cipermetrina. La especie *C. externa* presentó, en este trabajo de tesis una tolerancia natural al insecticida cipermetrina, probablemente por una mayor acción detoxificante por parte de enzimas P450 y esterasas. Esta tolerancia propia de la especie, hace que incluso individuos de laboratorio sin exposición a insecticidas, puedan sobrevivir a aplicaciones de piretroides. Larvas del tercer estadio de la especie *C. asoralis* resultaron más susceptibles a cipermetrina y acetamiprid en comparación con *C. externa*, sin que haya un efecto negativo con piriproxifén en ninguna de las dos especies. Por otro lado, aplicaciones de los mismos insecticidas sobre pupas, demostraron que este estado es tolerante a aplicaciones tópicas comparado con estadios larvales.

La tolerancia demostrada por *C. externa* es de suma importancia en programas de cría masiva de este depredador, ya que al momento de la liberación en campo, los individuos serían capaces de sobrevivir a aplicaciones y/o presencia de residuos de insecticidas, sin haber sido expuestas a los mismos durante su cría. Puede ser utilizado tanto en programas de MIP, como en agroecosistemas donde el uso de insecticidas neurotóxicos es aún necesario.

ABSTRACT

Integrated Pest Management (IPM) is a decision-making system for selecting harmonious strategies for the control of phytophagous pests. This management is based on the analysis of cost/benefit, taking into account the interests and the impact on farmers, society and the environment. Among different strategies implemented by IPM there are: cultural control (mechanical tillage methods, soil management, crop rotation, etc.), plant genetic controls (use of pest-resistant crops and breeding), ethological control (autocidal control, sex pheromones, repellents, etc.), chemical control and biological control. Biological Control is a strategy of prey control which utilizes populations of natural enemies to reduce the population density of the phytophagous arthropod, below the Economic Injury Level. This could be temporally or permanently. This control is based on the relationships between different species in agroecosystems (predator-prey relationship and entomopathogen guest-host-parasitoid).

The genus *Chrysoperla* Steinmann (Neuroptera: Chrysopidae) is of economical importance and it is used as a biological control agent in IPM programs. *Chrysoperla carnea* Stephens, widely distributed in the Holarctic region, is the most commercialized species as biological control agent of this family. In Argentina, there are four species of *Chrysoperla* reported: *C. externa* Hagen, *C. asoralis* Banks, *C. argentina* González Olazo & Reguilón, and *C. defreitasi* Brooks. In this research, the geographical distribution of the species *C. argentina* and *C. asoralis*, has been expanded, for this country, being cited for the first time in the Horticultural Belt of La Plata, Buenos Aires, and in association with sweet pepper crops. Trials of the effect of insecticides on the species *C. asoralis* and *C. externa*, were done to assess the susceptibility.

The species *C. externa* presents a high adaptability to different environmental conditions, high reproductive potential, efficient search capability, and it is associated with various agricultural crops. The larval stage is an effective natural enemy of aphids, whiteflies, thrips, mites, and moths. These characteristics make *C. externa* a good

candidate for biological control. In recent years, it has been promoted the mass rearing and subsequent release in the field of this species, in several South American countries. Previous studies have shown tolerance to insecticides in this species, thus it could be combined in programs in which both, chemical and biological controls are required.

Pest control in Argentina is mainly based on the use of broad-spectrum pesticides, especially organophosphates, carbamates and pyrethroids. Extensive use and often disregard and/or irresponsible use of these pesticides, has led to the emergence of resistance in many pest populations. As a result, control fails, which in turn leads to bad practices, such as increasing the dose or frequency of applications. Pesticide resistance by pests has been extensively studied, because of its importance in economical terms, since it reduces the effectiveness of control of a chemical treatment. Other consequences of these activities are the negative effects on populations of natural enemies. But it has been reported also that natural enemies can develop resistance, which would mean an opportunity to integrate the biological and chemical control measures in agro-ecosystems where pests still need to be controlled with insecticides. The objective of this work was to evaluate the susceptibility, resistance and tolerance, to different insecticides, in *C. externa* y *C. asoralis*, which are present in the CHP. Emphasis was focus in the study of resistance mechanisms too pyrethroids in *C. externa*. The presence of specimens of *Chrysoperla* spp., in the area was studied as well.

Bioassays on the crisopids were done by topical application of the insecticides, considering third instar larva and pupa. Solutions with the Maximum Field Recommended Concentrations (MFRC) of each insecticide were prepared, as well as different solutions of them. Cypermethrin, acetamiprid, pyriproxyphen and azadirachtina, were the insecticides used.

When two different colonies of *C. externa* were evaluated, one from a treated field and the other from laboratory, both of them showed the same susceptibility to the insecticides tested and a very low mortality with cypermethrin, probably because of a high detoxifying action by P450 enzymes and esterases. Third instar larvae of *C.*

asoralis was more susceptible to cypermethrin and acetamiprid comparing with *C. externa*. On the other hand, the same applications on pupae, demonstrated that this developmental stage is more tolerant to insecticides than the larval stage.

In this thesis work, *C. externa* proved to be a promising natural enemy that can be used in IPM programs. The species *C. externa* presents natural tolerance to the insecticide cypermethrin and this self-tolerance of the species is present in laboratory strains without previous exposure to insecticides. This feature is of great importance in programs of mass rearing, since at the time of release in the field, individuals would be able to survive applications and/or residues of pesticides, without having been exposed during production.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Plagas agrícolas y uso de plaguicidas

Desde el surgimiento de la agricultura, hace aproximadamente 10.000 años, el hombre ha tenido que enfrentarse a los daños producidos por las plagas en los cultivos (Devine *et al.* 2008). Según la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), una plaga es “cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales” (FAO 2000).

Uno de los métodos de control de plagas, más utilizado a lo largo de la historia, ha sido, y continúa siéndolo en la actualidad, la aplicación de plaguicidas naturales o de síntesis (Devine *et al.* 2008). De acuerdo a la United States Environmental Protection Agency (USEPA), un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga incluyendo: los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y subproductos o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos.

La USEPA considera que el término de plaguicida incluye sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de la fruta o evitar la caída prematura y sustancias aplicadas a los cultivos, antes y después de la cosecha, para proteger al producto durante el almacenamiento y transporte. Los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios y medicamentos para animales no están considerados dentro de esta categorización.

1.1.1. Problemas asociados al uso de plaguicidas

El uso de plaguicidas ha jugado un papel significativo en la agricultura, y continúa siendo en la actualidad una de las prácticas más comunes, para el control de plagas (Naumann 2000; Norris *et al.* 2003; Stark & Banks 2003; Desneux *et al.* 2007; Pórfido *et al.* 2014). Sin embargo, el uso extensivo de estos compuestos ha ocasionado efectos

adversos, sobre todo el uso de insecticidas convencionales pero también biorracionales, tales como:

- Reducción de las poblaciones de organismos benéficos (enemigos naturales y polinizadores), causando pérdidas en el balance biológico natural, como resurgimiento de plagas primarias y aparición de plagas secundarias.

- Resistencia de organismos fitófagos a plaguicidas.

- Contaminación de agua, suelo y atmósfera.

- Desequilibrios en los ciclos geoquímicos.

- Reducción de la biodiversidad.

- Contaminación a través de la cadena trófica por bioacumulación y biomagnificación.

- Exposición de la población humana a plaguicidas (tanto trabajadores como consumidores) por el consumo de productos contaminados con residuos. A su vez, las aplicaciones aéreas, no controladas, sobre áreas pobladas causan riesgos en la salud del hombre.

1.2. Plaguicidas convencionales

Existen diferentes tipos de plaguicidas y los primeros en comercializarse fueron compuestos de amplio espectro los cuales actúan sobre una gran variedad de plagas. Estos plaguicidas representan un grupo heterogéneo con distintos modos de acción y variadas características químicas. De manera general, y como ya se ha remarcado, puede decirse que actúan sobre un amplio rango de especies plaga, pudiendo afectar también a organismos no blanco (Devine *et al.* 2008).

Los plaguicidas de amplio espectro surgieron en el mercado a partir de la década del '40, desde entonces se ha producido un cambio rotundo en el escenario del manejo de plagas. El primer plaguicida en ser comercializado masivamente, perteneciente al grupo de los organoclorados, fue el DDT (diclorodifeniltricloroetano). Este compuesto comenzó a utilizarse para el control del vector de la malaria (el mosquito *Anopheles gambiae* Giles), pero debido a su modo de acción amplio, continuó utilizándose para el control de plagas agrícolas y urbanas. Otros compuestos de amplio espectro que han

sido utilizados masivamente son los organofosforados, como por ejemplo malatión, metamidofós y clorpirifós; y los carbamatos, entre ellos aldicarb y carbofurán (Smith *et al.* 2002).

Los piretroides son un grupo de plaguicidas de amplio espectro que se obtienen del piretro, una mezcla de 6 ésteres naturales, extraído de las flores de ciertas especies de *Chrysanthemum* sp. Los primeros análogos de las piretrinas se sintetizaron en la década de 1940. Si bien la aletrina (el primer piretroide sintetizado) presentó una notable acción insecticida, los desarrollos más importantes se produjeron luego de 1960 por Elliot (Elliott 1977).

El piretroide cipermetrina (Fig. I.1) fue evaluado en la presente tesis. Su fórmula química es: $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$.

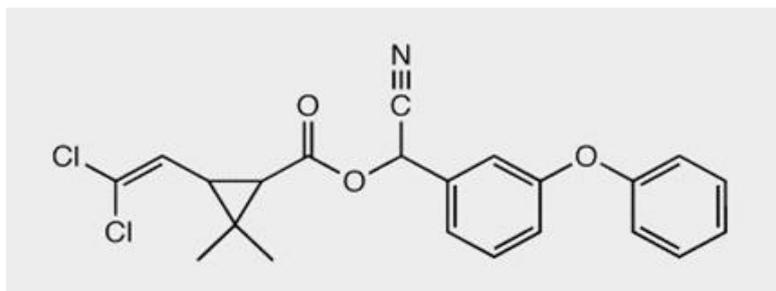


Fig. I.1. Estructura química general de cipermetrina.

Los piretroides son plaguicidas que interfieren en la transmisión de señales nerviosas. Su sitio de acción son los canales de sodio dependientes de voltaje. Cuando el insecticida se une al sitio activo, se prolonga el período de apertura de los canales de sodio, este ion continúa ingresando y se acumula en el interior de la neurona, evitando que se produzca su repolarización. Se genera hiperexcitación y posterior bloqueo del impulso eléctrico, parálisis, postración y muerte del insecto (Soderlund 2012).

I.2.1. Uso de plaguicidas convencionales en Argentina

La Argentina es un país productor agrícola, cuya economía primaria se basa en los cultivos de soja, maíz, trigo, girasol, maní, frutas de pepita, cítricos, pasturas,

hortalizas, algodón, tabaco, frutas de carozo, caña de azúcar, arroz, vid, porotos y otros (CASAFE 2015).

Desde la década del '40, los plaguicidas organoclorados fueron ampliamente utilizados, al igual que en el resto del mundo. En la misma época, irrumpieron en el mercado los plaguicidas organofosforados y los carbamatos. A partir de los años '70, la producción y el consumo de los plaguicidas aumentaron en Argentina y en otros países productores de granos. Paulatinamente, se fueron incorporando otras clases de compuestos, como los piretroides (Brunstein *et al.* 2009).

Debido a las consecuencias negativas ocasionadas por el uso indiscriminado de plaguicidas convencionales, el Servicio Nacional de Sanidad Vegetal y Calidad Agroalimentaria (SENASA), organismo responsable del registro de agroquímicos en Argentina, a través de diferentes resoluciones, restringió y prohibió el uso de ciertos plaguicidas organoclorados, organofosforados y carbamatos (Pórfido *et al.* 2014). Sin embargo, existen en el mercado nacional alrededor de 1000 principios activos y 3000 formulaciones de productos fitosanitarios registrados, con variadas toxicidades y riesgos ambientales. Esto requiere que dichos productos sean usados con suma precaución y no de manera indiscriminada. A su vez, la Argentina se encuentra entre los países que producen un alto porcentaje de los principios activos que consume (un 17%, luego de China) (Fig. I.2) (Pórfido *et al.* 2014).

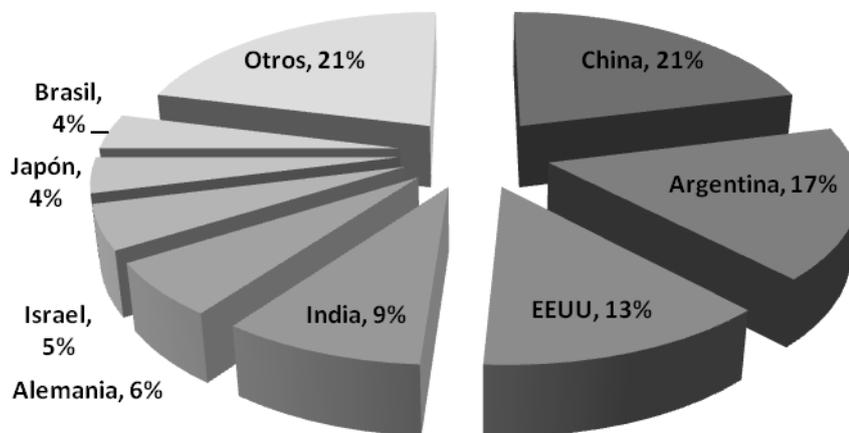


Fig. I.2. Procedencia de los productos fitosanitarios (De Pórfido *et al.* 2014, fuente: SENASA)

Argentina es el principal exportador mundial de aceite y harina de soja, y el tercer proveedor mundial de esta oleaginosa en grano (FAO 2013). Actualmente, los principales plaguicidas utilizados son los herbicidas, glifosato y atrazina, relacionados a las grandes extensiones de soja y maíz transgénicos; seguidos de los insecticidas cipermetrina, lambdacialotrina y clorpirifós (Villamil-Lepori *et al.* 2013). En cuanto a la zona frutihortícola platense, los cultivos más importantes y rentables son los de fruto: tomate, pimiento, berenjena, los cuales se producen bajo cubierta. El período de cultivo abarca las etapas de mayores temperaturas del año (fines de Agosto hasta Abril) y es en este momento donde las aplicaciones de fitosanitarios se llevan a cabo, muchas veces de manera preventiva y sistemática (Capello & Fortunato 2008).

1.3. El Manejo Integrado de Plagas

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) se define como: “un sistema de toma de decisiones para la selección de estrategias de manera armoniosa para el control de plagas. Este manejo se basa en el análisis del costo/beneficio, teniendo en cuenta los intereses y el impacto en los productores, la sociedad y el medio ambiente” (Kogan 1998).

En el contexto del MIP, una plaga es cualquier organismo que al incrementar su nivel poblacional alcanza el Nivel de Daño Económico (NDE), definido como la densidad poblacional de una especie fitófaga, a partir de la cual puede causar daño económico. Cuando una población fitófaga alcanza el NDE, el costo asociado con el manejo de la plaga iguala sus beneficios. Por debajo de este nivel no existe necesidad de tomar ninguna medida de control. El Umbral Económico (UE) es el punto en el cual la densidad poblacional está apenas por debajo de aquel en el que el costo y el daño hecho en el valor del cultivo igualan el costo de tratamiento, es decir cuando la relación del costo de control a beneficio obtenido como resultado de éste es un poco menos que 1:1 (Saunders *et al.* 1998). En este punto, se debe ejercer alguna medida de control para evitar que dicha población alcance el NDE (Fiedler *et al.* 2008; Maleki & Damavandian 2015).

Entre las diferentes estrategias implementadas por el MIP, se encuentran: el control cultural (métodos mecánicos de labranza, manejo de suelos, rotación de cultivos, etc.), el control fitogenético (uso de cultivos resistentes a plagas y mejoramiento genético), el control etológico (control autocida, uso de feromonas sexuales, repelentes, etc.), el control químico y el control biológico (Van Driesche *et al.* 2007). En la presente tesis se enfocó en estos dos últimos componentes. Los principios del MIP establecen la preferencia por el control biológico y cultural por sobre el control químico. Sin embargo, cuando se debe recurrir a este último, se recomienda el uso de insecticidas biorracionales (Kogan 1998).

1.3.1. Insecticidas biorracionales

Los insecticidas biorracionales son compuestos, naturales o sintéticos, que derivan de microorganismos, plantas o minerales. Estos compuestos, selectivos hacia las plagas (es decir, que no afectan a los organismos no blanco), por lo general presentan un único modo de acción, son compatibles con organismos benéficos y de bajo impacto ambiental. Además presentan una toxicidad muy baja sobre el hombre y otros vertebrados (Ishaaya & Horowitz 2009).

Existen diferentes grupos de insecticidas biorracionales: insecticidas reguladores del crecimiento (IGR), bioplaguicidas (dentro de los cuales se encuentran los insecticidas botánicos y los microbianos), moléculas sintéticas con nuevos modos de acción, etc. A continuación se detallan los estudiados en este trabajo de tesis.

1.3.1.i. Insecticidas reguladores del crecimiento de los insectos (IGR)

Los insecticidas IGR son compuestos sintéticos que intervienen en los procesos de crecimiento y desarrollo de los insectos. Este grupo incluye a insecticidas análogos de la hormona juvenil, miméticos de la hormona de la muda (ecdisona) e inhibidores de la síntesis de quitina (Dhadialla *et al.* 2010).

Los procesos de muda y desarrollo de los insectos están regulados por un sistema hormonal complejo, en el que intervienen la hormona de la muda y la hormona juvenil. Las concentraciones relativas de cada una de ellas, en el cuerpo del insecto,

juegan un rol fundamental en estos procesos. La hormona de la muda, secretada por las glándulas ecdisiales, favorece el proceso de metamorfosis. Por otro lado, la hormona juvenil, secretada por la glándula *corpora allata*, interviene en el proceso de ecdisis, definido como la muda de la capa cuticular externa del cuerpo. Durante el estadio larvario, la hormona juvenil es liberada y su función es mantener las características inmaduras del organismo. Bajas concentraciones de esta hormona permiten la muda (Hoffmann & Porchet 2012).

El piriproxifén (Fig. I.3) es un insecticida mimético de la hormona juvenil, comúnmente utilizado en Argentina (Pórfido *et al.* 2014). Este compuesto presenta actividad insecticida por contacto e ingestión. En el interior del organismo, el principio activo actúa como antagonista de la hormonal juvenil, interfiriendo sobre el desarrollo, crecimiento y vitelogénesis de los insectos (Sullivan & Goh 2008). Su fórmula química es: $C_{20}H_{19}NO_3$

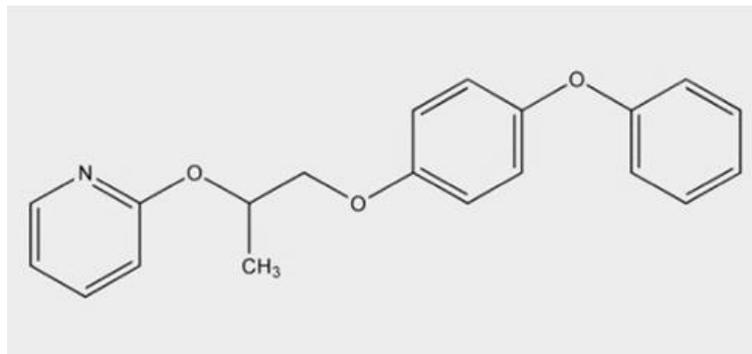


Fig. I.3. Estructura química del piriproxifén.

1.3.1.ii. Plaguicidas botánicos

Los plaguicidas botánicos son compuestos naturales o sintéticos que representan metabolitos secundarios, utilizados por las plantas en la defensa contra organismos fitófagos. Éstos representan adaptaciones que han surgido durante la coevolución entre los insectos herbívoros y las plantas (Isman 2008).

El insecticida más conocido a nivel mundial y utilizado en la Argentina es la azadiractina (Fig. I.4) (Pórfido *et al.* 2014). El principio activo de este insecticida es un

complejo de tetranortriterpenoides del tipo limonoide, que se extrae de las semillas del árbol conocido como neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) (Sapindales, Meliaceae). Se han propuesto los nombres azadiractina A, B, C y D (el C ha dejado de usarse al no haber sido descrito), para distintos compuestos pertenecientes a diferentes grupos químicos, todos pertenecientes al extracto de neem. Más adelante, otros compuestos (azadiractina E, F y G) fueron aislados (Morgan 2009). Estas sustancias pueden repeler insectos, prevenir su instalación, interferir en el comportamiento alimentario (efecto fagodisuasivo), crecimiento, desarrollo y reproducción. El efecto fagodisuasivo se produce cuando el insecticida estimula los quimiorreceptores presentes en los tarsos, piezas bucales y cavidad oral de los insectos. En otros casos, la azadiractina actúa como antagonista de la ecdisona, bloqueando los sitios de unión de esta hormona, y por lo tanto interfiriendo en el proceso de muda (Mordue 2004).

Si bien la azadiractina presenta baja toxicidad hacia vertebrados, su acción sobre enemigos naturales y polinizadores es discutida (Isman 2006; Barbosa *et al.* 2015). La fórmula química de este insecticida es: $C_{35}H_{44}O_{16}$

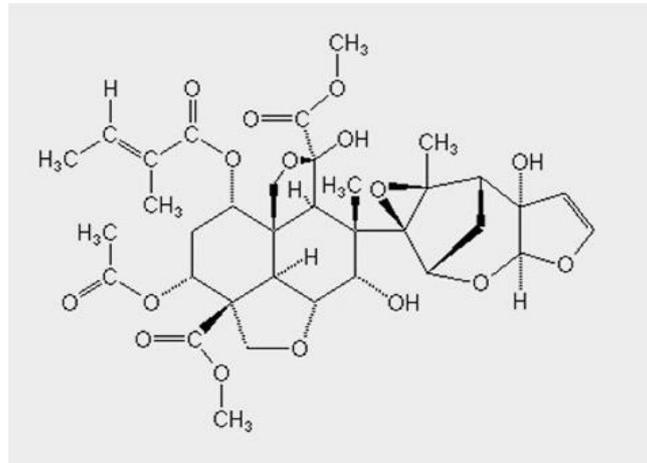


Fig. I.4. Estructura química de la azadiractina.

1.3.1.iii. Neonicotinoides

Los neonicotinoides son compuestos cuyo principio activo se asemeja a la nicotina. El imidacloprid fue el primer miembro comercializado de esta clase, a partir de la década del 90'. La rápida implementación en el mercado de estos insecticidas se ha

relacionado con ciertas propiedades, como ser, el control de un amplio espectro de artrópodos plaga, modo de acción diferente con respecto a los plaguicidas convencionales y baja toxicidad sobre mamíferos (Goulson 2013).

Los neonicotinoides actúan de modo selectivo e irreversible sobre los receptores nicotínicos de la acetilcolina (nAChR) en las células nerviosas de los insectos, paralizándolos y provocando su muerte (Tomizawa & Casida 2005).

Otro insecticida neonicotinoide, comúnmente utilizado en la Argentina, es el acetamiprid (Fig. 1.5) (Pórfido *et al.* 2014). Su fórmula química es: $C_{10}H_{11}ClN_4$

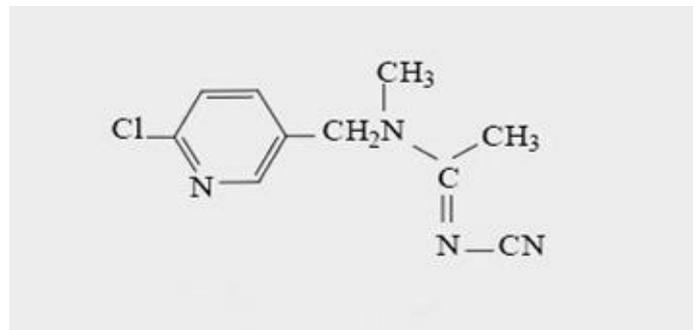


Fig. 1.5. Estructura química del acetamiprid.

Si bien los insecticidas neonicotinoides han sido considerados como insecticidas biorracionales durante más de una década, esta categorización toxicológica es muy discutida, principalmente por la alta mortalidad registrada en polinizadores y enemigos naturales (Desneux *et al.* 2007; Goulson 2013).

1.4. Resistencia, tolerancia, susceptibilidad

La resistencia a plaguicidas es la capacidad de una población plaga de tolerar dosis de tóxicos que resultarían letales para la mayoría de los individuos de la misma especie (Stenersen 2004). Cada aplicación de plaguicidas tiene un efecto drástico sobre la población de insectos a la que está dirigida. Los individuos que sobreviven a estas aplicaciones portan alelos que los hacen resistentes; al reproducirse, la frecuencia de esos alelos aumenta en la población. Algunos plaguicidas por consiguiente pueden

presentar un tiempo restringido de utilidad, ya que el desarrollo de resistencia por parte de las plagas puede hacerlos ineficientes.

La resistencia cruzada es un fenómeno en el cual la población plaga se vuelve resistente a dos o más plaguicidas como resultado de la exposición a uno solo de ellos. En este trabajo de tesis, se hizo hincapié en los fenómenos de resistencia, tolerancia y susceptibilidad, que se describirán a continuación. La resistencia (fenómeno a nivel molecular donde se detectan genes mutantes resistentes) se diferencia de la tolerancia natural que exhiben algunas especies plaga. Ésta última es una propiedad fisiológica que vuelve inefectivo al plaguicida contra los individuos (Stenersen 2004). Es una tendencia natural de una especie, o incluso de un estado de desarrollo particular, a sobrevivir a un plaguicida (Coles & Dryden 2014). En contraposición, si un organismo (ya sea un determinado estado de desarrollo, una especie o población) es afectado negativamente por un insecticida, se dice que es susceptible al mismo. La susceptibilidad puede evaluarse con estudios de mortalidad, parámetros biológicos (tiempo de desarrollo, fecundidad, fertilidad, etc.), comparando dosis letales (DL₅₀) entre poblaciones, o mediante otros protocolos (Fathian *et al.* 2015; Grigg-McGuffin *et al.* 2015; Pessoa *et al.* 2015).

El uso intensivo de plaguicidas ha llevado al desarrollo de resistencia en muchas especies de insectos y ácaros, alrededor del mundo. Según la *Arthropod Pesticide Resistance Database* (APRD, www.pesticideresistance.org, Base de Datos de Resistencia de Artrópodos a Plaguicidas), más de 550 especies de artrópodos han desarrollado resistencia (Whalon *et al.* 2008). Entre ellas se encuentran plagas de importancia agrícola y urbana y vectores de enfermedades. A diferencia de lo documentado para artrópodos plaga, existen pocos casos registrados de enemigos naturales resistentes (Pree *et al.* 1989; Pathan *et al.* 2008; Sayyed *et al.* 2010; Mansoor *et al.* 2013; Rodrigues *et al.* 2013). Las causas por las cuales los artrópodos fitófagos desarrollan resistencia a plaguicidas más rápido que los enemigos naturales, han sido atribuidas a factores biológicos, ecológicos y bioquímicos (Pathan *et al.* 2008).

Los mecanismos de resistencia son muy variados y están relacionados con el modo de acción de los diferentes grupos de plaguicidas.

1.4.1. Resistencia a piretroides

Para muchas plagas, el mecanismo de resistencia a piretroides más importante es la insensibilidad del sitio blanco, denominada resistencia *knock down* (kdr), causada por mutaciones en el gen del canal de sodio dependiente de voltaje. Existen numerosos trabajos sobre este tipo de resistencia en mosquitos (*Anopheles gambiae* Giles, *An. arabiensis* Patton y *Aedes aegypti* L.), moscas (*Musca domestica* L.) y cucarachas (*Blattella germanica* L.) (Osborne & Smallcombe 2013; Al-Deeb 2014; Gholizadeh *et al.* 2014; Ndiath *et al.* 2014; 2015; Pang *et al.* 2015).

El principal mecanismo de detoxificación de artrópodos está mediado por la actividad citocromo P450 que cataliza los procesos oxidativos. Menos importante pero también presente es la actividad glutatión-S-transferasa que cataliza la conjugación con el tripéptido glutatión. Se han identificado mutaciones que generan una sobreexpresión de estas enzimas o producen cambios en la secuencia de aminoácidos que aumentan la eficiencia catalítica (Joußen *et al.* 2012; Zhong *et al.* 2013; Edi *et al.* 2014). También puede reconocerse como un mecanismo de resistencia la reducción de la penetración cuticular del plaguicida (Lin *et al.* 2012; Koganemaru *et al.* 2013; Vannini *et al.* 2014).

1.5. Control biológico

El control biológico es una estrategia de control de plagas en la que se utilizan poblaciones de organismos (enemigos naturales) para reducir la densidad poblacional del artrópodo fitófago, por debajo del Nivel de Daño Económico, ya sea temporal o permanentemente (Van Driesche *et al.* 2007). Es un método económico y “amigable” con el medio ambiente. Según el caso, las poblaciones de enemigos naturales se liberan para causar un cambio permanente en las redes alimenticias; en otros no se espera que los mismos se reproduzcan. Esta medida de control se basa en las relaciones existentes entre diferentes especies en los agroecosistemas y estabiliza la interacción entre ambas (relación depredador-presa y hospedador-parasitoide, hospedador-entomopatógeno) (Eilenberg *et al.* 2001).

Los organismos utilizados para ejercer el control (enemigos naturales) pueden ser entomófagos o entomopatógenos (Hajek 2004). Los entomófagos se dividen en depredadores y parasitoides, con características específicas en cuanto a modo de alimentación, comportamiento, etc. Los depredadores pueden ser insectos o arácnidos (ácaros y arañas). De manera general, los entomófagos son de un tamaño mayor que la presa; aunque en los casos en que el tamaño es menor, utilizan otras estrategias como la inyección de veneno. Para localizar a la presa se guían por señales químicas, y cuando se encuentran a corta distancia de ella, por la visión y otros estímulos. Luego, al momento de ingerirla, pueden utilizar las mandíbulas para cortar y romper la presa con ayuda de otras partes bucales, o bien desarrollan estructuras tubulares que insertan en la presa para succionar su contenido. Por otro lado, los parasitoides son el segundo mayor grupo de entomófagos utilizado para controlar plagas. Los estados inmaduros de estos organismos parasitan a otros insectos, mientras que los adultos son de vida libre y se dispersan para reproducirse y buscar hospedadores saludables para el desarrollo de su progenie. Los parasitoides incluyen variados grupos de insectos: el más representado es el Orden Hymenoptera con 65 mil especies parasitoides, y luego Diptera, Coleoptera, Lepidoptera y Neuroptera. De manera general, el Orden Hymenoptera, las hembras contienen un ovipositor tubular y elongado con el cual inyecta los huevos dentro del hospedador, o los ovipone sobre el cuerpo del mismo. Los parasitoides pueden desarrollarse dentro de huevos, larvas, pupas o incluso adultos de sus hospedadores.

Los entomopatógenos son microorganismos que invaden y se reproducen en un insecto y se propagan para infectar otros insectos. Estos agentes infecciosos pueden ser virus, bacterias, hongos y protistas, o animales multicelulares (nematodes). Los insectos enfermos exhiben síntomas, como aberraciones o disfunciones, características de la enfermedad en cuestión (Vega & Kaya 2012).

Los agroecosistemas contienen complejas redes de organismos que interactúan entre sí y estas interacciones son estructuradas mediante el ritmo relativo de eventos biológicos y ecológicos claves. La intensificación del manejo del terreno y los cambios climáticos globales, amenazan con desincronizar la estructura temporal de las redes

de interacción y perturbar el suministro de los servicios ecosistémicos, tales como el control biológico por enemigos naturales. Por lo tanto, es crítico el reconocimiento del rol central de dichas dinámicas temporales cuando se quieren impulsar interacciones predador-presa en un agroecosistema. Específicamente, las dinámicas poblacionales en cultivos se comportan como oscilaciones periódicas, o ciclos (Welch & Harwood, 2014).

El control biológico puede llevarse a cabo mediante distintas estrategias. El *Control Biológico Clásico* fue la primera en ser utilizada a gran escala y se basa en la introducción de enemigos naturales, desde otra región, para el control biológico de plagas exóticas. Este tipo de control ha sido utilizado ampliamente y muchos de estos programas han resultado ser exitosos (Eilenberg *et al.* 2001; Van Driesche *et al.* 2007).

El Control Biológico Neoclásico se basa en la introducción de enemigos naturales, desde otra región, para el control biológico, en este caso, de plagas nativas. Se genera una nueva asociación debido a que la plaga y el organismo benéfico no han coevolucionado. El control biológico neoclásico es una estrategia útil, cuando los enemigos naturales asociados a una plaga en particular no logran controlarla efectivamente. En estos casos, se seleccionan agentes de control de plagas similares en otras regiones (Eilenberg *et al.* 2001; Van Driesche *et al.* 2007).

Otra estrategia de control es el *Control Biológico Aumentativo* el cual consiste en el incremento de individuos de una especie de enemigo natural ya presente en el cultivo pudiéndose llevar a cabo liberaciones de individuos para controlar una plaga, de manera inundativa o inoculativa (Eilenberg *et al.* 2001; Van Driesche *et al.* 2007). En el *Control Biológico Inundativo* se busca un control de plagas inmediato o a muy corto plazo y se espera que el control sea realizado por los individuos liberados, no su descendencia. Las liberaciones inundativas deben ser repetidas, en el caso de que las poblaciones de plagas incrementen su población nuevamente, luego de haber sido controladas. Los agentes liberados deben controlar una proporción suficientemente grande de la población plaga. Por supuesto, para conseguir un control rápido es importante liberar un gran número de organismos para ahogar o “inundar” el ambiente donde la población plaga se desarrolla (Eilenberg *et al.* 2001; Van Driesche *et*

al. 2007). Por otro lado, el *Control Biológico Inoculativo* se basa en la liberación del agente de control biológico en el agroecosistema, y se espera que el mismo pueda multiplicarse y también su progenie controlar la plaga. Esta estrategia provee un control a largo plazo y autosostenido en comparación con el control biológico inundativo. Para este tipo de control debe existir un suficiente número de individuos en el momento de la liberación con el fin de mantener a una segunda o tercera generación del agente de control. A la vez deben existir condiciones necesarias que permitan su multiplicación, como una alta diversidad de cultivos, sitios de refugio y presa y hospederos alternativos, que aumentan la probabilidad de establecimiento de los agentes de control (Eilenberg *et al.* 2001; Van Driesche *et al.* 2007).

Por último, el *Control Biológico por Conservación* fue desarrollado principalmente para conservar aquellos enemigos naturales que han sido afectados por el uso de plaguicidas sintéticos. Deben llevarse a cabo prácticas que protejan o ayuden a aumentar las poblaciones de enemigos naturales (refugios, presas alternativas, otros recursos alimenticios). Se promueve el desarrollo de la biodiversidad y las relaciones tróficas entre organismos (Eilenberg *et al.* 2001; Van Driesche *et al.* 2007). Este tipo de control biológico debería ser una alternativa importante contra el uso indiscriminado de plaguicidas, así como un componente significativo de la agricultura sustentable. La manipulación del ambiente (el hábitat) de los enemigos naturales, debe estar dirigido a su mayor supervivencia, su desempeño fisiológico y comportamental, y resultar en una mejora en su eficiencia como controladores (Barbosa 1998). Un aspecto importante del Control Biológico por Conservación es la presencia de enemigos naturales que se encuentren en el área naturalmente y que, por lo tanto, deberían estar bien adaptados al medio de la plaga. Este último punto es relevante en la presente tesis, como se verá en los apartados siguientes.

1.5.1. Enemigos naturales

Los enemigos naturales son organismos utilizados para controlar especies de artrópodos plaga. Son taxonómicamente y funcionalmente diversos. Como ya se mencionó anteriormente (Apartado 1.5), existen enemigos naturales depredadores, parasitoides y patógenos (Van Driesche *et al.* 2007).

Para que un enemigo natural sea considerado exitoso, debe reunir ciertos atributos: (1) especificidad con el hospedador o presa, cuya valoración fue cambiando al reconocerse la importancia de la amplitud de la dieta en el CB por conservación (2) sincronización con la plaga, (3) tasa de crecimiento alta, (4) habilidad para sobrevivir periodos con escasa o nula aparición de la organismos fitófagos, y (5) buena capacidad de búsqueda (Hajek 2004).

Esta investigación tuvo en cuenta a uno de los grupos de EN mencionados, los artrópodos depredadores. Éstos matan y consumen otros organismos presa, son de tamaño relativamente mayor a éstas y, por lo general, las mismas son consumidas inmediatamente. Algunos ejemplos de depredadores utilizados en programas de control biológico son arácnidos del orden Acarina, como *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot, *Amblyseius cucumeris* Oudemans y *Neoseiulus californicus* McGregor (Van Driesche *et al.* 2007); los coccinélidos *Harmonia axyridis* Pallas, *Hippodamia convergens* Guérin-Ménéville, *Eriopis connexa* Germar (Hodek *et al.* 2012); hemípteros de la familia Geocoridae, *Geocoris punctipes* Say, y de la familia Anthocoridae, *Orius insidiosus* Say (Wong & Frank 2013); dípteros depredadores de la familia Syrphidae, como *Phacelia tanacetifolia* Benth., *Episyrphus balteatus* DeGeer, y de la familia Cecidomyiidae, como *Aphidoletes aphidimyza* Rondani y *Dasineura rubiformis* Koselik (Van Driesche *et al.* 2007); los crisópidos *Chrysoperla carnea* Stephens, *Chrysoperla rufilabris* Burmeister y *Chrysoperla externa* Hagen (van Lenteren 2012; Flores *et al.* 2013; Lavagnini *et al.* 2015).

En esta tesis se profundizará en el estudio particular de los neurópteros, tanto su presencia en agroecosistemas como el efecto que los plaguicidas causan sobre ellos.

1.5.2. Neurópteros

Los neurópteros son insectos holometábolos. Los adultos presentan cabeza ortognata a hipognata, y un aparato bucal masticador con mandíbulas fuertes modificado en algunas especies. Las antenas son filiformes o moniliformes, además presentan grandes ojos compuestos y los ocelos están generalmente ausentes. El protórax es

corto, las patas usualmente son delgadas y cursoriales, en otros casos son cortas y robustas. Presentan dos pares de alas membranosas grandes, con venación compleja. El abdomen presenta 10 segmentos, 9 en Chrysopidae. Las larvas son activas, campodeiformes, prognatas, con aparato bucal proyectado hacia adelante. Las mandíbulas y maxilas de cada lado se encuentran fuertemente asociadas formando un “tubo suctor”, los palpos maxilares están ausentes (New 2001).

La familia Chrysopidae representa la familia más diversa del orden. Las larvas de los crisópidos son depredadoras. Éstas son polífitas y el canibalismo es común entre ellas, acentuado en los estadios larvales superiores (New 2001). Éstas presentan mandíbulas y maxilas elongadas e interconectadas formando tubos succionadores, tan largos como la parte cefálica y curvados hacia adentro. La abertura bucal no es funcional y se encuentra cerrada mecánicamente por el tegumento. En la base de las mandíbulas se encuentran glándulas secretoras de enzimas salivales. Éstas son inyectadas en la presa para iniciar una digestión preoral, antes de que los fluidos sean succionados. El tubo digestivo es cerrado a continuación del intestino medio, por lo que el intestino posterior no es funcional. Los remanentes solubles de la digestión son llevados hacia adelante por la hemolinfa y excretados a través de los túbulos de Malpighi. Aquellos insolubles, son almacenados en la región distal del intestino de los estadios inmaduros y eyectados por el adulto luego de la ecdisis imaginal.

Los crisópidos adultos presentan una dieta que puede clasificarse erróneamente como un régimen fitófago, siendo más correcto el término “glucófago”. Se alimentan de néctar y varios exudados vegetales, así como también melazas producidas por insectos herbívoros y polen (Lundgren 2009).

El género *Chrysoperla* Steinmann es el más importante, por el uso de varias de sus especies como agentes de control biológico en programas de MIP. *Chrysoperla carnea* Stephens es la especie más comercializada de esta familia. Algunos autores la consideran una sola especie morfológica, ampliamente distribuida en la zona Holártica, otros sostienen que en realidad la especie está representada por un conjunto de especies crípticas, con características similares. Dicha “mega especie” es llamada con más precisión el grupo-carnea (Tauber & Tauber 1973; Brooks 1994).

1.5.2.1. Crisópidos de Argentina

Los estudios sobre crisópidos en Argentina son muy escasos, y en particular en el CHP no se cuenta con relevamientos de la totalidad de especies del género *Chrysoperla*.

Se han registrado cuatro especies del género *Chrysoperla* en el país: *C. externa* Hagen (1861), *C. asoralis* Banks (1915), *C. argentina* González Olazo & Reguilón (2002), y *C. defreitasi* Brooks (1994) (Montserrat & de Freitas 2005) (Fig 1.6)

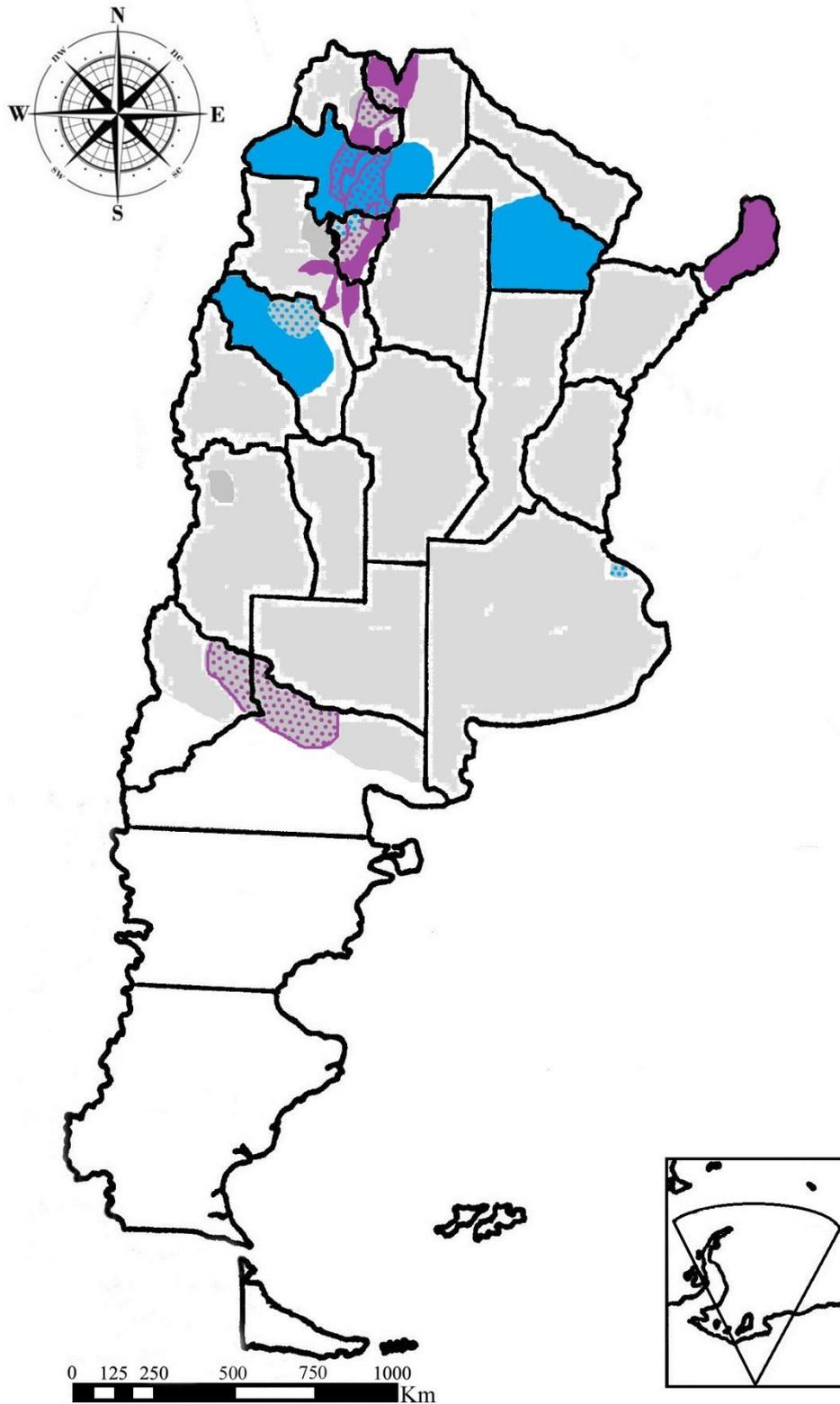


Fig. I.6: distribución del género *Chrysoperla* en la Argentina. *C. argentina* (gris oscuro), *C. asoralis* (azul), *C. defreitasi* (violeta) y *C. externa* (gris claro).

Chrysoperla externa muestra una amplia distribución en la región neotropical desde las Antillas hasta el norte de la Patagonia Argentina (Adams & Penny 1987); *C. asoralis* se extiende desde el Norte de la Argentina hasta el Norte de la Patagonia (González Olazo & Heredia 2007; González *et al.* 2011); *C. argentina* se ha encontrado en las provincias de Salta, Chaco, La Rioja y Tucumán (González Olazo & Reguilón 2002; Reguilón *et al.* 2006) y *C. defreitasi* se distribuye en la ecorregión de las Yungas y Paranaense, en el este de Argentina (González *et al.* 2011) y en el Norte de la Patagonia (Montserrat & de Freitas 2005).

La especie más estudiada ha sido *C. externa* (Fig. 1.7). Se han investigado diferentes aspectos de su biología y susceptibilidad a plaguicidas (Iannacone & Lamas 2002; Silva *et al.* 2006; Rimoldi *et al.* 2008; 2012; Schneider *et al.* 2009; Moura *et al.* 2011).

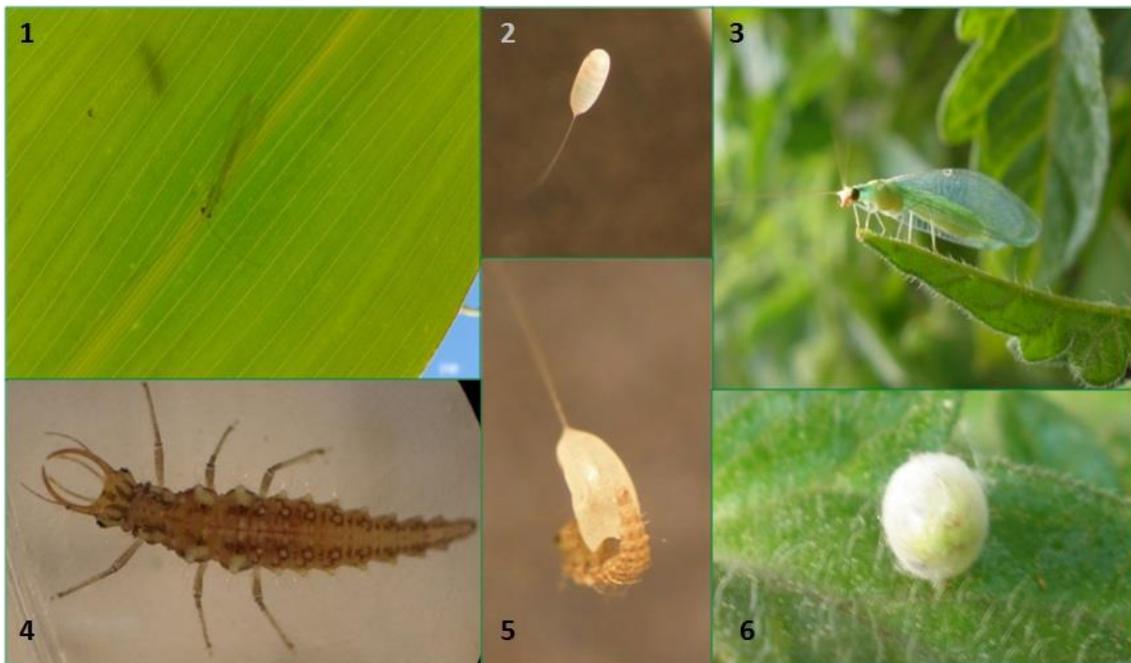


Fig. 1.7. Estados de desarrollo de *Chrysoperla externa*. Huevo (2), larva (4,5), pupa (6), adulto (1,3).

Chrysoperla externa presenta una alta adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales, alto potencial reproductivo, eficiente capacidad de búsqueda de la presa y está asociada a varios cultivos agrícolas. Las larvas de esta especie son enemigos naturales efectivos de áfidos, mosca blanca, trips, ácaros y lepidópteros (Núñez 1988; Duelli 2001; Souza & Carvalho 2002; Salamanca Batidas *et al.* 2010).

Estas características hacen de *C. externa* un buen candidato para control biológico. Durante los últimos años, ha sido promovida su cría masiva y consecuente liberación en campo, en varios países de Sudamérica (Daanel & Yokota 1997; Carvalho *et al.* 2002; Pappas *et al.* 2011), pero solo Perú produce esta especie de manera masiva para control biológico (SENASA Perú 2015).

Por otro lado, *C. asoralis* ha sido registrada en la Argentina en un área mucho menor y en zonas geográficamente distantes entre sí. Esta especie es un importante depredador de diversas plagas de la agricultura, mayoritariamente en cultivos frutales, y se distingue morfológicamente de *C. externa* por características larvales y del adulto (Capítulo III). Ha sido descrita la morfología de los distintos estados de la especie (González Olazo *et al.* 2009) y existe información sobre la toxicidad de ciertos insecticidas (un carbamato y un insecticida botánico) sobre poblaciones de Perú (Iannacone *et al.* 2015), pero la misma es todavía escasa.

Debido a la presencia e importancia como controladores biológicos de las especies *C. externa* y *C. asoralis*, a las aplicaciones de insecticidas en el Cinturón Hortícola Platense (CHP) y a las premisas del MIP, las cuales apuntan a la utilización de enemigos naturales para controlar las plagas y en último caso combinar esta estrategia con el uso de insecticidas selectivos, el siguiente trabajo de tesis aborda la toxicidad de distintos insecticidas sobre estas dos especies. Esto será de suma importancia para estudios futuros, ya que aporta datos sobre mortalidad y sobre cómo los parámetros biológicos de especies benéficas se ven afectados con el uso de estos compuestos químicos.

Existe la hipótesis de que la especie *C. asoralis* podría estar desplazando a *C. externa* según el gran número de individuos encontrados en diversas locaciones (González Olazo *et al.* 2011). Aunque hacen falta más estudios para corroborar esta hipótesis en la provincia de Buenos Aires, la colecta llevada a cabo en el CHP durante un período de

dos años indicó que al menos en los sitios visitados, *C. asoralis* fue más abundante que *C. externa* en el predio relevado. Al estar presente la nueva especie registrada en un predio con manejo integrado y baja frecuencia de aplicaciones de insecticidas biorracionales, *C. asoralis* sería más susceptible que *C. externa*. Por esta razón, se hicieron estudios comparativos de susceptibilidad a insecticidas entre ambas especies.

1.6. Objetivo general

El objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad, tolerancia y resistencia a diferentes insecticidas, de *C. externa* y *C. asoralis*, presentes en el Cinturón Hortícola Platense, una importante región agrícola de la Argentina. Se hizo énfasis en el estudio de los mecanismos de resistencia a piretroides en *C. externa*. . También se estudió la presencia de especímenes en el Cinturón Hortícola Platense de diferentes especies de *Chrysoperla* spp. La evaluación de la susceptibilidad de *C. asoralis* y *C. externa* permitió conocer aspectos de la tolerancia de ambas especies.

1.6.1. Objetivos específicos

1. Relevar la presencia de especímenes de diferentes especies de *Chrysoperla* spp. en el Cinturón Hortícola Platense.
2. Evaluar la susceptibilidad de colonias de campo y laboratorio de *C. externa*, expuestas a cipermetrina, acetamiprid o azadiractina, a través de la evaluación de parámetros biológicos (supervivencia, tiempo de desarrollo, período de preoviposición, fecundidad y fertilidad).
3. Evaluar la resistencia de colonias de campo y laboratorio, de *C. externa*, expuestas a cipermetrina, a través de estudios moleculares (mecanismos de detoxificación enzimática, cuantificación de residuos de plaguicidas y búsqueda de secuencias de ADN resistente).
4. Comparar la susceptibilidad de *C. externa* y *C. asoralis* a cipermetrina, acetamiprid y piriproxifén, a través de la evaluación de parámetros biológicos (supervivencia, tiempo de desarrollo, periodo de preoviposición, fecundidad y fertilidad).

1.7. Hipótesis

El primer objetivo fue descriptivo.

Para el segundo y tercer objetivo, se planteó la siguiente hipótesis:

- Los individuos de la población de campo de *C. externa* presentan mecanismos de resistencia a cipermetrina, acetamiprid y azadiractina, con respecto a los ejemplares

pertenecientes a la colonia de laboratorio, por haber estado expuestos durante numerosas generaciones a aplicaciones de insecticidas.

La hipótesis asociada al cuarto objetivo fue:

- *Chrysoperla externa* presenta mayor tolerancia a cipermetrina, acetamiprid y piriproxifén, con respecto a *C. asoralis*, al haber sido encontrada esta última solamente en cultivos con manejo integrado, sin exposición a insecticidas de amplio espectro.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

II.1. Recolección de organismos a campo

El muestreo de individuos crisópidos se llevó a cabo en distintos predios del Cinturón Hortícola Platense (CHP) (Fig. II.1). Los cultivos muestreados fueron tomate (*Solanum lycopersicum* L.), pimiento (*Capsicum annum* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.) y arvejas (*Pisum sativum* L.), bajo cubierta. Además se muestrearon gramíneas espontáneas alrededor de la zona de cultivo.

Las recolecciones se realizaron de manera manual o utilizando redes entomológicas de arrastre. Se recolectaron huevos, larvas y, en su mayor parte, adultos. Los muestreos se realizaron semanalmente desde finales de primavera hasta finales del verano, desde el año 2011 hasta el 2014. El objetivo de las colectas fue mantener en condiciones de laboratorio las crías de las diferentes colonias de *Chrysoperla* para su posterior evaluación.

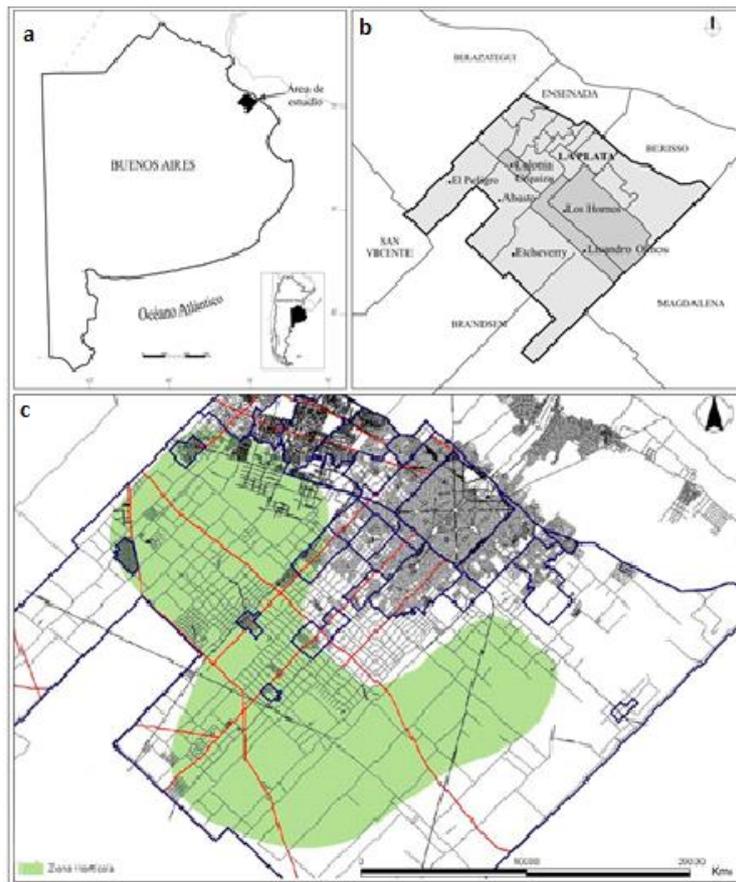


Fig. II.1: a) Ubicación del Partido de La Plata en la Prov. de Buenos Aires; b) ubicación del Partido de La Plata y de sus localidades (Colonia Urquiza, Los Hornos, Abasto, Lisandro Olmos, Etcheverry y El Peligro); c) Plano del Partido de La Plata donde se muestra, en verde, la ubicación de las áreas dedicadas a la horticultura (Fuente: Ringuelet 2008 en Rouaux 2015).

II.1.2.i. Colonias de crisópidos: colectas y cría de organismos en laboratorio

En este trabajo de tesis se establecieron diferentes colonias del depredador *C. externa* (Fig. II.2).

- La colonia de laboratorio se compuso de ejemplares criados por varias generaciones y sin exposición a plaguicidas. El laboratorio de Ecotoxicología: Plaguicidas y Control Biológico contaba con una colonia de laboratorio de *C. externa* desde el año 2006 sin exposición a plaguicidas. Para evitar la endogamia de la colonia, se incorporaron anualmente organismos de cultivos sin tratamientos con plaguicidas de síntesis. Los individuos fueron recolectados de la estación experimental "Julio Hirschhorn" (Facultad de Cs. Agrarias y Forestales, UNLP) y mantenidos en cuarentena para evitar el desarrollo de enfermedades. Esta colonia se utilizó como "colonia susceptible" para poder compararla con las provenientes de campo.

- La colonia de campo PN (piretroides y neonicotinoides), estuvo representada por la progenie de la primera generación de individuos recolectados en cultivos con una larga historia de aplicaciones de plaguicidas piretroides (cipermetrina, deltametrina, lambdacialotrina), y neonicotinoides (imidacloprid, tiametoxán y acetamiprid). Los ejemplares fueron recolectados del establecimiento Maita (34°91'58,46" S, 58°02'22,11" O).

- La colonia de campo B (botánicos), compuesta por la primera generación de individuos provenientes de un establecimiento con manejo orgánico y aplicaciones periódicas del insecticida azadiractina. Los ejemplares fueron recolectados del establecimiento La Anunciación (34°94'37,19" S, 58°12'99,69" O).

A su vez, se desarrolló en laboratorio, la colonia de *C. asoralis*. La misma estuvo representada por ejemplares criados por varias generaciones y sin exposición a plaguicidas, recolectados de cultivos con uso racional de insecticidas. Los ejemplares fueron recolectados del establecimiento Simonetti (34°90'65,70" S, 58°14'25,70" O).

Las distintas poblaciones se mantuvieron en recipientes de plástico transparente de 18 cm de diámetro por 15 cm de alto, ventilados. Los adultos fueron alimentados con dieta artificial (Vogt *et al.* 2000) y se les suministraron bebederos plásticos con agua

destilada, de 10 ml de capacidad, cerrados en su parte superior con Parafilm® el cual se perforó y se colocaron tiras de esponja amarilla con el fin de que el material esponjoso sirva de absorción de agua por los individuos. Se les proporcionaron cartulinas negras a cada recipiente para facilitar la extracción de huevos.

Las larvas fueron alimentadas con el “pulgón de los cereales” *Ropalosiphum padi* L. (Hemiptera: Aphididae) y con dieta artificial, provista como complemento dietario. Al llegar al segundo estadio larval avanzado o tercer estadio, se individualizaron en cápsulas plásticas ventiladas, de 2 cm de diámetro por 1 cm de alto, con el fin de evitar el canibalismo. Una vez alcanzado el estado de pupa y emergidos los adultos, se formaron parejas que, mediante la observación de los órganos genitales externos a través de una lupa binocular, fueron identificadas según su sexo.

*II.1.2.ii. Cría y mantenimiento del pulgón de los cereales *Ropalosiphum padi**

La cría del pulgón *R. padi* se inició con clones de individuos provistos por la Ing. Agr. Mónica Ricci. Se utilizaron plantines de trigo, variedad ACA901, como planta hospedadora. Las semillas fueron embebidas en agua durante un mínimo de 48 h a fin de promover la brotación, luego fueron colocadas en macetas, utilizando como sustrato tierra y perlita en proporción 4:1. Las mismas se colocaron en recipientes transparentes y ventilados, de 40 cm de largo, 30 cm de ancho y 25 cm de alto. Las semillas de trigo fueron suministradas por el Ing. Agr. Carlos Bainotti (INTA Marcos Juárez) y el Ing. Agr. Carlos Junquera (Asociación Semilleros Argentinos).

II.1.2.iii. Condiciones de cría de insectos y bioensayos

La cría de insectos y bioensayos fueron llevados a cabo en un bioterio con condiciones controladas: temperatura (25 ± 2 °C), humedad relativa ($70 \pm 5\%$) y fotoperíodo (16:8 L:O). Dichas condiciones se lograron con un split para la regulación de la temperatura, humidificador y *timer*, y fueron controladas con un termómetro/higrómetro digital.

II.2. Diseño experimental

Los ensayos sobre las especies de crisópidos consistieron en la aplicación de insecticidas, considerando distintos estados de desarrollo y mediante tratamiento tópico. Se prepararon soluciones basándose en las Máximas Concentraciones Recomendadas de Campo (MCRC) de cada insecticida, y luego se obtuvieron diluciones de las mismas. El ingrediente activo de los insecticidas, nombre comercial pureza, MCRC y fabricante, se indican en la Tabla II.1.

Tabla II.1: insecticidas utilizados en los experimentos de *Chrysoperla externa* y *Chrysoperla asoralis*.

Ingrediente activo	Nombre comercial	Pureza (p/v)	MCRC (mg i.a./L)	Fabricante
Cipermetrina	Glextrin®	25%	25	GLEBA S.A.
Acetamiprid	Mospilan®	20%	200	SUMMIT AGRO
Piriproxifén	Epingle®	10%	75	SUMMIT AGRO
Azadiractina	Neem-Azal®	1,2%	40	AGRISTAR S.A.

En cuanto a la metodología de aplicación, el tratamiento tópico se realizó aplicando el insecticida de forma directa sobre el cuerpo del organismo. En el presente trabajo, la aplicación se llevó a cabo mediante una gota de 1 µl sobre la zona dorsal de las larvas y pupas, con una microjeringa provista de pulsador (Hamilton®, Suiza). Las soluciones de los insecticidas fueron preparadas con acetona grado analítico, por lo tanto los controles fueron realizados con acetona sola.

II.3. Análisis estadísticos

De manera general, se utilizó Análisis de la Varianza (ANOVA) previa evaluación de la normalidad y homocedasticidad de los datos con los tests de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Los datos (mortalidad, tiempo de desarrollo entre estados, período preoviposición, fecundidad, fertilidad) expresados como proporciones se transformaron según la ecuación $y = \sqrt{\arcsen x}$. Cuando los datos no cumplían con los supuestos del ANOVA, se realizó la transformación $y = \log(x+1)$. Siendo x , el dato a transformar.

Los datos transformados fueron nuevamente sometidos a las pruebas de normalidad y homocedasticidad y en el caso de cumplirse los supuestos, fueron analizados a través del test de ANOVA. En caso contrario se procedió a la realización del test no-paramétrico Kruskal-Wallis. Las medias y medianas fueron analizadas a través del test de Fisher (LSD) o el test de Dunn según el análisis (Scheiner & Gurevitch 2001). El nivel de significancia para todos los análisis fue $P < 0,05$. El programa estadístico utilizado fue XLSTATSTART.exe (2014).



Figura II.2: fotografías de zona de muestreo, cría y alimentación de *Chrysoperla externa*. Microaplicador Hamilton® con el cual se llevaron a cabo las aplicaciones tóxicas.

CAPÍTULO III

ESTUDIO DE LAS ESPECIES DE *CHRYSOPERLA* STEINMANN (1964) PRESENTES EN EL CINTURÓN HORTÍCOLA PLATENSE

III.1. Introducción

Las crisopas son eficientes depredadores utilizados en programas de control biológico para varias plagas, como áfidos, moscas blancas, trips, larvas de lepidópteros y cochinillas (Brooks 1994; Bento *et al.* 1997; Urbaneja *et al.* 1999). Hasta el año 2013, en Argentina han sido reconocidas las siguientes especies de *Chrysoperla* Steimann, 1964: *C. externa* (Hagen, 1861), *C. asoralis* (Banks, 1915), *C. argentina* (González Olazo & Reguilón 2002) and *C. defreitasi* (Brooks 1994) (Montserrat & de Freitas 2005). *C. externa* tiene una distribución neotropical muy amplia, y en Argentina se encuentra desde las provincias del norte hasta la Patagonia (Adams & Penny 1987); la distribución de *C. asoralis* es similar desde el norte hasta la región Patagónica (González Olazo & Heredia 2007; González *et al.* 2011); sin embargo *C. argentina* ha sido registrada sólo en las provincias de Salta, Chaco, La Rioja y Tucumán (González Olazo & Reguilón 2002; Reguilón *et al.* 2006). *C. defreitasi* se encuentra exclusivamente en la eco-región de las Yungas en el noreste argentino (González *et al.* 2011) y norte de Patagonia (Montserrat & de Freitas 2005). En la Fig. III.1 puede observarse la distribución actual reportada de *C. argentina* y *C. asoralis* en Argentina, la primera en las provincias de Chaco, Salta, Tucumán, La Rioja y Buenos Aires; la segunda en Chaco, Salta, Jujuy, Tucumán, La Rioja, Mendoza, Neuquén, Río Negro y Buenos Aires.

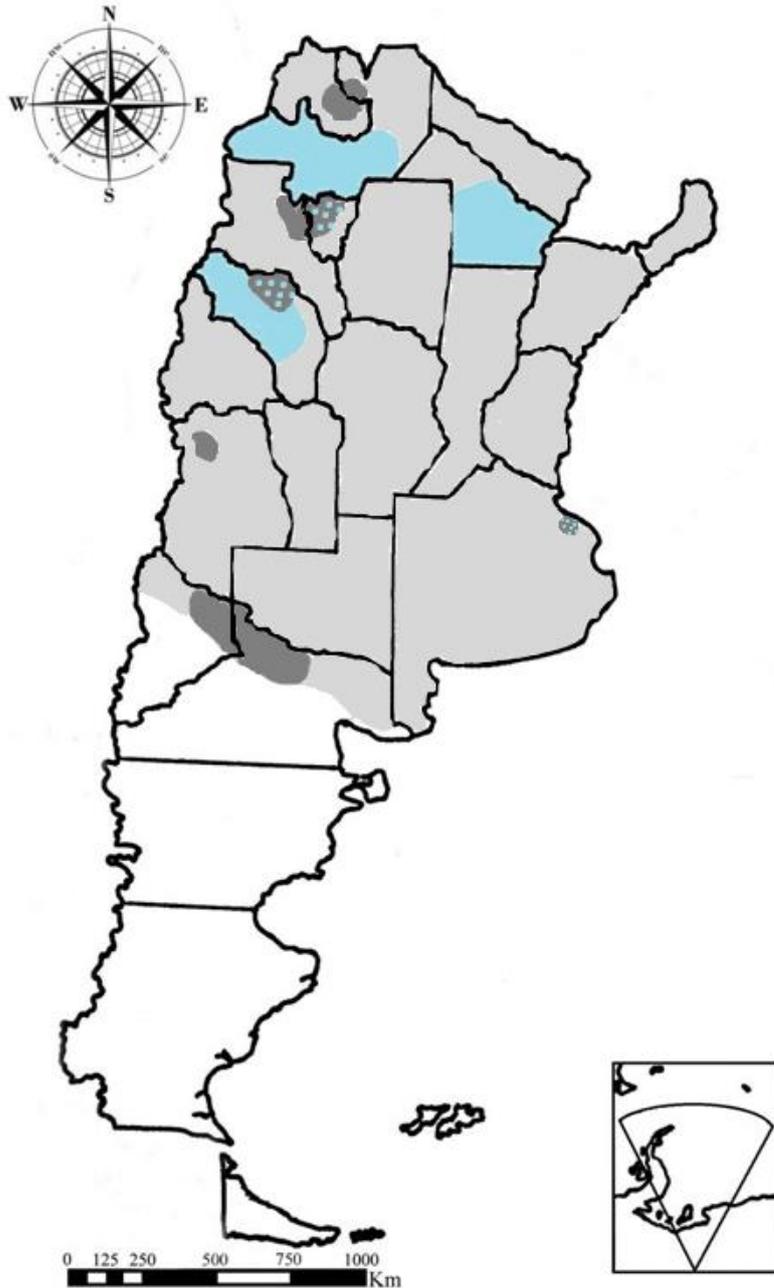


Figura III.1: distribución de *Chrysoperla argentina* (celeste), *Chrysoperla asoralis* (gris oscuro) y *Chrysoperla externa* (gris claro) en Argentina.

La especie más estudiada ha sido *C. externa*, con numerosos trabajos ecotoxicológicos y de susceptibilidad a plaguicidas en años recientes (Iannacone & Lamas 2002; Silva *et al.* 2006; Rimoldi *et al.* 2008, 2012; Schneider *et al.* 2009; Moura *et al.* 2012). La cría masiva y subsiguiente liberación en campo de esta especie ha sido promovida en

varios países de Sudamérica (Vargas 1988; Daanel & Yokota 1997; Carvalho *et al.* 2002; Pappas *et al.* 2011).

El Cinturón Hortícola Platense (CHP) es una de las zonas hortícolas más extensas de la provincia de Buenos Aires, ocupando un 65% del área cultivada bajo cubierta (Censo Hortiflorícola, 2005). El pimiento (*Capsicum annuum* L.) es uno de los principales cultivos de la región. Esta planta es atacada por numerosos insectos plaga, como el pulgón verde del duraznero *Myzus persicae* (Sulzer) (Barbosa *et al.* 2008) y la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Genadius). Ambas plagas son de importancia económica por sus efectos directos sobre la planta mediante la succión del floema y por ser vectores de virus patógenos.

En los agroecosistemas de La Plata se ha detectado la presencia de *C. externa* tanto en cultivos orgánicos como convencionales en asociación con dichas especies plaga. El objetivo del presente trabajo fue relevar las distintas especies de *Chrysoperla* presentes en los cultivos de pimiento del CHP.

III.2. Materiales y métodos

III.2.1. Colecta de especies en el CHP

Durante los años 2012 y 2013 se realizaron colectas en un predio del CHP, en cultivos de pimiento bajo cubierta, donde se practica manejo integrado, con aplicaciones de insecticidas selectivos (34°90'65,7" S, 58°14'25,7" O). Las colectas se llevaron a cabo con redes entomológicas y con un aspirador.

III.2.2. Identificación taxonómica de ejemplares de Chrysopidae

Los ejemplares (huevos y adultos de la F1) se mantuvieron vivos en una colonia en laboratorio hasta su preparación para ser enviados a identificar. Luego fueron enviados al Instituto de Entomología, Fundación Miguel Lillo (Tucumán, Argentina) donde la Dra. Carmen Reguilón llevó a cabo la identificación taxonómica (González Olazo & Reguilón 2002; Reguilón *et al.* 2006; González Olazo *et al.* 2009). Los estadios larvales se enviaron en alcohol 65% y los adultos en seco, luego de congelados. Para la

identificación se usaron claves taxonómicas basadas en rasgos característicos y distintivos entre especies, por ejemplo las manchas cefálicas de larvas de todos los estadios, y diferencias en las genas, manchas postoculares y venillas gradadas del ala anterior de los adultos.

III.3. Resultados

Se recolectaron unos 60 individuos adultos y 35 huevos durante las tres colectas (Tabla III.1), cuya F1 fue identificada como *C. externa*, *C. asoralis* y *C. argentina*. Las últimas dos especies no habían sido citadas para el CHP ni registradas en asociación al cultivo de pimiento, por lo que se amplió su distribución y su nueva asociación con *C. annuum*. Dentro de las características más distintivas de los estadios larvales y adultos de las 3 especies registradas, las más conspicuas son las coloraciones en la zona cefálica. El estadio larval de *C. asoralis* tiene una mancha cefálica anterodorsal media redondeada, con dos prolongaciones laterales y una prolongación ovalada anterior, y marcas laterodorsales gruesas paralelas. *C. argentina* tiene marcas anterodorsales estrechas no bifurcadas anteriormente. *C. externa* muestra una marca anterodorsal media posteriormente bifurcada, y marcas laterodorsales amplias bifurcadas anteriormente en dos ramas (Fig. III.2). Los adultos de *C. asoralis* tienen en el pronoto dos manchas rojas postoculares y genas rojas; *C. externa* exhibe líneas postoculares rojas y genas rojas y *C. argentina* carece de manchas postoculares y tiene genas pardas (Fig. III.3).

Tabla III.1: Frecuencia de recolecciones con número de ejemplares encontrados.

Fecha de colecta	Ejemplares adultos	Huevos
Diciembre 2012	37	20
Enero 2012	23	15
Marzo 2013	1	0



Figura III.2: larvas de *Chrysoperla* recolectadas en el CHP. a) *C. asoralis*; b) *C. argentina*; c) *C. externa*. Los círculos indican las manchas cefálicas usadas para la identificación taxonómica.

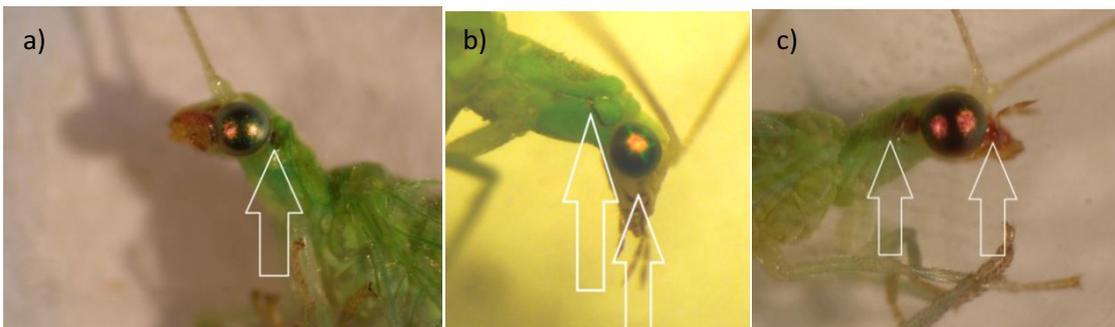


Figura III.3: adultos de *Chrysoperla* recolectadas en el CHP. a) *C. asoralis*; b) *C. argentina*; c) *C. externa*. Las flechas indican las genas y manchas postoculares usadas para la identificación taxonómica.

III.4. Discusión

Según González *et al.* (2011), la especie *C. asoralis* podría estar desplazando a *C. externa*, debido al gran número de individuos encontrados en diversas locaciones. Aunque hacen falta más estudios para corroborar esta hipótesis en la provincia de Buenos Aires, el muestreo llevado a cabo en el CHP durante un período de dos años indicó que *C. asoralis* fue más abundante que *C. externa*, en el predio muestreado.

La asociación de *C. asoralis* con el cultivo de pimiento estaría indicando que esta especie formaría parte de la fauna benéfica que controla naturalmente las plagas asociadas a este cultivo. Esto favorecería la posibilidad de incluirla en programas de MIP. Estos estudios son importantes para ampliar la información de la biología y taxonomía de las especies de *Chrysoperla* ya que son potenciales agentes de control biológico.

Se amplió la distribución de las especies *C. argentina* y *C. asoralis* en Argentina, citándolas por primera vez en el CHP, provincia de Buenos Aires, y en asociación con el cultivo de pimiento.

CAPÍTULO IV

TOXICIDAD DE INSECTICIDAS EN POBLACIONES DE CAMPO Y LABORATORIO DE *CHRYSOPERLA EXTERNA* (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE)

IV.1. Introducción

El control biológico y el uso de insecticidas selectivos han probado ser tácticas compatibles en el MIP (Kogan 1998; Galvan *et al.* 2005). Aunque el control químico debería ser la última opción en la lucha contra las plagas, muchos agroecosistemas todavía dependen de la aplicación de insecticidas, por lo cual es indispensable estudiar su toxicidad hacia organismos benéficos (Shinde *et al.* 2009). En este caso, *Chrysoperla externa*. Con el fin de maximizar la compatibilidad entre enemigos naturales e insecticidas, es necesario llevar a cabo estudios de riesgo, selectividad y condiciones de uso de los insecticidas (Desneux *et al.* 2007).

Los insecticidas utilizados fueron seleccionados según su utilización frecuente en los campos muestreados. El piretroide cipermetrina ha sido utilizado de manera indiscriminada, provocando efectos negativos, entre ellos, la aparición de resistencia en plagas (Zhong *et al.* 2013). En la década del 90' comenzaron a comercializarse los neonicotinoides, los cuales fueron clasificados en un primer momento como insecticidas biorracionales por su baja toxicidad en organismos no blanco. Sin embargo, estudios posteriores demostraron su alta toxicidad con lo cual la clasificación del mismo está siendo reconsiderada (EPA). El bioplaguicida azadiractina es un insecticida biorracional, con baja toxicidad para vertebrados, selectivo y con baja residualidad, sin embargo todavía su modo de acción y biosíntesis requieren de estudios más profundos (Mordue 2004).

El objetivo de este capítulo fue evaluar los efectos letales y subletales de cipermetrina, acetamiprid y azadiractina en poblaciones de campo y en una colonia de laboratorio de *C. externa*, a través de la mortalidad, período intermuda, período preoviposición, fecundidad y fertilidad. Con estos estudios se evaluó la respuesta toxicológica de estos individuos.

IV.2. Materiales y métodos

IV.2.1. Insectos

Se usaron individuos provenientes de las colonias de laboratorio PN y B, cuya producción fue descrita en el Capítulo II; sección II.1.2. La colonia de campo PN, estuvo representada por la progenie de individuos recolectados en un campo con una larga historia de aplicaciones periódicas de plaguicidas piretroides e insecticidas neonicotinoides. La colonia de campo B, provino de un establecimiento con manejo orgánico con aplicaciones periódicas de azadiractina.

IV.2.2. Insecticidas, preparación de soluciones

Se utilizaron las Máximas Concentraciones Recomendadas de Campo (MCRC) y varias diluciones, de los siguientes formulados comerciales: Glextrin® (25% p/v cipermetrina, Gleba S.A.), Mospilan® (20% p/p acetamiprid, Summit-Agro S.A.) y Neem Azal® (1,2% p/v azadiractina, Agristar S.A.) (CASAFE 2015) (Tabla IV.1).

Tabla IV.1: insecticidas utilizados en los ensayos sobre el tercer estadio larval de distintas colonias de *Chrysoperla externa*. * Indica la MCRC de cada insecticida.

Colonia tratada	Ingrediente activo	Concentraciones (mg i.a./L)	Porcentajes relativos a las MCRC	Nomenclatura utilizada en Resultados
Laboratorio PN	Cipermetrina	12.5	50%	Ciper 50
		25*	100%	Ciper 100
		37,5	150%	Ciper 150
Laboratorio PN	Acetamiprid	100	50%	Acet 50
		200*	100%	Acet 100
		250	150%	Acet 150
Laboratorio B	Azadiractina	20	50%	Aza 50
		40*	100%	Aza 100
		60	150%	Aza 150

IV.2.3. Ensayos de toxicidad sobre larvas del tercer estadio

Para la evaluación de la toxicidad de los diferentes insecticidas a *C. externa* se llevaron a cabo ensayos con larvas del tercer estadio, recientemente mudadas, de menos de 24 h de edad. Las larvas fueron tratadas individualmente de manera tópica, utilizando una microjeringa provista de pulsador (Hamilton®, Suiza). Se aplicó una gota de 1 µl de la solución de trabajo en la zona dorsal del abdomen. Las diluciones y el control se llevaron a cabo con acetona grado analítico con el fin de asegurar un rápido secado y una pareja deposición del insecticida sobre la superficie de la larva. Se realizaron 30 réplicas por tratamiento.

Las larvas tratadas fueron colocadas en pequeñas cápsulas de 1 cm de diámetro por 2 cm de altura. Se realizó un control diario para suministrar el alimento, *R. padi ad libitum* y dieta artificial, y registrar la supervivencia de cada estado larval y pupa.

En aquellos tratamientos en los que los individuos pudieron completar su ciclo de desarrollo, se determinó el sexo de los adultos y se formaron parejas para registrar la fecundidad y fertilidad de las hembras, durante los primeros 5 días de oviposición. Las parejas fueron colocadas en recipientes de 6 cm de alto y 4 cm de diámetro y se les suplementó dieta artificial como alimento y agua de beber. Se colocó un trozo de cartulina negra en el interior de los recipientes para facilitar la extracción y conteo de huevos. Los mismos se colocaron en cápsulas de Petri y fueron controlados, durante 10 días consecutivos, para registrar la emergencia de larvas.

En este experimento las variables en estudio fueron fecundidad y fertilidad acumuladas durante 5 días por hembra. Este experimento fue llevado a cabo en condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperiodo (25 ± 2 °C; $70 \pm 5\%$; 16:8 L:O).

IV.2.4. Análisis estadístico

La mortalidad de larvas y pupas, período intermuda de larva a pupa y de pupa a adulto, fecundidad y fertilidad acumuladas, fueron analizados con un Análisis de la Varianza Multifactorial, para cada insecticida. Los factores evaluados fueron *colonia* y

concentración. Se analizó previamente la normalidad y homoscedasticidad de los datos con los test de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. El nivel de significancia para todos los análisis fue $P < 0,05$. De no haber diferencias significativas en alguno de los dos factores, el software sólo evaluó las diferencias entre los distintos niveles del factor que sí fue significativo. Se utilizó el programa estadístico XLSTATSTART.exe (2014).

IV.3. Resultados

IV.3.1. Cipermetrina

Con el insecticida cipermetrina pudieron estimarse la fecundidad y la fertilidad, ya que suficientes individuos alcanzaron el estado adulto (Tabla IV.2).

IV.3.1.1. Mortalidad larval

Los factores no tuvieron una interacción significativa (Tabla IV.2). Las colonias no difirieron entre sí, pero las distintas concentraciones de cipermetrina produjeron una mortalidad significativa respecto del control, siendo Ciper 150 la que presentó una mortalidad mayor (Fig. IV.1). Dicho tratamiento produjo un 60% de mortalidad respecto de las demás concentraciones que produjeron un 30%.

IV.3.1.2. Mortalidad pupal

Las larvas expuestas a todas las concentraciones y que sobrevivieron hasta el final del estadio y pudieron pupar, sobrevivieron en un 100% en el estado de pupa (datos no graficados).

Tabla IV.2: Anova multifactorial con distintas concentraciones de cipermetrina.

<i>Fuente de variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>F</i>	<i>P-Value</i>
<i>A: Mortalidad en estadio larval</i>			
Colonia	1	0,25	0,62
Concentración	2	4,74	0,03
Colonia x concentración	2	0,56	0,58
<i>B: período L3 – P</i>			
Colonia	1	3,53	0,06
Concentración	3	8,26	< 0,001
Colonia x concentración	3	1,85	0,13
<i>C: período P - A</i>			
Colonia	1	1,82	0,17
Concentración	3	3,37	0,02
Colonia x concentración	3	6,09	< 0,001
<i>D: fecundidad acumulada</i>			
Colonia	1	0,06	0,81
Concentración	1	1,09	0,31
Colonia x concentración	1	0,09	0,76
<i>E: fertilidad acumulada</i>			
Colonia	1	0,002	0,98
Concentración	1	0,04	0,85
Colonia x concentración	1	0,01	0,93

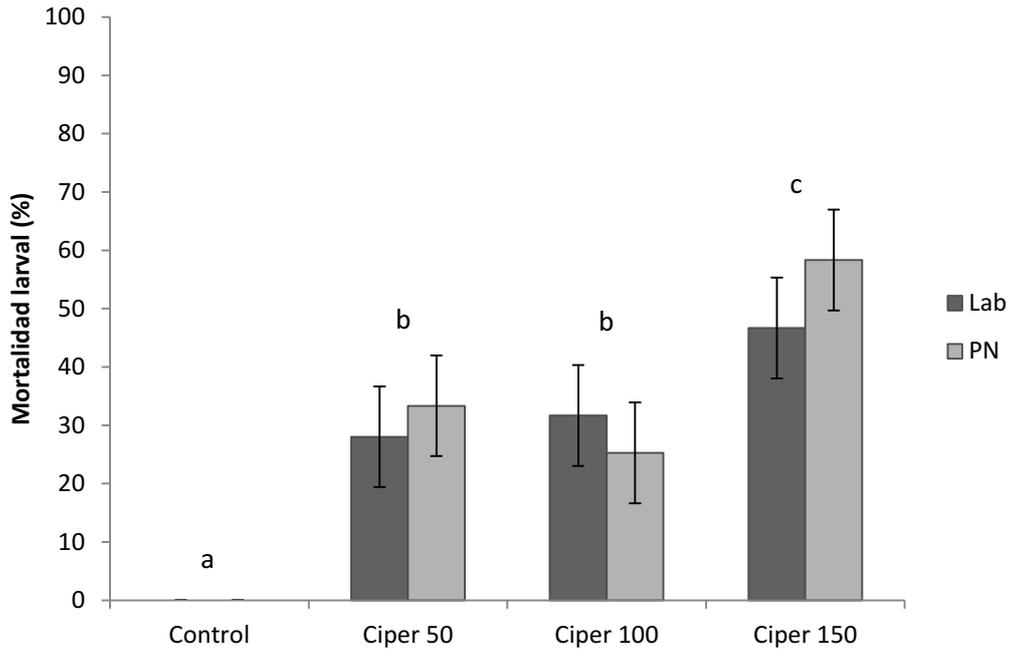


Figura IV.1: Mortalidad larval de las colonias de campo PN y laboratorio con las distintas concentraciones de cipermetrina. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos (al no haber significancia entre colonias, los datos de ambas fueron analizados en conjunto para las pruebas *a posteriori*) ($P < 0,05$)

IV.3.1.3. Período intermuda tercer estadio larval – estado pupal

Los factores no presentaron interacción significativa (Tabla IV.2). Las colonias no tuvieron diferencias significativas entre sí, pero todas las concentraciones alargaron el tiempo de desarrollo larval respecto al control (Fig. IV.2).

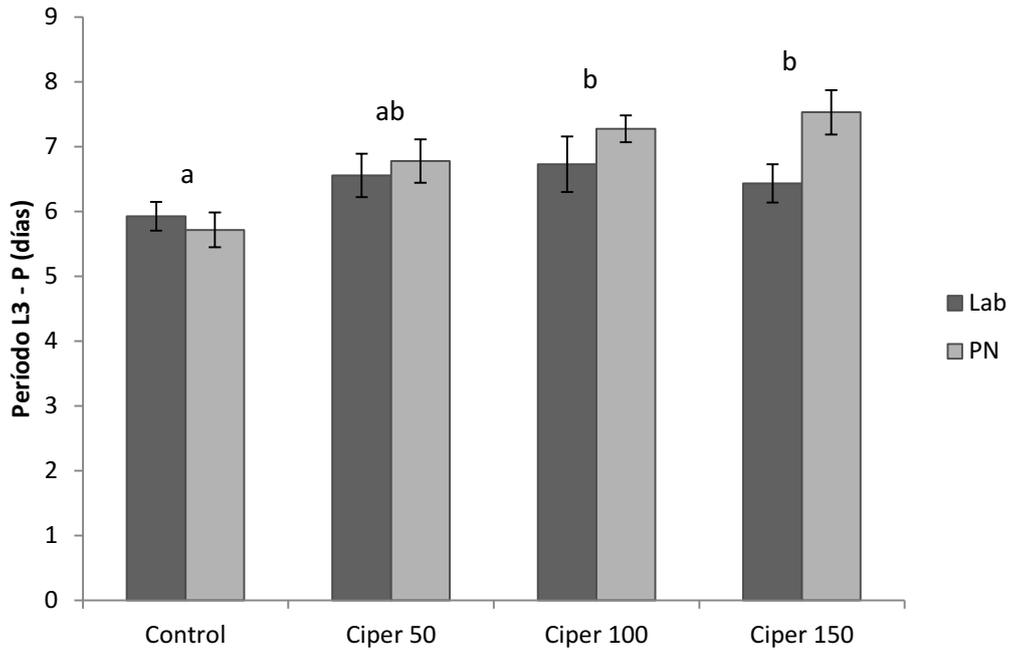


Figura IV.2: Período intermuda tercer estadio larval – estado pupal, de las colonias de campo PN y laboratorio con las distintas concentraciones de cipermetrina. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos (al no haber significancia entre colonias, los datos de ambas fueron analizados en conjunto para las pruebas *a posteriori*) ($P < 0,05$)

IV.3.1.4. Período intermuda estado pupal – estado adulto

Hubo interacción significativa entre los factores colonia y concentración (Tabla IV.2), por lo tanto el período intermuda de cada colonia depende de las distintas concentraciones. En la colonia de laboratorio se acortó significativamente el período con todas las concentraciones de cipermetrina (Fig. IV.3). En la colonia PN, Ciper 50 alarga el período pupal de manera significativa respecto al control, el cual no difiere de las demás concentraciones.

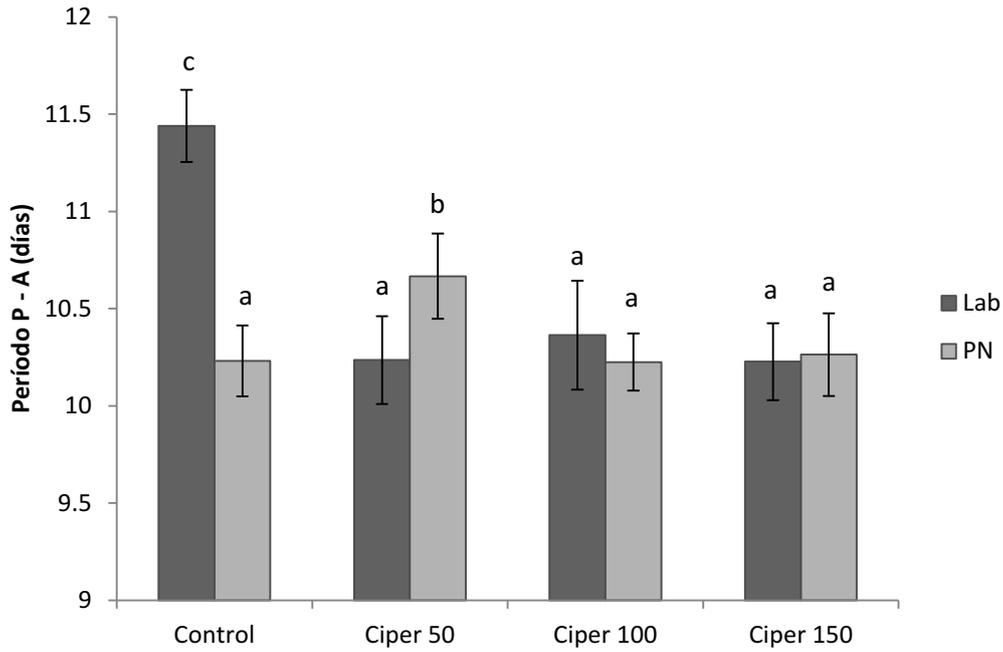


Figura IV.3: Período intermuda pupa – adulto, de las colonias de campo PN y laboratorio con las distintas concentraciones de cipermetrina. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$)

IV.3.1.5. Parámetros reproductivos

No hubo interacción significativa entre factores para la fecundidad y fertilidad de los individuos tratados con cipermetrina (Tabla IV.2). La concentración de Ciper 100 no afectó estos parámetros y no hubo diferencias significativas entre colonias (Tabla IV.3).

Tabla IV.3: fecundidad y fertilidad de hembras con el tratamiento con cipermetrina. Los datos son las medias \pm ES. Las letras iguales denotan que no hubieron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$)

Parámetros reproductivos	Control	Ciper 100
Fecundidad (n°huevos/hembra)	136,8 \pm 18,16 a	113,3 \pm 11,16 a
Fertilidad (n°larvas/total de huevos)	64 \pm 0,17 a	63 \pm 0,16 a

IV.3.2. Acetamiprid

IV.3.2.1. Mortalidad de larvas

No hubo interacción significativa entre el factor colonia y el factor tratamiento (Tabla IV.4). Las colonias de laboratorio y de campo no tuvieron diferencias significativas en cuanto a la mortalidad larval pero ésta fue influida por las distintas concentraciones del insecticida. Hubo una mortalidad significativa en todas las concentraciones respecto del control, y Acet 150 provocó la mayor mortalidad con un 70% de larvas afectadas (Fig. IV.4).

Tabla IV.4: Anova multifactorial con distintas concentraciones de acetamiprid.

<i>Fuente de variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>F</i>	<i>P-Value</i>
<i>A: Mortalidad en estadio larval</i>			
Colonia	1	0,55	0,47
Concentración	3	5,03	0,02
Colonia x concentración	3	1,13	0,35
<i>B: Mortalidad en estado pupal</i>			
Colonia	1	0,27	0,61
Concentración	3	33,39	< 0,001
Colonia x concentración	3	0,59	0,62
<i>C: período L3 – P</i>			
Colonia	1	3	0,08
Concentración	3	8,75	< 0,001
Colonia x concentración	3	1,26	0,28

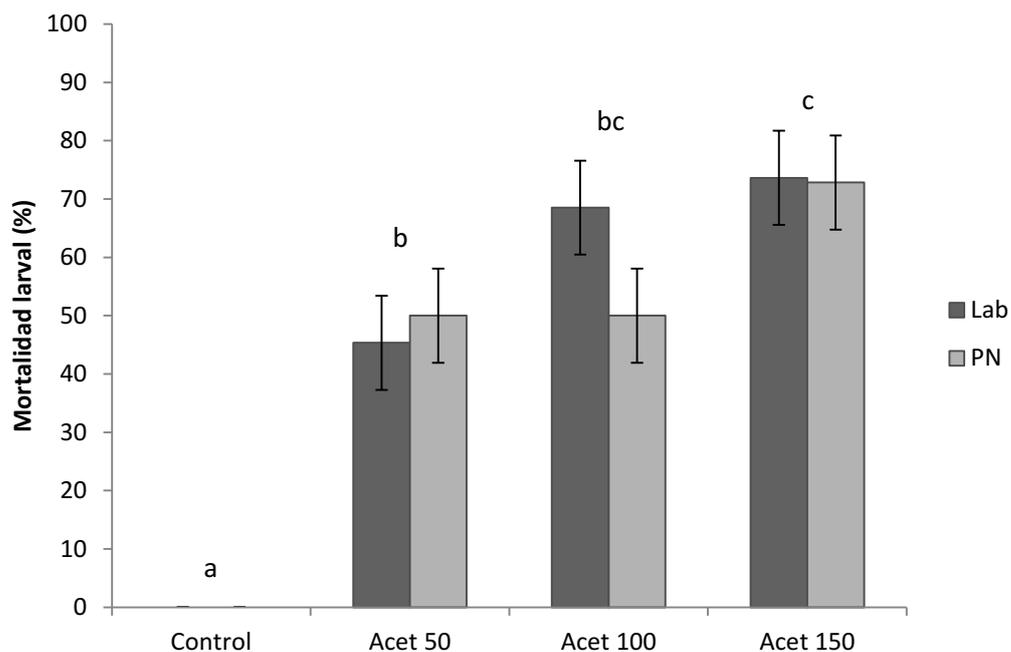


Figura IV.4: Mortalidad larval de las colonias de campo PN y laboratorio con las distintas concentraciones de acetamiprid. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos (al no haber significancia entre colonias, los datos de ambas fueron analizados en conjunto para las pruebas *a posteriori*) ($P < 0,05$)

IV.3.2.2. Mortalidad de pupas

La mortalidad en el estado de pupa tampoco fue influida por las colonias, pero sí por las concentraciones del insecticida (Tabla IV.4). Para este estado de desarrollo de *C. externa*, todas las concentraciones fueron significativamente diferentes del control y Acet 150 provocó la mayor mortalidad que fue de un 50% (Fig. IV.5).

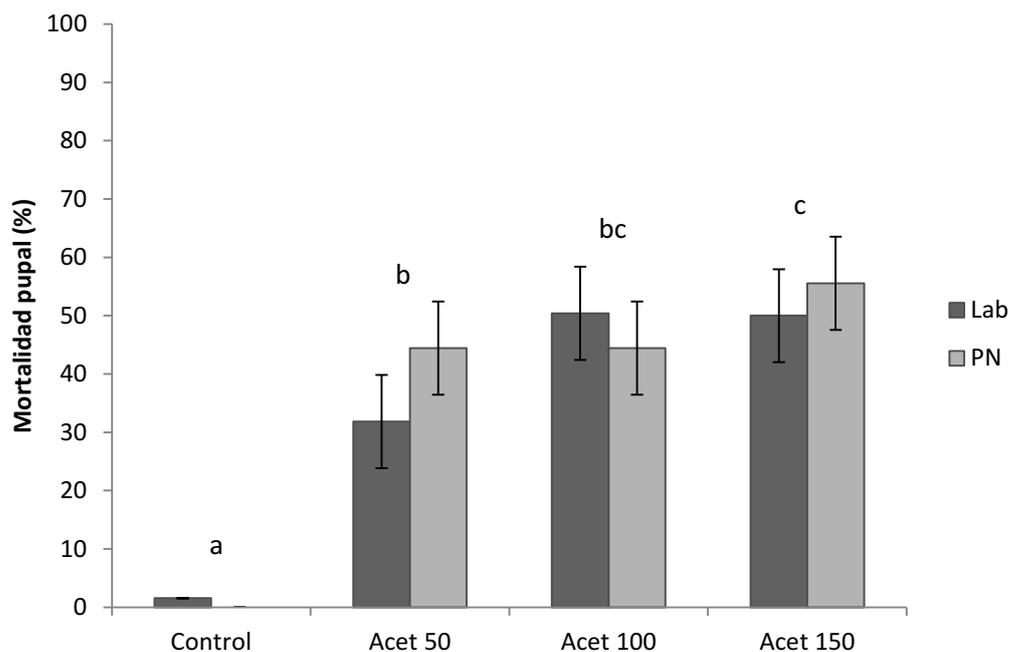


Figura IV.5: Mortalidad pupal de las colonias de campo PN y laboratorio con las distintas concentraciones de acetamiprid. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos (al no haber significancia entre colonias, los datos de ambas fueron analizados en conjunto para las pruebas *a posteriori*) ($P < 0,05$)

IV.3.2.3. Período intermuda tercer estadio larval – estado pupal

No hubo interacción significativa entre factores (Tabla IV.4). El período de desarrollo de larva a pupa se incrementó con las distintas concentraciones de acetamiprid, siendo máximo con la concentración Acet 100 y Acet 150. Las colonias no tuvieron diferencias significativas entre sí (Fig. IV.6).

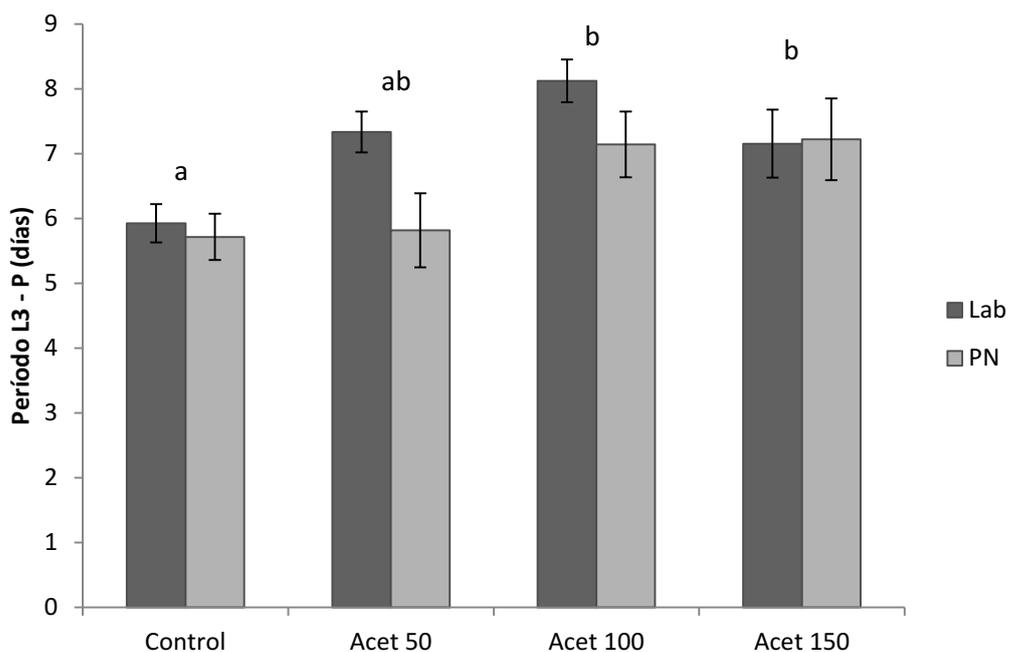


Figura IV.6. período intermuda tercer estadio larval – estado pupal, de las colonias de campo PN y laboratorio con las distintas concentraciones de acetamiprid. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES Letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos (al no haber significancia entre colonias, los datos de ambas fueron analizados en conjunto para las pruebas *a posteriori*) ($P < 0,05$)

IV.3.2.4. Parámetros reproductivos

Al haber una gran mortalidad dentro del estado pupal, no se llegó a la cantidad necesaria de adultos para medir el período preoviposición, fecundidad ni fertilidad.

IV.3.3. Azadiractina

IV.3.3.1. Mortalidad larval

Las larvas tratadas con azadiractina, tanto de la colonia de laboratorio como de la colonia B, no se vieron afectadas en cuanto a su mortalidad, con ninguna de las concentraciones estudiadas (Tabla IV.5 y Fig. IV.7).

Tabla IV.5. Anova multifactorial con distintas concentraciones de azadiractina.

<i>Fuente de variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>F</i>	<i>P-Value</i>
<i>A: Mortalidad en estadio larval</i>			
Colonia	1	1,19	0,29
Concentración	3	2,72	0,11
Colonia x concentración	3	0,38	0,69
<i>B: Mortalidad en estado pupal</i>			
Colonia	1	0,27	0,61
Concentración	3	5280,23	< 0,001
Colonia x concentración	3	0,34	0,85
<i>C: período L3 – P</i>			
Colonia	1	3,34	0,07
Concentración	3	3,82	0,01
Colonia x concentración	3	13,65	< 0,001

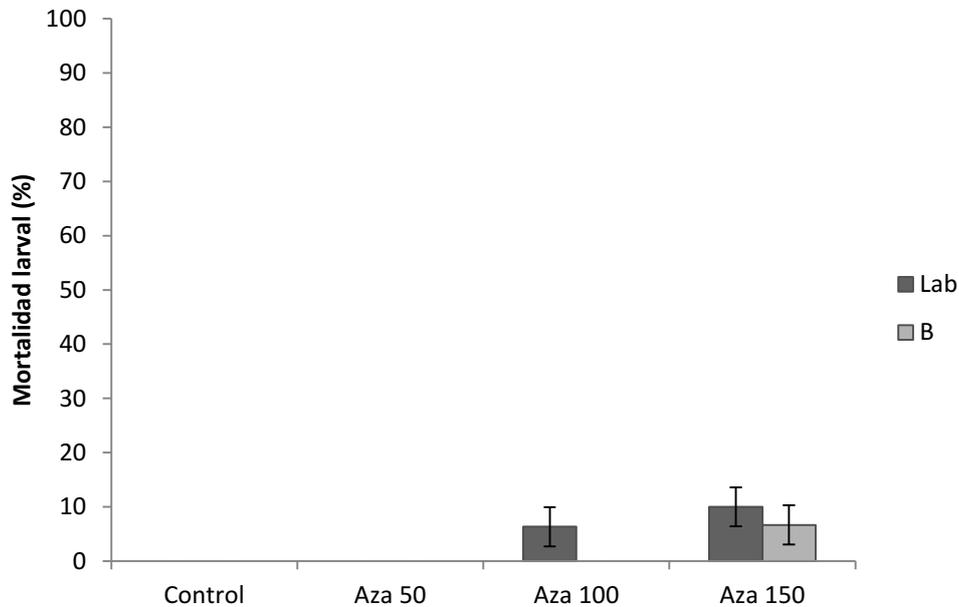


Figura IV.7: Mortalidad larval de las colonias de campo B y laboratorio con las distintas concentraciones de azadiractina. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. No hubieron diferencias significativas entre tratamientos ni entre colonias ($P < 0,05$)

IV.3.3.2. Mortalidad pupal

No hubo interacción significativa entre los factores (Tabla IV.5). Las colonias no difirieron entre sí y ambas tuvieron un 100% de mortalidad con todas las concentraciones de azadiractina, y un 0% con el control (Figura IV.8).

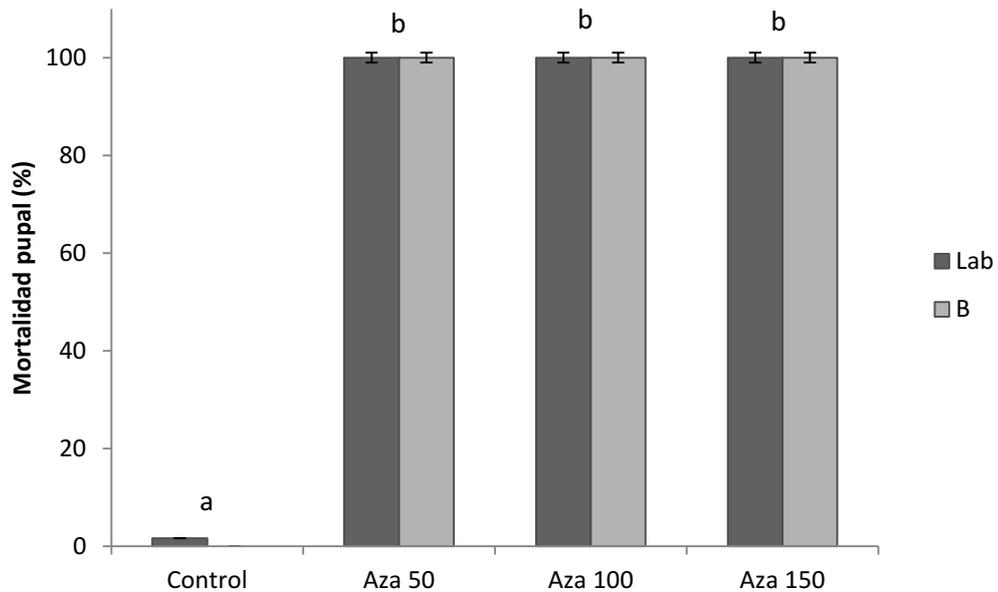


Figura IV.8: Mortalidad pupal de las colonias de campo B y laboratorio con las distintas concentraciones de azadiractina. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos (al no haber significancia entre colonias, los datos de ambas fueron analizados en conjunto para las pruebas *a posteriori*) ($P < 0,05$)

IV.3.3.3. Período intermuda tercer estadio larval – estado pupal

Hubo interacción significativa entre los factores colonia y concentración (Tabla IV.5), por lo tanto el período intermuda de cada colonia depende de las distintas concentraciones. En la colonia de laboratorio se ve la tendencia a disminuir este tiempo intermuda a medida que las concentraciones aumentan (Fig. IV.9). La colonia B, por el contrario, presentó un período más largo con Aza 150.

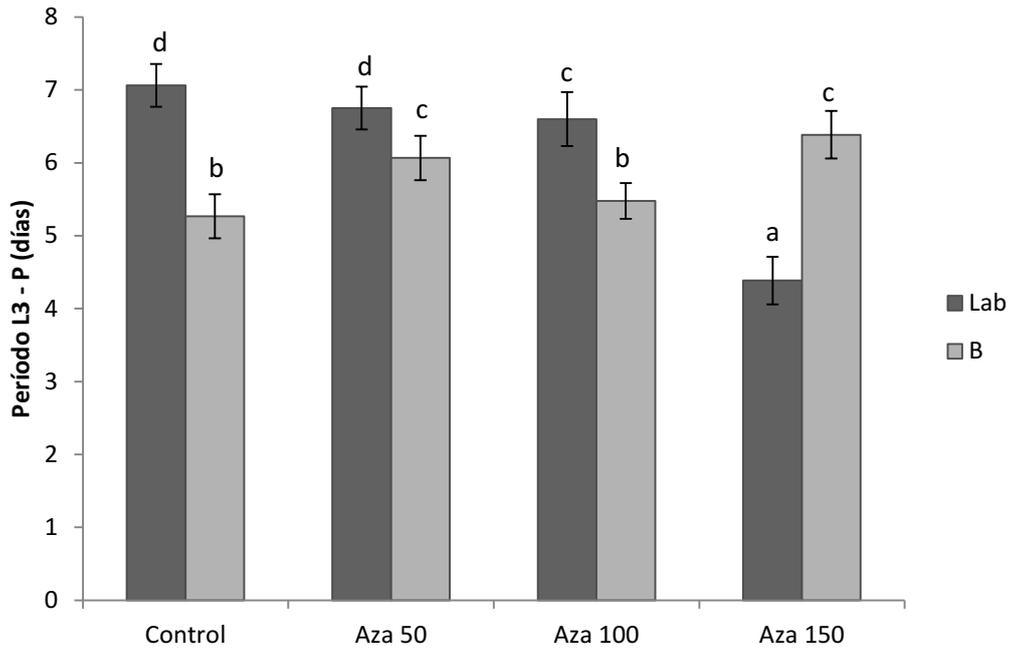


Figura IV.9: Período intermuda tercer estadio larval – estado pupal, de las colonias de campo B y laboratorio con las distintas concentraciones de cipermetrina. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$)

IV.3.3.4. Parámetros reproductivos

Al haber una gran mortalidad dentro del estado pupal, no se llegó a la cantidad necesaria de adultos para medir el período preoviposición, fecundidad ni fertilidad.

IV.4. Discusión

En los programas de MIP, se recomienda como última instancia la utilización de insecticidas cuando las demás estrategias no logran el control eficiente de la plaga (Kogan 1998). En este caso se aconseja el uso de insecticidas biorracionales, los cuales son selectivos, con una baja residualidad y “amigables” con el ambiente (Ishaaya & Horowitz 2009). La industria agroquímica se encuentra continuamente desarrollando nuevos productos para la lucha contra las plagas, los cuales deberían ser evaluados también en enemigos naturales y polinizadores, antes de ser lanzados al mercado (Desneux *et al.* 2007).

El neuróptero *C. externa* es considerado un eficiente depredador de plagas de la agricultura y es utilizado como agente de control biológico. Estudios previos han demostrado la tolerancia a insecticidas en esta especie por lo que podría ser un buen candidato en programas en los que se requieran ambos tipos de control (Moura *et al.* 2010).

El insecticida de amplio espectro cipermetrina ha sido objeto de muchos estudios sobre especies de crisopas, sobre todo en *C. carnea*. Se ha demostrado la tolerancia de esta especie a piretroides debido a una alta detoxificación enzimática y también se especuló con una supuesta resistencia a nivel de los canales de sodio dependientes de voltaje, aunque esto último no fue analizado en estudios posteriores (Ishaaya & Casida 1981; Bashir & Crowder 1983; Pree *et al.* 1989; Hoy 1990; Pathan *et al.* 2008; 2010; Sayyed *et al.* 2010). En el presente trabajo, los resultados fueron rotundos en cuanto a la tolerancia de *C. externa* a la MCRC así como concentraciones mayores de cipermetrina. La supervivencia de larvas tratadas fue igual que en el control. Es de destacar que el tercer estadio larval de crisópidos es el más resistente respecto al primer y segundo estadios, registrándose una mortalidad del 80% en larvas del segundo estadio (Sabry & El-Sayed 2011), y del 100% en neonatas de huevos tratados con cipermetrina (Rimoldi *et al.* 2008). No se registró mortalidad en el estado de pupa y la fecundidad y fertilidad en los adultos de larvas tratadas con la MCRC no fue diferente con el control, ni tampoco diferente entre colonias, probablemente debido a una detoxificación enzimática del piretroide durante el período larval. En este sentido, *C. externa* estaría presentando una elevada detoxificación del piretroide al igual que la especie Paleártica *C. carnea*.

Los resultados sobre el tercer estadio larval de *C. externa* demostraron una alta toxicidad del acetamiprid, tanto en poblaciones de campo como de laboratorio. Estos hallazgos coincidieron con trabajos realizados sobre *C. carnea*, donde varios insecticidas fueron evaluados sobre larvas de esta especie (Vivek *et al.* 2012) demostrándose que el acetamiprid resultó ser el más tóxico llegando a una mortalidad casi del 80% luego de 72 h de alimentadas con presa tratada. Shinde *et al.* (2009) observaron una mortalidad de *C. carnea* expuesta a acetamiprid de manera residual, que aumentó del 53% al 80%, a las 24 h y 72 h post-tratamiento, respectivamente. En

estudios de campo donde se evaluaron parámetros poblacionales de *Bemisia tabaci* y *C. carnea* en cultivos de algodón tratados con acetamiprid, se estimó una reducción del 36% en la población del depredador (Naranjo & Akey 2005). Otros organismos benéficos fueron considerados en numerosos trabajos, mostrando la alta toxicidad de este insecticida. Por ejemplo el coccinélido *Harmonia axyridis* (Pallas) mostró valores de DL₅₀ (Dosis Letal 50) mucho menores que las dosis recomendadas para el tratamiento de áfidos plaga, causando un 100% de mortalidad tanto en huevos, larvas y adultos con dosis de 40 mg i.a./L (Youn *et al.* 2003; Awasthi *et al.* 2013). Fogel *et al.* (2013) reportaron similares resultados para el depredador *Eriopis connexa* (Germar). En otros estudios de laboratorio, los depredadores *Orius laevigatus* (Fieber), *Macrolophus caliginosus* (Wagner) y *Amblyseius californicus* (McGregor) fueron afectados residualmente con los neonicotinoides acetamiprid y tiametoxán (Veire & Tirry 2003), al igual que *Podisus maculiventris* (Say) (Tillman & Mullinix 2004).

En cuanto a los efectos sobre el estado pupal de larvas tratadas con acetamiprid, se pudo registrar una disminución de la supervivencia total según las concentraciones crecientes del insecticida, demostrando que los efectos del mismo se mantienen en el tiempo incluso más de 10 días después del tratamiento tópico. Esto se vio reflejado en otros trabajos, por ejemplo sobre *E. connexa* tratada con acetamiprid, en el cuarto estadio larval, en donde se registró una disminución de los parámetros reproductivos en los adultos de larvas tratadas (Fogel *et al.* 2013). Estos autores mostraron así la importancia de los efectos subletales de este insecticida. Efectos negativos sobre la fecundidad de otros coleópteros depredadores como *Hippodamia undecimnotata* Schneider y *Rodolia cardinalis* Mulsant también fueron observados (Grafton-Cardwell & Gu 2003; Papachristos & Milonas 2008). La supuesta inocuidad del acetamiprid, explicada principalmente por su actividad sistémica que minimizaría el contacto residual (Tomizawa & Casida 2005), no sería soportada por estos estudios, para la especie *C. externa*.

El bioplaguicida azadiractina resultó ser altamente tóxico para larvas del tercer estadio de *C. externa*. En estudios sobre larvas de *C. carnea*, la azadiractina aplicada por ingestión fue el insecticida con la menor mortalidad con un 50%, incluso a altas dosis (Vivek *et al.* 2012), mientras que la aplicación tópica en larvas del tercer estadio

provocó efectos negativos sólo a altas dosis (Medina *et al.* 2003). La toxicidad de azadiractina en organismos plaga ha sido ampliamente estudiada, reportándose por ejemplo mortalidades del 100% en larvas del lepidóptero *Pericallia ricini* (Fabricius) (Gnanamani & Dhanasekaran 2013).

La mortalidad del estado pupal de *C. externa* fue del 100%, lo cual fue previamente reportado para *C. carnea* luego de tratamientos tópicos sobre el tercer estadio larval (Medina *et al.* 2003). Las larvas pudieron completar la pupación, pero la mayor mortalidad ocurrió dentro del cocón y en algunos casos se completó el desarrollo de este estado, pero sin poder completar la ecdisis. Vogt *et al.* (1998) reportaron que la aplicación residual de azadiractina sobre larvas evitó la pupación. La azadiractina afecta los procesos de crecimiento y desarrollo en insectos al alterar los equilibrios hormonales que regulan estos procesos por ejemplo reduciendo las concentraciones de ecdisteroides (Morgan 2009); hay reportes de larvas de lepidópteros tratadas con azadiractina que presentan períodos alargados de larva a pupa y organismos en donde la construcción del cocón no se lleva a cabo de manera completa registrándose individuos con características de ambos estados de desarrollo que llevan a la muerte de los mismos (Wondafrash *et al.* 2012).

En el presente trabajo, no se encontraron diferencias en la susceptibilidad a insecticidas en individuos de poblaciones de *C. externa* de campos tratados en comparación con individuos criados en laboratorio. Esto podría deberse a que aún en situaciones donde los organismos no son expuestos a insecticidas, los procesos de detoxificación enzimática no se ven disminuidos, caracterizándose esta especie por una elevada tolerancia natural a tóxicos. Sin embargo, los análisis de susceptibilidad hacia la azadiractina arrojaron resultados altamente negativos y resultó ser el insecticida más tóxico de los tres estudiados. Esto demuestra una vez más la importancia de los estudios de toxicidad sobre la fauna benéfica presente en los agroecosistemas y se recomienda la evaluación de semicampo y campo tal cual propone la International Organization for Biological Control (IOBC, www.iobc.org).

CAPÍTULO V

EVALUACIÓN DE TOLERANCIA DE *CHRYSOPERLA* *EXTERNA* A INSECTICIDAS PIRETROIDES

V.1. Introducción

El control de plagas en Argentina se basa principalmente en el uso de plaguicidas de amplio espectro, principalmente organofosforados, carbamatos y piretroides (Capello & Fortunato 2008). El uso extensivo y muchas veces el desconocimiento y/o el uso irresponsable de estos plaguicidas ha llevado al surgimiento de resistencia en muchas poblaciones de plagas. Como consecuencia, ocurren fallas de control que a su vez conducen a malas prácticas, como el aumento de las dosis o de la frecuencia de las aplicaciones. La resistencia a plaguicidas por parte de las plagas ha sido estudiada extensamente por su importancia en términos económicos, ya que reduce la efectividad de control de un tratamiento químico (Onstad 2013).

Otra consecuencia de estas actividades son los efectos negativos sobre las poblaciones de enemigos naturales. Pero también es sabido que los enemigos naturales pueden desarrollar resistencia (Bashir & Crowder 1983; Pree *et al.* 1989; Hoy 1990; Pathan *et al.* 2010; Sayyed *et al.* 2010), lo cual significaría una oportunidad para integrar el control biológico y químico en agroecosistemas donde las plagas deben controlarse indefectiblemente con este tipo de insecticidas. Algunos autores afirman que, debido a características biológicas, ecológicas y bioquímicas, los artrópodos fitófagos desarrollan resistencia a plaguicidas más rápido que los enemigos naturales (Pathan *et al.* 2008). Existen tres hipótesis para explicar el menor número de casos reportados de enemigos naturales con resistencia a plaguicidas (Rodrigues *et al.* 2013): 1) una pre-adaptación de los herbívoros respecto de los depredadores ya que por procesos evolutivos, presentan mecanismos de detoxificación más rápidos y eficientes desarrollados por alimentarse de una amplia rango de plantas, las cuales presentan toxinas defensivas (Croft & Morse 1979), 2) una disponibilidad menor de presas y hospedadores luego de las aplicaciones de plaguicidas y en consecuencia muerte o abandono del cultivo, y 3) falta de documentación que registre los casos de resistencia en enemigos naturales en comparación con organismos plagas (Tabashnik & Johnson 1999).

Los términos resistencia y tolerancia han sido utilizados de manera indistinta a lo largo de la literatura científica, pero teniendo en cuenta definiciones más estrictas, la

tolerancia se refiere a una tendencia natural de una especie o incluso de un estadio de desarrollo particular a sobrevivir a un insecticida, mientras que la resistencia es un atributo específico heredable, seleccionado en una población expuesta a un insecticida (Coles & Dryden 2014).

Los artrópodos expuestos a piretroides pueden desarrollar resistencia, a través de dos mecanismos principales: a) mutaciones en el sitio blanco de dichos insecticidas, los genes que codifican las proteínas de los canales de sodio dependiente de voltaje, las cuales generan el mecanismo de resistencia al volteo, conocido como resistencia *knock-down* (*kdr*), evitando la rápida parálisis del individuo; b) detoxificación metabólica del piretroide antes de llegar a su sitio blanco catalizada por las enzimas mono-oxigenasas P450, esterasas y transferasas (Zhong *et al.* 2013). Estas mutaciones se reportaron inicialmente en la mosca común (*Musca domestica* L.) y luego se encontraron en un gran número de artrópodos plaga asociados a agroecosistemas y vectores de enfermedades, en los que se describieron más de 30 mutaciones (Rinkevich *et al.* 2013). Esto llevó a una inevitable reducción de efectividad de los piretroides (Dong *et al.* 2014).

El depredador generalista neotropical *C. externa* es considerado un importante agente de control biológico en Sudamérica. Su cría masiva y posterior liberación en campo está siendo promovida en varios países (Carvalho *et al.* 2002; Pappas *et al.* 2011), inclusive en Argentina (Cáceres S, comunicación personal). Existen pocos estudios que evalúen la tolerancia y resistencia de esta especie a plaguicidas (Rimoldi *et al.* 2008; 2010).

La especie paleártica, *C. carnea*, por otra parte, representa un agente de control biológico eficiente empleado en programas de MIP en varios países del mundo (Tauber *et al.* 2000; McEwen *et al.* 2001). Es un enemigo natural con un amplio rango de presas y distribución geográfica, resistencia/tolerancia a plaguicidas, tasa elevada de depredación así como su disponibilidad en el mercado (Medina *et al.* 2003). Numerosos estudios demuestran diferentes aspectos de resistencia/tolerancia de esta especie a plaguicidas (Pree *et al.* 1989; Pathan *et al.* 2008; 2010; Sayyed *et al.* 2010).

El objetivo de este capítulo fue evaluar la resistencia de colonias, de campo y

laboratorio, de *C. externa* a cipermetrina, información que se desconoce al presente. Para esto se llevaron a cabo estudios a nivel molecular, entre los que se incluyeron mecanismos de detoxificación enzimática, cuantificación de residuos de plaguicidas y búsqueda de secuencias de ADN del gen que codifica el canal de sodio dependiente de voltaje. La hipótesis propuesta fue que los individuos de la población de campo de *C. externa* presentan mecanismos de resistencia a cipermetrina, con respecto a los ejemplares pertenecientes a la colonia de laboratorio.

V.2. Materiales y Métodos

Estos ensayos se realizaron en el laboratorio de Agrozoology, Department of Crop Protection, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University (UGent), Bélgica.

V.2.1. Colonias de *C. externa*

En el laboratorio se criaron dos colonias de *C. externa*: una colonia de laboratorio y una de campo. La colonia de laboratorio, representada por individuos susceptibles fue criada desde el año 2006 con ejemplares sin exposición a plaguicidas y/o insecticidas, en el Laboratorio de Ecotoxicología: Plaguicidas y Control Biológico (CEPAVE – UNLP/CONICET).

La colonia de campo estuvo representada por la primera filial (F1) de individuos recolectados en cultivos del CHP, con aplicaciones periódicas de piretroides (cipermetrina, deltametrina, lambdacialotrina) y neonicotinoides (imidacloprid, tiametoxán y acetamiprid), según lo informado por el productor. Ambas colonias fueron mantenidas según lo expuesto en el Capítulo II. Las mismas fueron trasladadas a Bélgica en pequeños contenedores con respiración, individualizadas entre sí, y en su mayor parte fueron pupas y huevos los seleccionados, debido a su prolongado tiempo de inactividad y a sus características protectoras.

Durante la estancia realizada en UGent, los adultos fueron alimentados con dieta artificial (Vogt *et al.* 2000) y los estadios inmaduros con el pulgón verde de la alfalfa *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Fig. V.1). El laboratorio donde se llevaron a cabo los

ensayos, contaba con una cría de este pulgón, mantenida en plantas de arveja (*Pisum sativum* L.) y con condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperíodo (25 ± 2 °C; $70 \pm 5\%$; 16:8 L:O).



Figura V.1: Cría del pulgón *Acyrthosiphon pisum*.

V.2.2. Reactivos

El insecticida utilizado fue zeta-cipermetrina [(mezcla de (S)- α -ciano-3-fenoxibencil (1RS, 3RS; 1RS, 3SR)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato] concentrado emulsionable (Fury® 100 EW, 10% zeta-cipermetrina, Belchim S.A.). La concentración evaluada fue 6 mg i.a./L, que representa la MCRC.

Se probaron inhibidores enzimáticos, los sinergistas butóxido de piperonilo (PBO) y S,S,S-tributil fosforotritioato (DEF), en una proporción 1:10 insecticida:sinergista. Los sinergistas fueron aplicados de manera tópica 6 h antes de la aplicación del insecticida. El BPO inhibe la actividad de las mono-oxigenasas P450 y el DEF la actividad de las esterasas.

Para la detección de residuos de cipermetrina mediante cromatografía gaseosa (ver sección 2.4. del presente Capítulo), se utilizó el piretroide cipermetrina [(RS)- α -ciano-3-fenoxibencil (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato] concentrado emulsionable (Glextrin 25®, 25% cipermetrina, Gleba S.A.) cuya MCRC es de 25 mg i.a./L, concentración detectable

mediante el cromatógrafo utilizado.

V.2.3. Toxicidad de zeta-cipermetrina en larvas del tercer estadio de *C. externa*

Para el estudio de la toxicidad de zeta-cipermetrina sobre *C. externa*, se realizaron bioensayos con este insecticida y los sinergistas PBO y DEF. Se llevaron a cabo cuatro tratamientos sobre cada colonia: 1) exposición a zeta-cipermetrina, 2) PBO + zeta-cipermetrina, 3) DEF + zeta-cipermetrina, 4) control.

Para la aplicación del insecticida y/o sustancias sinergistas, se prepararon al inicio de cada experimento soluciones con acetona grado analítico. El control estuvo representado solamente por acetona. Larvas del tercer estadio, de menos de 24 h de edad, fueron tratadas de manera tópica con una microjeringa provista de pulsador (Hamilton®, Suiza). Una gota de 1 µl de la solución fue aplicada sobre el dorso del abdomen.

Se registró la proporción de individuos recuperados del volteo inicial, cada 3 h posteriores a la exposición al insecticida y los sinergistas. El criterio para considerar un individuo afectado fue la ausencia de movimiento al ser estimulado con un pincel.

V.2.4. Cromatografía gaseosa

La cantidad de cipermetrina parental/no metabolizada se analizó mediante Cromatografía Gaseosa con Detector de Captura de Electrones (GC-ECD). Cada tratamiento estuvo formado por extractos de larvas tratadas solo con cipermetrina y con los pretratamientos con PBO y DEF. Para obtener la recta de calibración, se usaron seis concentraciones de un patrón estándar de cipermetrina (0,05; 0,1; 0,5; 1; 10; 15 ng) (Figura V.2).

Para la extracción, se trabajó con muestras de 30 mg de larvas de *C. externa* (aproximadamente diez individuos triturados y homogeneizados en 20 ml de hexano) luego de 9 h de tratadas. La muestra fue agitada durante 2 minutos mediante un equipo de ultrasonido (Transsonic 700, Techspan®) a una frecuencia de 35 kHz. Luego se filtró mediante vacío a través de un papel de filtro Whatman n° 2; el homogenato

resultante fue transferido a un matraz de fondo redondo y concentrado mediante un evaporador rotatorio con baño de agua. Luego fue disuelto nuevamente en 2 ml de hexano. Las muestras así preparadas se colocaron en el cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) con las siguientes condiciones:

Temperatura de inyección: 280 °C.

Temperatura de columna: inicial a 60 °C subiendo 20 °C/min hasta 150 °C; subiendo 15 °C/min hasta 250 °C; subiendo 30 °C/min hasta 270 °C; subiendo 30 °C/min hasta 280 °C.

Temperatura del detector: 300 °C.

Gas portador: Helio, 1 ml/min constante.

Volumen de inyección: 1 µl.

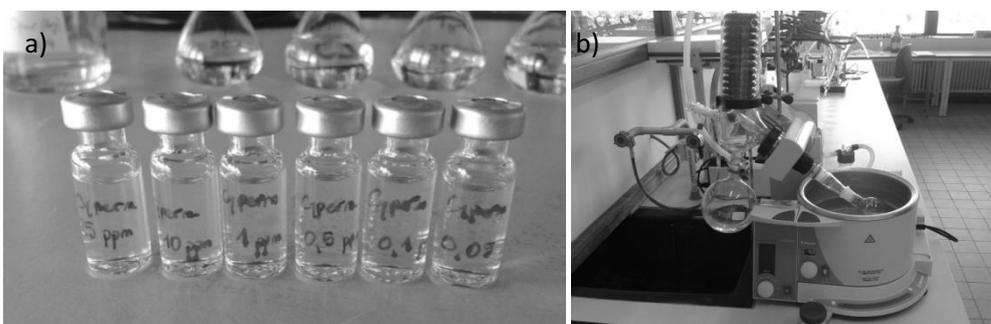


Figura IV.2: a) Preparación de disoluciones patrón de cipermetrina para la recta de calibración y cuantificación. b) Matraz de fondo redondo para la concentración del homogenato.

V.2.5. Actividad enzimática

De acuerdo a los resultados de la CG-ECD, se determinó *in vitro* la actividad de las enzimas mono-oxigenasas P450 con el sustrato p-nitroanisol. Se homogenizaron abdómenes de larvas en buffer fosfato de potasio (0,1 M; pH 7,4). El homogenato fue centrifugado 5 minutos a 1000 g y el sobrenadante obtenido fue centrifugado 15 minutos a 12 000 g. El nuevo sobrenadante fue usado como solución enzimática. La mezcla de reacción consistió en 75 µl de la solución enzimática en el buffer, 115 µl de p-nitroanisol (2 mM) y NADPH (10 µl).

La incubación se inició con la adición de p-nitroanisol en la mezcla de reacción y duró

10 minutos a 27 °C. Se midió la absorbancia a 595 nm mediante un espectrofotómetro (Powerwave X340, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT). La concentración de proteína del sobrenadante resultante se determinó mediante el reactivo Coomassie Blue (Bradford) (Sigma®), utilizando albúmina bovina como estándar. La actividad total de la enzima mono-oxigenasa P450 se expresó como mM de enzima por mg⁻¹ de proteína (Fig. V.3).

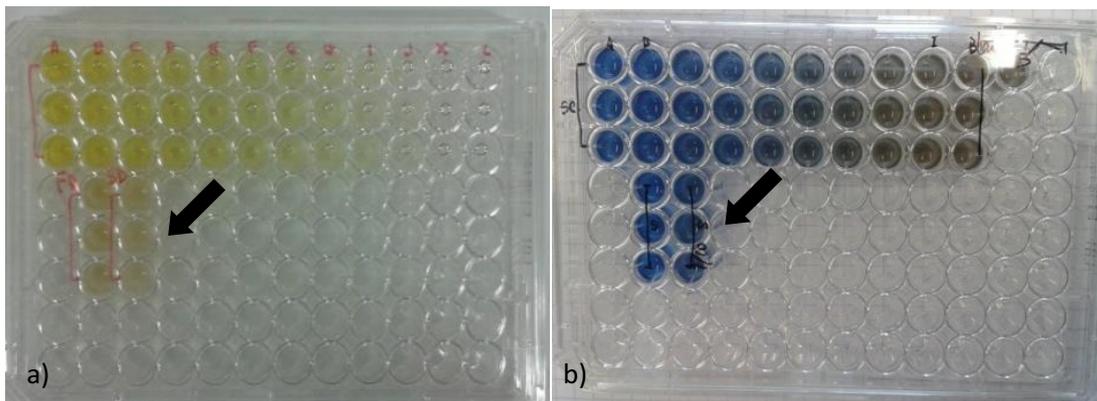


Figura V.3: Método de Coomassie Blue (Bradford) (a) Detección colorimétrica de concentración de proteínas en la muestra y (b) detección colorimétrica de la enzima mono-oxigenasa P450. De izquierda a derecha en las primeras tres filas, concentraciones decrecientes de proteínas y enzimas para las curvas de calibración. Las flechas indican las muestras de proteínas de material de *Chrysoperla externa* de campo y laboratorio.

V.2.6. Secuencia parcial de ADN complementario (ADNc)

Con el fin de encontrar posibles mutaciones en el gen que codifica el canal de sodio dependiente de voltaje en *C. externa*, se llevaron a cabo estudios de PCR y secuenciación de ADN. Para cada colonia de individuos sin tratar, se extrajo el ARN total de larvas de tercer estadio usando el Mini kit RNeasy (250) (Qiagen, USA) y luego la obtención de ADN complementario se obtuvo utilizando SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA).

Al no conocerse el gen que codifica el canal de sodio en ningún neuróptero, fueron diseñados cebadores (*primers*) degenerados (Tabla IV.1) mediante el alineamiento de secuencias conocidas del gen en distintas especies pertenecientes a distintos órdenes y familias, que admiten más de un nucleótido en ciertas posiciones, a fin de aumentar

el rango de posibilidades de encontrar la secuencia complementaria del ADN blanco. Mediante el Software Vector NTI, se alinearon secuencias provenientes de *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae), *M. domestica* L. (Diptera: Muscidae), *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae), *Myzus persicae* Sulz. (Hemiptera: Aphididae) y *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). Con esta información se diseñaron los *primers* degenerados (Tabla 1), encargados a la empresa LGC Genomics GmbH (Berlín, Alemania). Con los mismos se llevó a cabo una PCR con el ADNc de cadena simple, que consistió en: un ciclo de 95 °C durante 5 minutos y 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos, y finalmente el paso de extensión a 72 °C por 5 minutos.

El producto de la PCR fue enviado para su secuenciación al Laboratorio de Entomología y Control de Plagas, Facultad de Protección Vegetal, Southwest University, Chongqing 400716, China.

Tabla V.1: *Primers* degenerados para la detección del gen del canal de sodio dependiente de voltaje en *C. externa*. Código de bases nucleotídicas IUPAC de las posiciones redundantes de los *primers*: R = A, G; Y = C, T; M = A, C; K = G, T; S = C, G; W = A, T; H = A, C, T; B = C, G, T; V = A, C, G; D = A, G, T; N = A, C, G, T. F: *primer* directo, R: *primer* reverso. El *primer* en gris corresponde al cebador con resultado positivo.

<i>Primer</i>	Secuencia directa
F1 R1	GGC NYT NGA YCA YCA YGA YAT G GCR AAN ARY TGN CAN CCC AT
F2 R2	GYA THY TNA TGA TAA TGC CNA C CTC CCA GAA RTC YTG NGT C
F3 R3	GNY TNG TNA ARG GNG CAN ARG G TGG ACG GGC TCA GAC G
F4 R4	TGT TTT AAG GGC ACG CAA TA GCY TTS GAY TCY TCY GCY TAN GG
F5 R5	CTG TTT TAA GGG CAC GCA ATA GCY TTS GAY TCY TCY GCY TAN GG
F6 R6	TTA AGG GCA CGC AAT ACT CG GCY TTS GAY TCY TCY GCY TAN GG
F7 R7	GCA CGC AAT ACT CGA AAT GTT GCY TTS GAY TCY TCY GCY TAN GG
F8 R8	GCA CGC AAT ACT CGA AAT GTT CAT DGG VGT VAC BGC YTT SGA
F9 R9	GGA CGA TAG CTA CTG TTT TA TGC AWY AAY TCV GTY AAY TTC CA
F10 R10	GGA CGA TAG CTA CTG TTT TA TGC ATW CCC ATB ACB GCA AA

F11 R11	GGA CGA TAG CTA CTG TTT TA CAY TCC CAR ACY CAY AA
F12 R12	GGA CGA TAG CTA CTG TTT TA ACC ATD ACY TCT RMC ATY TC
F13 R13	CGA TAG CTA CTG TTT TAA GG ACD CGY AAR ACH ATC ATY AA
F14 R14	CGA TAG CTA CTG TTT TAA GG TGC AWY AAY TCV GTY AAY TTC CA
F15 R15	CGA TAG CTA CTG TTT TAA GG TGC ATW CCC ATB ACB GCA AA
F16 R16	CGA TAG CTA CTG TTT TAA GG CAY TCC CAR ACY CAY AA
F17 R17	CGA TAG CTA CTG TTT TAA GG ACC ATD ACY TCT RMC ATY TC
F18 R18	GCA ATA CTC GAA ATG TTC T ACC ATD ACY TCT RMC ATY TC
F19 R19	GGA CGA TAG CTA CTG TTT T TGC AWY AAY TCV GTY AAY TTC CA
F20 R20	GGA CGA TAG CTA CTG TTT T TGC ATW CCC ATB ACB GCA AA
F21 R21	GGA CGA TAG CTA CTG TTT T CAY TCC CAR ACY CAY AA
F22 R22	GGA CGA TAG CTA CTG TTT T ACC ATD ACY TCT RMC ATY TC
F23 R23	CAA TAC TCG AAA TGT TCT TA TGC ATW CCC ATB ACB GCA AA
F24 R24	CAA TAC TCG AAA TGT TCT TA CAY TCC CAR ACY CAY AA
F25 R25	CAA TAC TCG AAA TGT TCT TA ACC ATD ACY TCT RMC ATY TC

V.2.7. Análisis estadísticos

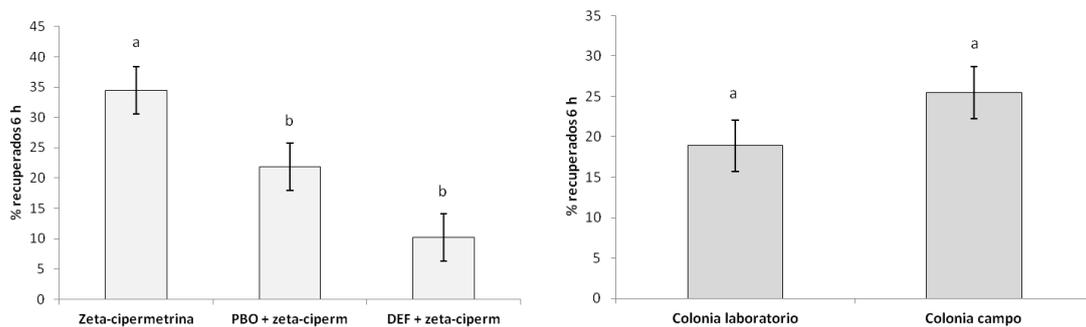
Los resultados de los ensayos de toxicidad fueron analizados con Análisis de la Varianza Multifactorial, mientras que los datos de CG y la actividad enzimática fueron analizados con Análisis de la Varianza Simple (ANOVA). Previamente se evaluó la normalidad y homoscedasticidad de los datos mediante los tests de Shapiro Wilk y Levene, respectivamente. Si no cumplían con los supuestos, eran transformados y reevaluados, en el caso de no cumplir con los mismos se utilizó el análisis no paramétrico Kruskal-Wallis. Las medias fueron separadas usando el test de Fisher cuando se utilizó ANOVA y de Dunn cuando se utilizó Kruskal-Wallis (Scheiner & Gurevitch 2001). Un valor de $P < 0,05$ fue considerado significativo. Para los análisis se utilizó el programa XLSTATSTART.exe (2014).

V.3. Resultados

V.3.1. Toxicidad de zeta-cipermetrina en larvas de tercer estadio de *Chrysoperla externa*

Los ensayos de toxicidad mostraron que independientemente del tratamiento o la población, el 100% de los individuos se vieron afectados luego de las 3 h post-tratamiento. Esto se verificó, tanto a las 6 como a las 9 h post-tratamiento. Los factores colonia y tratamiento actuaron independientemente entre sí sobre la toxicidad observada en los organismos (Fig. V.4). A las 6 h post-tratamiento hubo diferencias significativas entre tratamientos pero no entre colonias (*Interacción tratamiento x colonia: F = 0,48; gl = 2; P = 0,62; Factor tratamiento: F = 9,67; gl = 2; P = 0,0032; Factor colonia: F = 2,1; gl = 1; P = 0,17*) siendo mayor el número de individuos que se recuperaron del tratamiento con zeta-cipermetrina respecto de los tratados con los sinergistas. A las 9 h post-tratamiento no hubo diferencias significativas entre colonias ni entre tratamientos con un valor de P “marginal” (*Interacción tratamiento x colonia: F = 1,73; gl = 2; P = 0,21; Factor tratamiento: F = 3,61; gl = 2; P = 0,059; Factor colonia: F = 3,61; gl = 1; P = 0,08*).

a)



b)

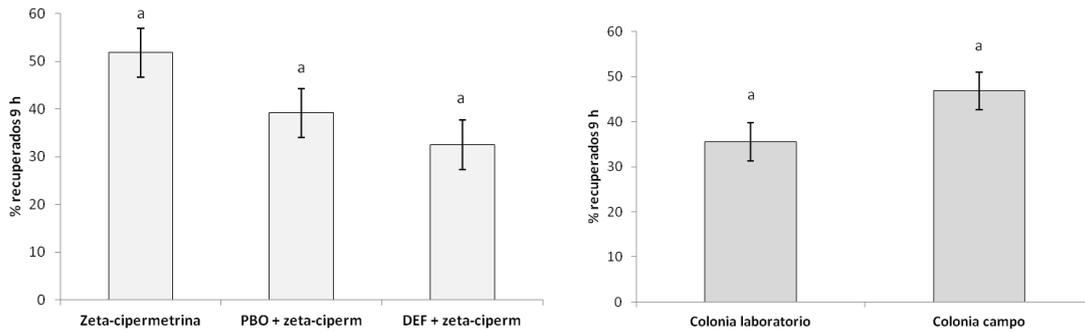


Figura V.4: Porcentaje de individuos recuperados con los distintos tratamientos y en las colonias de laboratorio y campo. (a) 6 h post-tratamiento, (b) 9 h post-tratamiento. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Las letras diferentes indican diferencias significativas (Fisher's LSD, $\alpha = 0,05$)

V.3.2. Cromatografía gaseosa

Luego del tratamiento con PBO, las colonias de laboratorio y de campo tuvieron mayores concentraciones de residuos de cipermetrina que las tratadas con cipermetrina sola y DEF (Figura V.5). Además la concentración residual dentro del tratamiento con PBO fue mayor en la población de campo que en la de laboratorio (Tratamientos sobre colonia de laboratorio: $F = 101,07$; $gl = 2,6$; $P < 0,001$. Tratamientos sobre colonia de campo: $F = 245,93$; $gl = 2,6$; $P < 0,001$. Cipermetrina sobre colonias: $F = 6,14$; $gl = 1,4$; $P = 0,068$. PBO + cipermetrina sobre colonias: $F = 437,29$; $gl = 1,4$; $P < 0,001$. DEF + cipermetrina: $F = 5,96$; $gl = 1,4$; $P = 0,071$).

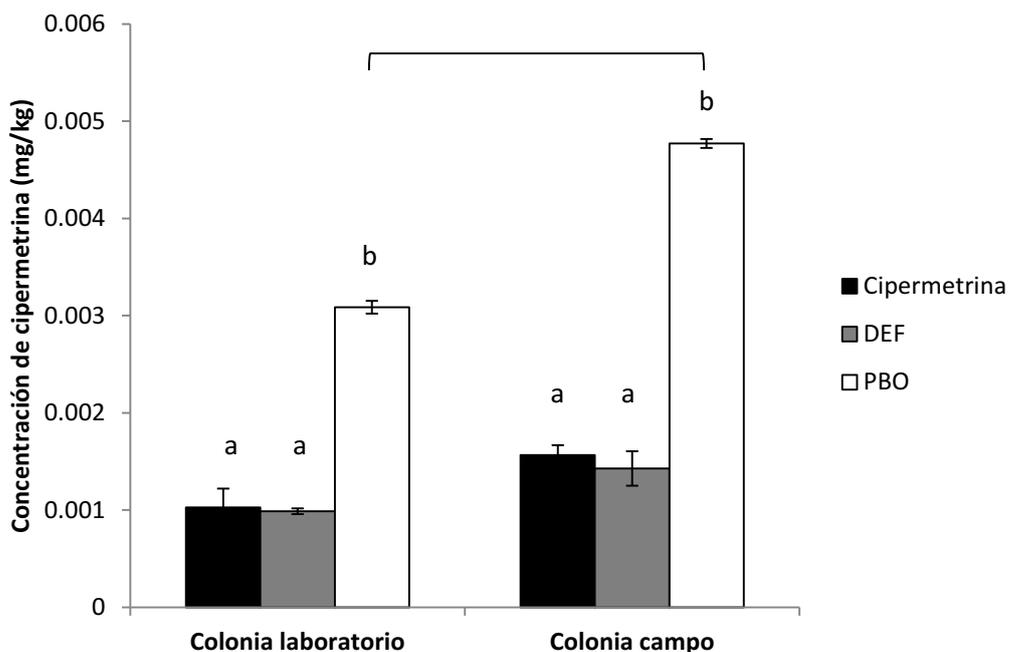


Figura V.5: Cromatografía Gaseosa de residuos de cipermetrina sobre larvas de *Chrysoperla externa*. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Las letras denotan diferencias significativas entre los distintos tratamientos sobre cada colonia y el corchete indica diferencias significativas entre colonias (*Fisher's LSD*, $P = 0,05$)

V.3.3. Actividad enzimática

La actividad de las enzimas mono-oxigenasas P450 no presentó diferencias significativas en ambas poblaciones ($H = 0,6$; $gl = 1$; $P = 0,4385$) (Fig. V.6).

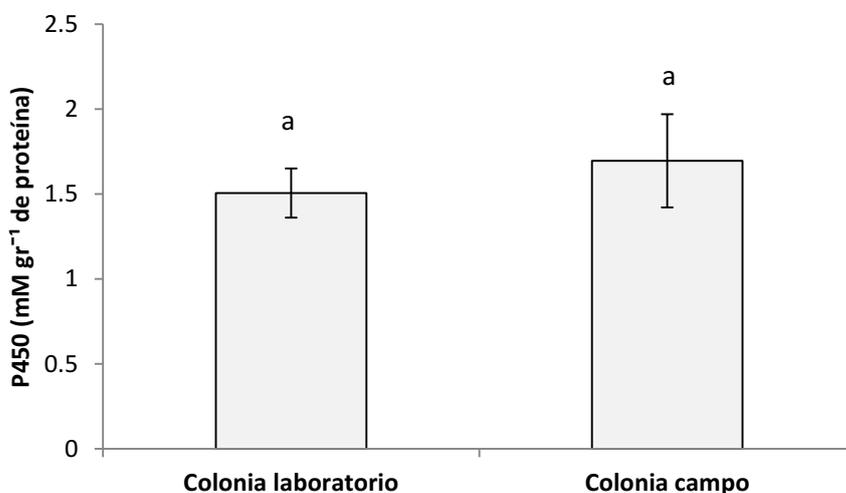
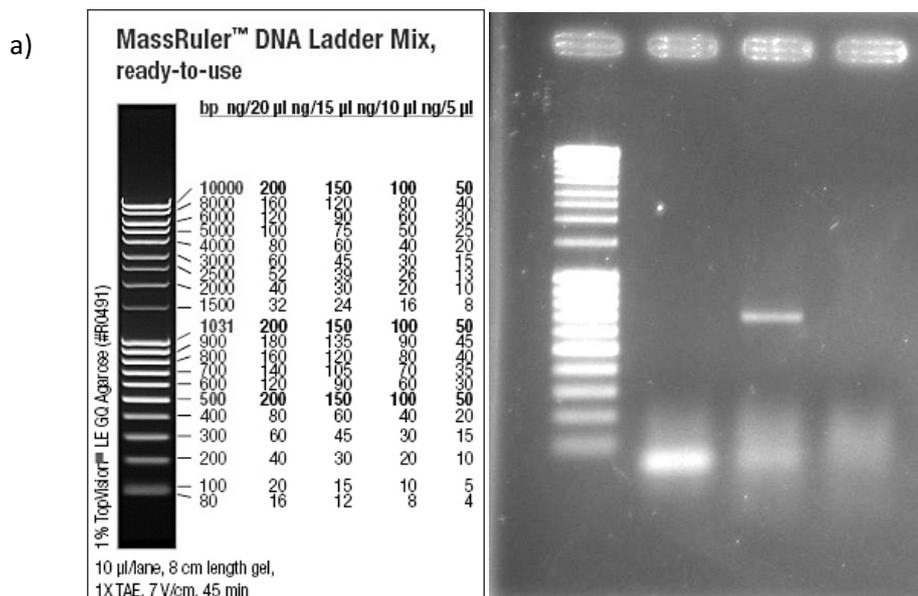


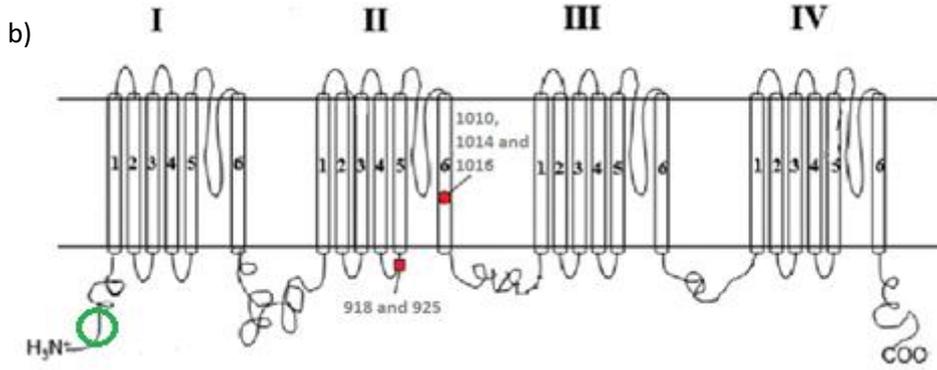
Figura V.6: Concentración de enzimas mono-oxigenasas P450 en la colonia susceptible y la población de

campo de *Chrysoperla externa*. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Los valores marcados con la misma letra no presentan diferencias significativas (*Dunn*, $\alpha = 0,05$).

V.3.4. Secuencia parcial de ADNc

Debido a que no había datos anteriores sobre la secuencia de este gen en *C. externa*, se diseñaron los primers degenerados anteriormente descritos para tratar de amplificar la secuencia del mismo. Sin embargo, sólo se pudo amplificar de manera satisfactoria un solo para de primers. Este amplicón de alrededor de 670 pb (Fig. V.8^a, columna 2) fue puesto en gel. Pero la secuencia sólo devolvió un resultado de 66 pb. La Fig V.8d muestra la secuencia de este fragmento con los genes homólogos en cuatro especies diferentes (*An. gambiae*, *L. decemlineata*, *M. domestica*, *B. mori* y *M. persicae*). La posición del primer degenerado se encuentra marcado en rojo y el fragmento correspondiente a *C. externa*, en verde. La similaridad entre secuencias de *C. externa* y las homólogas fue calculado utilizando los programas Ident y Sim (http://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html), y la misma fue de un 75,8% a un 84,9%, dependiendo de la especie (Tabla V.2). las secuencias entre individuos de laboratorio y campo no pudo compararse, porque solo una de las colonias arrojó resultados positivos y porque la secuencia obtenida fue muy corta.





c)

3'ACATTCGGATGGGCATTCTTGTCTGCCTTTCGTCTAATGACTCAAGATTATTGGGAGAAT5'

d)

	490 500 510 520 530 540
<i>Myzus persicae</i>	GTAACAATCA TCACACTAT ACTTACAAC TGTGTGTTCA TGATAATGCC CCCAACTCCG
<i>Musca domestica</i>	TTATTCATTA TCACCACAT TCTAACTAAT TATATTTAA TGATAATGCC GAAACGCCC
<i>Anopheles gambiae</i>	CTTTTATAA TAACGACAT TCTGTTAAT TGTATATTGA TGATTATGCC TACCACGCCG
<i>Bombyx mori</i>	CTGTTTATTA TTACGACAAT CTTAGTGAAT TGCATACTTA TGATAATGCC TACAACGCCA
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
<i>Chrysoperla externa</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----

	550 560 570 580 590 600
<i>Myzus persicae</i>	ACTATTGAAG CGTCTGAAGT AATATTTACC GGCATCTACA CATTGGAATC GGCTGTGAAA
<i>Musca domestica</i>	ACGGTTCGAAT CCACAGAGGT GATATTCACC GGAATCTACA CATTGGAATC AGCTGTAAAA
<i>Anopheles gambiae</i>	ACAGTTCGAAT CTACCGAGGT GATATTCACC GGCATCTACA CGTTGGAATC AGCTGTAAAA
<i>Bombyx mori</i>	ACAGTTGAAA GTACTGAAGT TATCTTTACC GGGATCTACA CGTTTGAATC AGCGGTGAAA
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
<i>Chrysoperla externa</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----

	610 620 630 640 650 660
<i>Myzus persicae</i>	GTAATGGCCC GAGGTTTCAT ATTAGAACAC TTCACCTATC TTAGAGATGC ATGGAATTGG
<i>Musca domestica</i>	GTGATGGCAC GAGGTTTCAT TTTATGCCCG TTTACGTATC TTAGAGATGC ATGGAATTGG
<i>Anopheles gambiae</i>	GTGATGGCCG GAGGTTTCAT ATTACAACCG TTTACTTATC TTAGAGATGC ATGGAATTGG
<i>Bombyx mori</i>	GTAATGGCCA GGGGTTTAT ACTACAGCCA TTCACATACC TTAGAGATGC ATGGAATTGG
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
<i>Chrysoperla externa</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----

	670 680 690 700 710 720
<i>Myzus persicae</i>	CTAGACTTCA TTGTTATTGC ATTAGCTTAC GTTACTATGG GTATAGAATC TGGAAATTTA
<i>Musca domestica</i>	CTGGACTTCG TAGTAATAGC TTTAGCTTAT GTGACCATGG GCATAGATTT AGGTAATCTC
<i>Anopheles gambiae</i>	TTGGACTTCG TAGTAATAGC ATTAGCATAT GTAACATATG GTATAGATTT GGGTAATCTT
<i>Bombyx mori</i>	CTTGACTTCG TAGTTATAGC TTTAGCTTAT GTGACGATGG GCATAGATCT CGGAAACCTA
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
<i>Chrysoperla externa</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----

	730 740 750 760 770 780
<i>Myzus persicae</i>	GCGGTTCTTC GAACATTTCG AGTACTGCGA GCGCTCAAAA CTGTAGCCAT TGTGCCTGGA
<i>Musca domestica</i>	GCAGCTTTGA GAACATTTCG GGTACTGCGA GCTCTGAAAA CCGTAGCCAT TGTGCCAGGT
<i>Anopheles gambiae</i>	GCTGCGTTGA GAACATTTCG GGTATTACGA GCTCTTAAAA CCGTAGCCAT CGTTCACGGC
<i>Bombyx mori</i>	GCCGCTCTGA GAACGTTTCG GGTACTACGA GCGTTGAAAG CTGTGGCCAT AGTACCCGGC
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
<i>Chrysoperla externa</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----

	790 800 810 820 830 840
<i>Myzus persicae</i>	TTAAAGACTA TCGTTGGAGC TGTGATAGAA TCCGTGAAAA ACCTCAGGGA TGTGATAATA
<i>Musca domestica</i>	CTAAAAACCA TTGTCGGTGC TGTGATAGAA TCTGTAAAAA ATCTACGGGA TGTGATAAAT
<i>Anopheles gambiae</i>	TTAAAAACCA TCGTCGGAGC CGTTATAGAA TCCGTGAAAA ATCTCAGAGA TGTGATAAAT
<i>Bombyx mori</i>	TTGAAGACGA TCGTCGGTGC TGTGATAGAA TCCGTGAAAA ATCTCCGTTGA TGTATAAAT
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----
<i>Chrysoperla externa</i>	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----

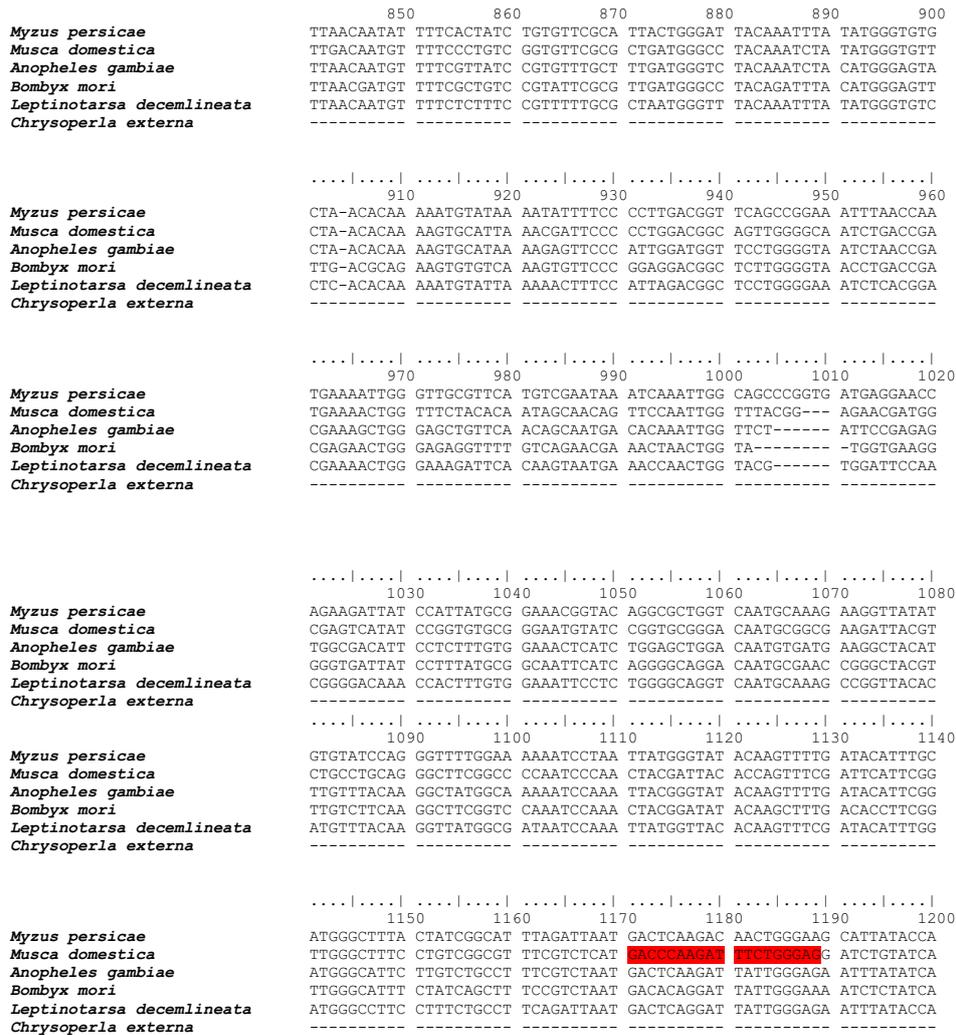


Figura V.7: a) Imagen de electroforesis del gel de agarosa con los productos del PCR; primer columna del gel correspondiente al marcador de masa molecular de los productos de PCR (Mass Ruler™ DNA Ladder Mix), columnas segunda, tercera y cuarta con los productos de PCR obtenidos con los primers F1R1, F2R2 y F3R3, respectivamente. En la tercer línea se ve una banda de alrededor de 670 pb (Tabla V.1). b) estructura del canal de sodio dependiente de voltaje, mostrando los dominios I al IV, cada uno con 6 segmentos transmembrana. Puntos rojos correspondientes a mutaciones de resistencia a piretroides más comunes. El círculo verde marca la región en la proteína, correspondiente a la secuencia de ADNc obtenida. c) Secuencia de ADNc. d) alineamiento de secuencias de nucleótidos para *C. externa*, *An. gambiae*, *L. decemlineata*, *M. domestica*, *B. mori* y *M. persicae*. La posición de los primers degenerados usados para la amplificación se encuentra en rojo. El fragmento parcial obtenido para *C. externa*, en verde.

V.4. Discusión

Existen reportes de resistencia o tolerancia a plaguicidas en artrópodos benéficos y por lo tanto la liberación de estos organismos podría ser implementada en agroecosistemas en los que el uso de plaguicidas neurotóxicos es requerido. Un agente de control biológico para este tipo de manejo de plagas debería ser tolerante a insecticidas sintéticos (El-Wakeil *et al.* 2013) y así evitar el uso de aplicaciones de plaguicidas, por ejemplo si hay presencia de plagas vectores de virus, donde el nivel de daño económico es muy bajo. Las liberaciones inundativas de *C. carnea* han demostrado ser muy efectivas en controlar poblaciones de plagas en varios cultivos (Ridgway & Murphy 1984). El uso de esta especie en programas de MIP se incrementó en los últimos años debido a las ventajas de su tolerancia aparentemente amplia a varios plaguicidas, particularmente durante los estadios de larva y pupa (Medina *et al.* 2001). Todos los estados de desarrollo de *C. carnea* son altamente tolerantes a muchos piretroides sintéticos, insecticidas botánicos, microbianos (*Bacillus thuringiensis* y virus de la polihedrosis nuclear), IGRs, fungicidas, herbicidas, acaricidas y al insecticida clordimeform (Grafton-Cardwell & Hoy 1985). En cuanto a los piretroides, Grafton-Cardwell y Hoy (1985) sugirieron que estos mecanismos probablemente no estén dados por la exposición a plaguicidas en el campo sino a una tolerancia natural de la especie.

Chrysoperla externa es considerado un enemigo natural de plagas agrícolas muy importante en Sudamérica, por ser generalista y por tener una fuerte adaptabilidad a distintos agroecosistemas (De Fátima *et al.* 2013; Moura *et al.* 2010; 2011). Su aparición en campos tratados podría deberse a que es naturalmente tolerante a los insecticidas aplicados o a un fenómeno de resistencia surgido como consecuencia del uso de dichos productos. Por ejemplo, Moura *et al.* (2011) encontraron una tasa de mortalidad baja de *C. externa* con azufre, abamectina y triclorfón, y concluyeron que esto puede estar relacionado a su alta tolerancia.

En cuanto a la evaluación de la acción de inhibidores enzimáticos sinergistas a la cipermetrina, observamos que todas las larvas resultaron volteadas luego de 3 h de tratamiento. No hubo diferencias entre la colonia de campo y la población de

laboratorio a lo largo del ensayo. En ambos grupos, los individuos tratados con zeta-cipermetrina se recuperaron más rápidamente que aquellos tratados con sinergistas a las 6 h post-tratamiento. A las 9 h los efectos de los sinergistas sobre la toxicidad de la cipermetrina fue uniforme al tratamiento con zeta-cipermetrina.

Estos resultados sugieren que enzimas mono-oxigenasas P450 y esterasas están involucradas en la detoxificación de la zeta-cipermetrina en esta especie. Otros autores han reportado una mayor toxicidad a insecticidas piretroides cuando se utilizó PBO y DEF como pre-tratamiento sobre otras especies de insectos (Alzogaray & Zerba 1997; Xi *et al.* 2014). Estos resultados coinciden con Sayyed *et al.* (2010) que concluyeron que la resistencia a la deltametrina en *C. carnea* estuvo asociada a actividades de enzimas P450 y posiblemente esterasas. También es importante subrayar que, sin importar la población, los individuos de laboratorio y de campo tuvieron un 50% de recuperación luego de 9 h de tratamiento.

Los ensayos de CG-ECD confirmaron que las enzimas involucradas en la detoxificación son las P450, debido a la alta concentración de residuos de plaguicidas en muestras con individuos tratados con PBO como sinergista comparados con los resultados de tratamientos con cipermetrina y DEF. Además la colonia de campo tratada con PBO tuvo una mayor cantidad de residuos de cipermetrina en comparación con la colonia de laboratorio. Resultados similares se obtuvieron mediante ensayos con PBO y piretroides (permetrina y cihalotrina) en colonias del díptero *Haematobia irritans* L. (Guerrero *et al.* 1997), en donde el efecto del sinergista sobre una colonia resistente fue mucho mayor que en la colonia susceptible criada en laboratorio sin exposición a insecticidas. Esto pudo deberse a una menor contribución de enzimas P450 en la colonia de laboratorio que en la resistente. Este método de análisis de residuos de plaguicidas mediante CG-ECD fue usado en este trabajo por primera vez en insectos depredadores. Hay escasos estudios hechos en abejas donde se estudiaron diferentes métodos de determinación de residuos de plaguicidas (Rossi *et al.* 2001; Morzycka 2002; Walorczyk & Gnusowski 2009).

Es notable la diferencia que presentó el tratamiento con DEF cuando se evaluó la toxicidad y los residuos mediante GC. Aunque pertenecientes al mismo grupo de

piretroides (tipo II, con grupo ciano) y formados por la misma molécula, estos resultados denotan la existencia de diferentes procesos de detoxificación según el tipo de cipermetrina: mientras que los tratamientos con DEF + zeta-cipermetrina dieron como resultado un notable menor porcentaje de organismos recuperados que con PBO o con zeta-cipermetrina sin sinergistas, la concentración residual de cipermetrina fue la misma en organismos tratados con el piretroide solo y con el pretratamiento con DEF, siendo la concentración luego del tratamiento con PBO de dos a cuatro veces mayor que los demás ensayos. Esto indicaría que en la detoxificación de cipermetrina las esterasas no intervienen pero sí lo hacen en la detoxificación de zeta-cipermetrina. Fue evaluada la actividad de las P450 pero no se encontraron diferencias entre poblaciones.

Por otro lado, el análisis y secuenciación del ADN complementario del gen que codifica los canales de sodio dependientes de voltaje de *C. externa*, sería de una gran importancia. Dicha secuenciación fue realizada en varios artrópodos de importancia sanitaria y agronómica (por ejemplo *M. domestica*, los mosquitos *An. gambiae*, *A. aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, el coleóptero plaga de la papa *L. decemlineata*, la mosca blanca *B. tabaci*, etc.) (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) que desarrollaron resistencia a piretroides a nivel de dicho gen. Los canales de sodio dependientes de voltaje (proteínas transmembrana) que se encuentran en las neuronas, mantienen la membrana polarizada hasta que llega un potencial de acción; es en este momento en el que dichos canales se abren dando paso a los iones Na^+ dentro de la neurona. Esto provoca una despolarización de la membrana y el consecuente paso del potencial de acción. Al cerrarse los canales, la membrana se repolariza. Los insecticidas piretroides actúan a nivel de esta proteína transmembrana, uniéndose a la misma y provocando que la neurona quede activada ya que los canales quedan abiertos (Dong *et al.* 2014). La obtención de la secuencia de ADN del gen que codifica esta proteína en *C. externa*, sería no sólo importante para ampliar el conocimiento de dicha especie a nivel molecular y obtener datos acerca de una supuesta resistencia en ejemplares de campo, sino también para el conocimiento general de los mecanismos de acción de los insecticidas cuyo sitio blanco es el canal de sodio, el lugar o lugares exactos de unión del insecticida al canal, etc. Hasta el momento, numerosos estudios han revelado que

las mutaciones en el gen se dan principalmente en las pares de bases que codifican los aminoácidos del dominio II y III de la proteína (las más comunes son las llamadas L1014F, L1014H y M918T + L1014F, correspondiendo las letras al nombre de los aminoácidos que se sustituyen en la mutación, y los números a la posición del aminoácido) (Franck *et al.* 2012; Rinkevich *et al.* 2012; Xu *et al.* 2012; Dong *et al.* 2014; Singh *et al.* 2015).

Es importante incluir este tipo de análisis en enemigos naturales adicionalmente a los efectos letales y subletales de plaguicidas, con el fin de incrementar nuestro conocimiento acerca de los mecanismos de resistencia/tolerancia de los plaguicidas sobre insectos benéficos en evaluaciones de riesgo. En el presente trabajo, no pudo lograrse una secuenciación completa ni cercana a los sitios comunes de mutaciones, posiblemente debido al uso de cebadores degenerados, en los cuales la probabilidad de encontrar el ADN complementario es muy bajo. En futuros estudios sobre este gen, en una especie poco estudiada a este nivel, debería obtenerse el genoma neuronal de la misma.

De acuerdo con estos estudios, *C. externa* mantiene el potencial de sobrevivir a aplicaciones de plaguicidas, en este caso a la zeta-cipermetrina, incluso en una población mantenida luego de seis años de cría en laboratorio sin exposición a los mismos. La población recolectada de campo con historia de aplicaciones demostró una recuperación similar. Esto podría demostrar que esta especie tiene una tolerancia natural a cipermetrina. La recuperación fue muy rápida y las enzimas P450 parecen desempeñar un rol importante en la detoxificación en ambas poblaciones, conclusión que también es apoyada por los resultados cromatográficos. Esta especie demuestra una vez más que es un enemigo natural prometedor y que puede ser utilizado tanto en programas de MIP como en agroecosistemas donde el uso de insecticidas neurotóxicos como piretroides podría permitir la conservación de estos enemigos naturales o el uso conjunto mediante liberaciones para el control de artrópodos plaga.

CAPÍTULO VI

ESTUDIOS COMPARATIVOS DE LA TOXICIDAD DE INSECTICIDAS ENTRE LARVAS Y PUPAS DE *CHRYSOPERLA ASORALIS* Y *C. EXTERNA* (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE)

VI.1. Introducción

Existen numerosos trabajos que evalúan los efectos letales y subletales de insecticidas sobre enemigos naturales (EN). Estos estudios son de gran importancia ya que la fauna benéfica también es afectada por este tipo de control. En el CHP los insecticidas más utilizados todavía siguen siendo los convencionales (organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides) (CASAFE, 2009) aunque en los últimos años se registró un aumento del uso de insecticidas biorracionales en el área.

Un importante agente de control biológico es el neuróptero *C. externa*, cuyas larvas son depredadoras de organismos plaga de importancia económica (Soto & Iannaccone 2008; Bastidas *et al.* 2010). Estudios previos de toxicidad han demostrado una elevada tolerancia a piretroides (Rimoldi *et al.* 2008; Rimoldi *et al.* 2012) (ver Capítulo IV) al igual que la especie paleártica *C. carnea* (Pree *et al.* 1989; Hoy 1990; Pathan *et al.* 2008; Pathan *et al.* 2010; Sayyed *et al.* 2010). También se llevaron a cabo estudios del impacto de neonicotinoides sobre distintos estados de *C. externa*, concluyendo una alta susceptibilidad de la especie a este tipo de insecticida (Bueno & Freitas 2001; Godoy *et al.* 2010). Estudios con piriproxifén en cambio, no produjeron toxicidad en esta especie (Velloso *et al.* 1999; de Fátima *et al.* 2013).

En el Cinturón Hortícola Platense (CHP) se registró la presencia del crisópido *C. asoralis* (Capítulo III) además de la especie neotropical y ampliamente distribuida *C. externa*. y *C. asoralis* se ha registrado en las regiones de Cuyo, NOA y NEA, y en provincia de Buenos Aires (González Olazo & Heredia 2007; González Olazo *et al.* 2009; González *et al.* 2011) en asociación con importantes cultivos sobre todo en frutales así como también el olivos (González Olazo *et al.* 2012; González *et al.* 2011). Muestreos en el CHP en cultivos con MIP donde las aplicaciones de plaguicidas se llevan a cabo de acuerdo a un monitoreo periódico y de acuerdo al NDE establecido para *Myzus persicae* y *B. tabaci*, determinaron la presencia de esta especie por primera vez registrada en la región pero no se encontraron en otros puntos de muestreo en donde se llevan a cabo estrategias de control convencionales. Al estar presente la nueva especie registrada, en un predio con manejo integrado y baja frecuencia de aplicaciones de insecticidas, *C. asoralis* sería más susceptible que *C. externa*. Por esta

razón, se hicieron estudios comparativos de susceptibilidad a insecticidas entre ambas especies.

El objetivo de este capítulo fue determinar si la especie *C. asoralis* es más susceptible a insecticidas que *C. externa* al estar presente en cultivos con baja frecuencia de aplicaciones. Para ello se realizaron ensayos con el piretroide cipermetrina, el neonicotinoide acetamiprid y el IGR piriproxifén. Estos efectos de aplicaciones se estudiaron sobre dos estados de desarrollo, la larva y la pupa.

VI.2. Materiales y métodos

VI.2.1. Insectos

Los insectos utilizados en los experimentos provinieron de dos colonias de *Chrysoperla*: la colonia de *C. externa* de laboratorio y la colonia de *C. asoralis* establecida en laboratorio del campo integrado, citada por primera vez en el CHP (Capítulo III). Se seleccionaron cohortes de 24 h de edad y se criaron de acuerdo a lo descrito en el Capítulo II.

VI.2.2. Insecticidas, preparación de soluciones

Se utilizaron las Máximas Concentraciones Recomendadas de Campo (MCRC) de los siguientes formulados comerciales: Glextrin® (25% p/v cipermetrina, Gleba S.A.), Mospilan® (20% p/p acetamiprid, Summit-Agro S.A.) y Epingle® (10% p/v piriproxifén, Summit-Agro S.A.) de acuerdo a las recomendaciones de la CASAFE (CASAFE 2011) (Tabla VI.1). Se prepararon soluciones de cada uno de estos productos, previo al inicio de los bioensayos, utilizando acetona grado analítico como solvente.

Tabla V.1: insecticidas utilizados y sus MCRC.

Principio activo	Nombre comercial	Pureza (p/v)	MCRC (mg i.a./L)	Fabricante
Cipermetrina	Glextrin 25®	25%	25	GLEBA S.A.
Acetamiprid	Mospilan®	20%	200	SUMMIT AGRO S.A.
Piriproxifén	Epingle®	10%	75	SUMMIT AGRO S.A.

VI.2.3. Evaluación de toxicidad sobre el tercer estadio larval

Se trataron larvas de *C. externa* y *C. asoralis* correspondientes al tercer estadio (≤ 24 h de edad) provenientes de una misma cohorte. La aplicación de los insecticidas fue tópica, mediante una microjeringa provista de pulsador (Hamilton, Suiza) y se aplicó una gota de 1 μ l de solución en la parte dorsal del abdomen de las larvas. El control se trató con acetona sola. Se llevaron a cabo tres repeticiones de diez individuos para cada tratamiento incluido el control.

VI.2.4. Evaluación de toxicidad sobre el estado pupal

Los tratamientos sobre las pupas de ambas especies también se llevaron a cabo tópicamente de la misma forma detallada en el punto anterior (1 μ l de solución del insecticida, utilizando acetona como disolvente). Debido a que la pupa desarrolla dentro de un cocón (capullo de seda construido por el último estadio larval), se trataron pupas de 72 h de edad a fin de asegurar que los organismos estén en estado de pupa dentro del capullo (el estado de pupa lleva diez días hasta la emergencia adulta).

Las variables medidas para determinar la susceptibilidad diferencial entre ambas especies a los insecticidas ensayados fueron: la mortalidad del estadio larval y/o estado pupal, el tiempo de desarrollo intermudas (tercer estadio larval a estado pupal y estado pupal a estado adulto) en el caso de los individuos que lograron sobrevivir al tratamiento, el período preoviposición, la fecundidad y la fertilidad.

Los adultos sobrevivientes fueron alimentados con dieta artificial y fueron provistos de bebederos (Capítulo II). Luego de la identificación de sexos se formaron parejas colocadas en recipientes forrados internamente con cartulina negra. Se utilizaron de cinco a diez parejas por tratamiento. La fecundidad se registró diariamente durante los primeros cinco días de oviposición contando la cantidad de huevos puestos en la cartulina negra. Luego de separadas las puestas en cápsulas de Petri se esperó la eclosión de las mismas y se contabilizó la cantidad de larvas para la fertilidad.

VI.2.5. Análisis estadísticos

Se utilizó Análisis de la Varianza Simple (ANOVA) previa evaluación de la normalidad de los datos con el test de Shapiro-Wilk. Cuando no se cumplieron los supuestos del ANOVA, se usó el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Para las separación de medias se utilizó el test LSD (*Fisher's least significant difference*) o Dunn, respectivamente (Scheiner & Gurevitch, 2001). El nivel de significancia para todos los análisis fue del 95% ($P < 0,05$). Se utilizó el programa estadístico XLSTATSTART.exe (2014).

VI.3. Resultados

VI.3.1. Evaluación de toxicidad sobre el tercer estadio larval

VI.3.1.2. Mortalidad

Se registró el número total de larvas y pupas (provenientes de las larvas tratadas) muertas al final de cada período en individuos tratados con los distintos insecticidas. En el estadio larval no hubo mortalidad en el tratamiento control en ninguna de las dos especies (0%), pero acetamiprid y cipermetrina produjeron mortalidades significativamente mayores respecto de piriproxifén el cual no se diferenció del tratamiento control, entre un 5 y un 25% (mortalidad de *C. asoralis* con los distintos tratamientos: $H = 10,23$; $gl = 2$; $P = 0,016$. Mortalidad de *C. externa*: $H = 6,49$; $gl = 2$; $P = 0,08$) (Fig. VI.1). Comparando la mortalidad de *C. asoralis* y *C. externa* con cada insecticida, el tratamiento con cipermetrina fue más letal para la primera que para la segunda, alcanzado el 90% (mortalidad con piriproxifén: $F = 0,8$; $gl = 1,4$; $P = 0,42$. Mortalidad larval con cipermetrina: $F = 39,97$; $gl = 1,4$; $P = 0,003$. Mortalidad con acetamiprid: $F = 0,02$; $gl = 1,4$; $P = 0,9$).

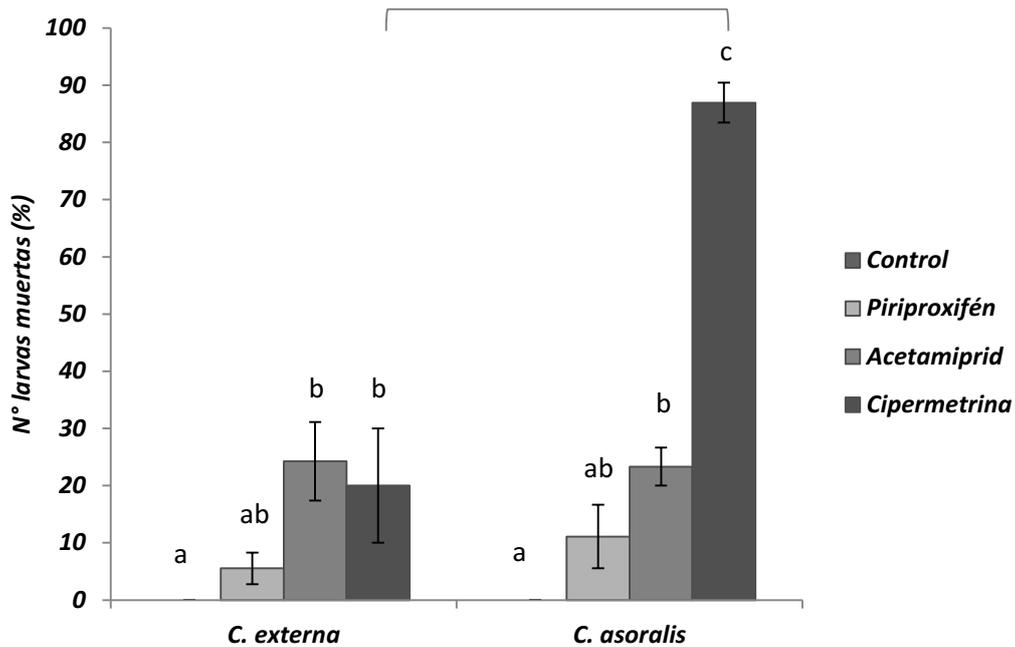


Figura VI.1: Porcentaje de mortalidad del estadio larval de *Chrysoperla externa* tratada con distintos insecticidas. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Las letras distintas denotan diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada especie. El corchete señala el tratamiento que mostró diferencias significativas entre especies ($P < 0,05$)

En cuanto a la mortalidad en el estado pupal de los individuos que sobrevivieron el estadio larval, en ambas especies el tratamiento control fue de 0% de mortalidad, y con acetamiprid provocó una mortalidad significativamente mayor respecto de los demás tratamientos, hasta un 25% (mortalidad pupal de *C. asoralis* con los distintos tratamientos: $F = 7,84$; $gl = 3,8$; $P = 0,009$. Mortalidad de *C. externa*: $F = 6,1$; $gl = 3,8$; $P = 0,018$) (Fig. VI.2). En cuanto al efecto de los distintos insecticidas sobre las especies, el acetamiprid provocó una mayor mortalidad en *C. asoralis* que en *C. externa* mientras que no hubo diferencias significativas con piriproxifén (mortalidad con piriproxifén: $F = 0,03$; $gl = 1,4$; $P = 0,86$. Mortalidad con acetamiprid: $F = 97,68$; $gl = 1,4$; $P < 0,001$). En el gráfico puede observarse que en *C. asoralis* el dato de la cipermetrina no está presente, esto es debido a la gran mortalidad en el estado anterior.

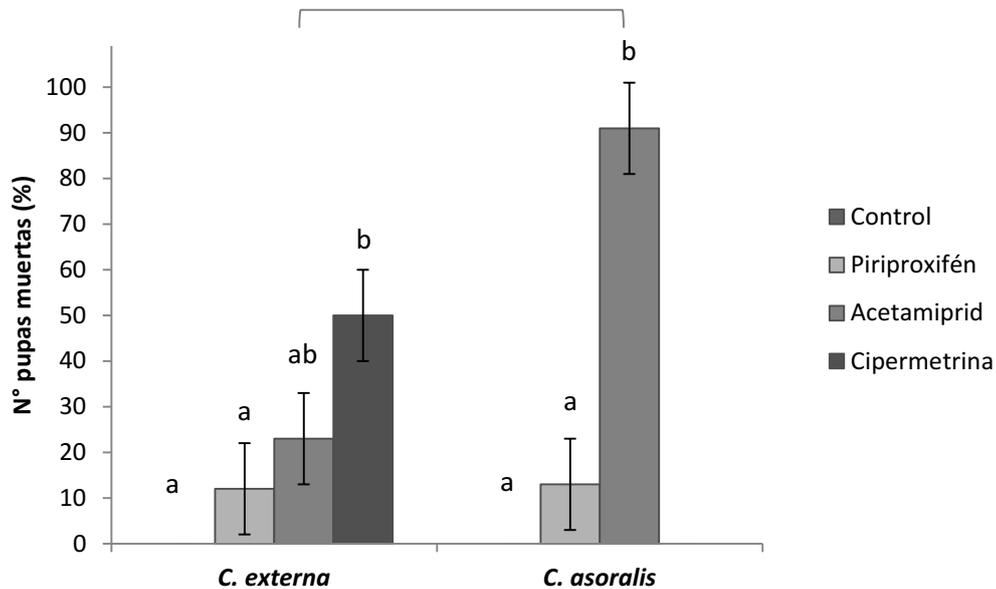


Figura VI.2: Porcentaje de mortalidad del estado pupal. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Las letras distintas denotan diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada especie. El corchete señala el tratamiento que mostró diferencias significativas entre especies ($P < 0,05$)

VI.3.1.3. Tiempo de desarrollo intermuda tercer estadio larval – pupa

En *C. asoralis*, pudo observarse un alargamiento significativo en el período larval a pupal con acetamiprid, mientras que en *C. externa* tanto la cipermetrina como el acetamiprid alargaron el período intermuda respecto del control siendo, el segundo el que más afectó dicho parámetro (Período larval a pupal de *C. asoralis* con los distintos tratamientos: $H = 21,63$; $gl = 2$; $P < 0,001$. Período larval a pupal de *C. externa*: $H = 27,07$; $gl = 2$; $P < 0,001$) (Fig. VI.3). Tanto en los tratamientos control como piriproxifén, el período intermuda fue mayor en *C. asoralis* que en *C. externa* con la excepción del tratamiento con acetamiprid donde fue mayor el período intermuda en *C. externa* (Período larval a pupal control: $F = 14,88$; $gl = 1,59$; $P < 0,001$. Período larval a pupal con piriproxifén: $F = 10,26$; $gl = 1,60$; $P = 0,002$. Período larval a pupal con acetamiprid: $H = 4,46$; $gl = 1$; $P = 0,03$).

Debido a la alta mortalidad en el estadio larval de *C. asoralis* con cipermetrina, no pudo agregarse este tratamiento en la comparación entre especies.

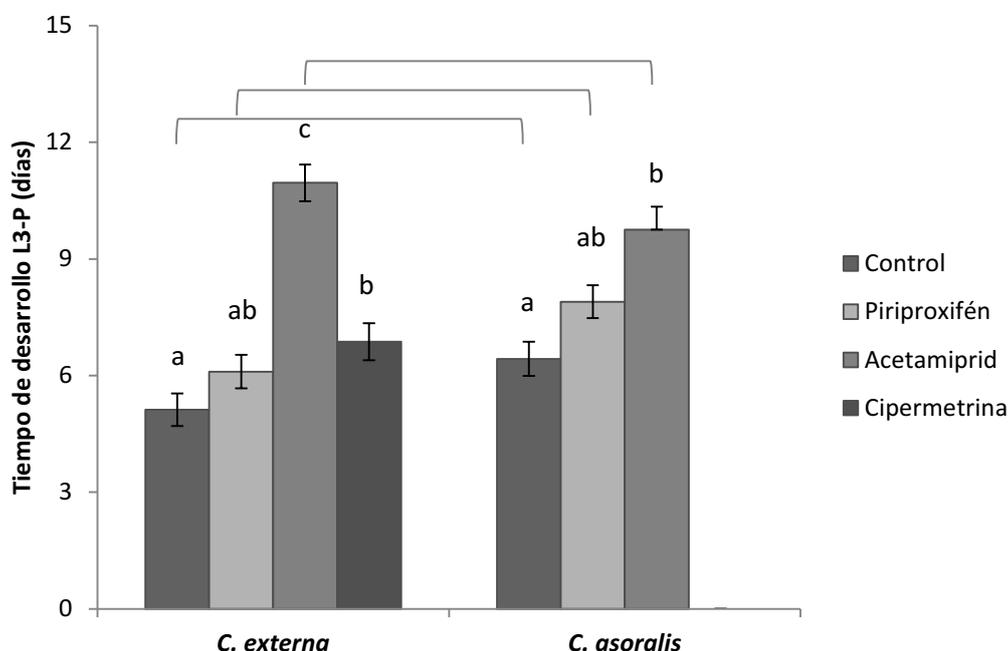


Figura VI.3: Tiempo de desarrollo intermuda larva - pupa. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Las letras distintas denotan diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada especie. Los corchetes señalan los tratamientos que mostraron diferencias significativas entre especies ($P < 0,05$)

VI.3.1.4. Tiempo de desarrollo intermuda pupa – adulto

Las pupas de *C. asoralis* tuvieron una muy alta mortalidad por lo que no pudo calcularse el tiempo de desarrollo de pupa a adulto. El tratamiento con piriproxifén no alargó el período respecto del control en esta especie. Por otro lado, en *C. externa*, el tratamiento con acetamiprid acortó el período de pupa a adulto de 8 días, respecto del control y de cipermetrina, mientras que el piriproxifén lo alargó a 10 días (período pupal a adulto de *C. asoralis*: $H = 2,43$; $gl = 1$; $P = 0,11$. Período pupal a adulto de *C. externa*: $H = 21,95$; $gl = 3$; $P < 0,001$) (Fig. VI.4).

No hubo diferencias significativas entre las especies tratadas con piriproxifén (período pupal a adulto control: $F = 3,34$; $gl = 1,54$; $P = 0,07$. Período pupal a adulto con piriproxifén: $F = 0,14$; $gl = 1,54$; $P = 0,71$).

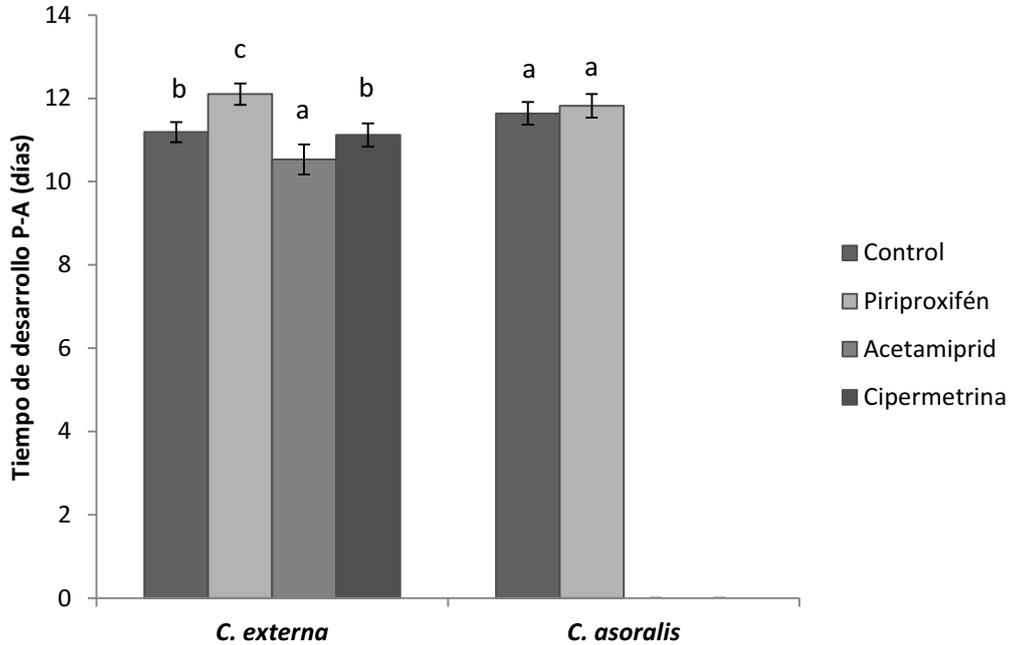


Figura VI.4: Tiempo de desarrollo intermuda pupa - adulto. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Las letras distintas denotan diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada especie ($P < 0,05$)

VI.3.1.5. Período preoviposición

Las hembras de *C. asoralis* presentaron un período preoviposición mayor que *C. externa* en el tratamiento control, sin embargo con el tratamiento con piriproxifén el mismo se acortó significativamente a la mitad (período preoviposición control entre especies: $F = 18,67$; $gl = 1,9$; $P = 0,001$. Período preoviposición con piriproxifén entre especies: $F = 2,12$; $gl = 1,9$; $P = 0,18$). *C. externa* no se vio afectada con ninguno de los tratamientos mientras que el piriproxifén acortó el período en *C. asoralis* (período preoviposición de *C. asoralis*: $F = 7$; $gl = 1,10$; $P = 0,02$. Período preoviposición de *C. externa*: $F = 1,40$; $gl = 2,13$; $P = 0,28$) (Fig. VI.5).

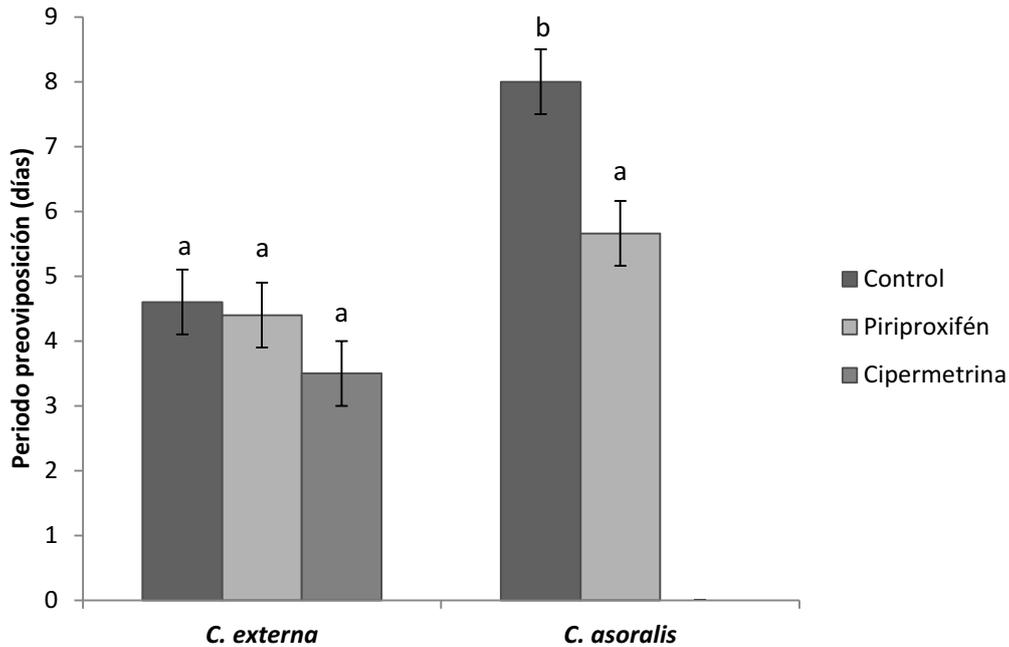


Figura VI.5: Período preoviposición. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Las letras distintas denotan diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada especie. El corchete señala el tratamiento que mostró diferencias significativas entre especies ($P < 0,05$)

VI.3.1.6. Fecundidad y fertilidad

En cuanto al número de huevos puestos por hembra y las larvas emergidas, no hubo diferencias significativas entre especies ni entre tratamientos (tratamientos dentro de cada especie. Fecundidad *C. asoralis*: $F = 0,96$; $gl = 1,12$; $P = 0,34$. Fecundidad *C. externa*: $H = 4,34$; $gl = 2$; $P = 0,11$. Fertilidad *C. asoralis*: $F = 0,67$; $gl = 1,12$; $P = 0,43$. Fertilidad *C. externa*: $H = 0,45$; $gl = 2$; $P = 0,79$) (Comparación entre especies. Fecundidad control: $F = 0,22$; $gl = 1,11$; $P = 0,64$. Fecundidad piriproxifén: $F = 0,0006$; $gl = 1,15$; $P = 0,98$. Fertilidad control: $F = 0,03$; $gl = 1,11$; $P = 0,86$. Fertilidad piriproxifén: $H = 0,27$; $gl = 1$; $P = 0,6$) (Figs. VI.6 y VI.7).

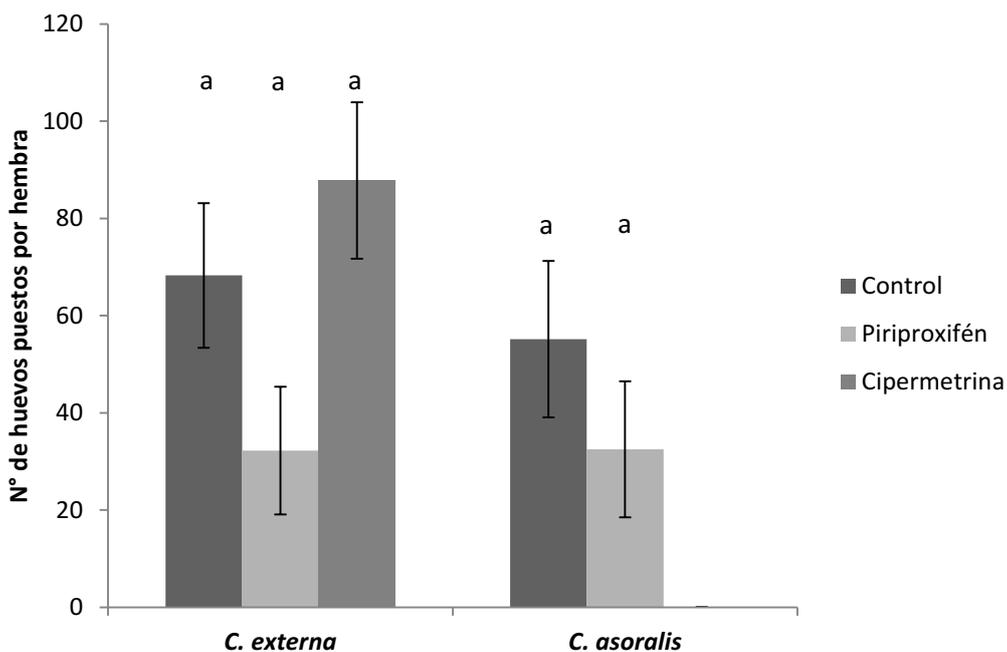


Figura VI.6: Fecundidad. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Las letras iguales denotan que no hay diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada especie ($P < 0,05$)

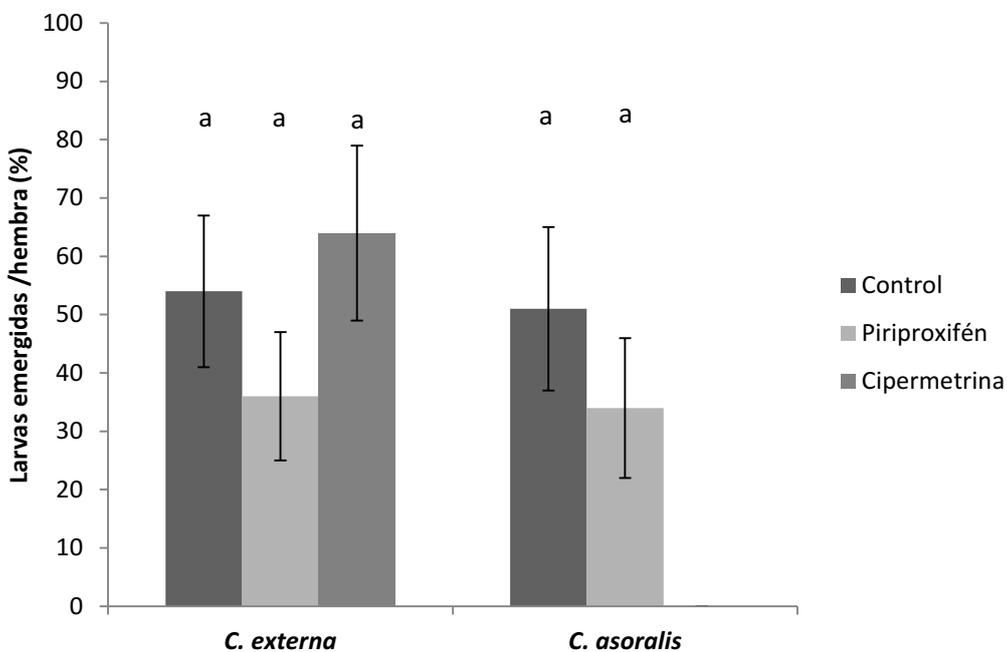


Figura VI.7: Fertilidad. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Las letras iguales denotan que no hay diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada especie ($P < 0,05$)

VI.3.2. Evaluación de toxicidad sobre el estado pupal

VI.3.2.1. Mortalidad

No se observó mortalidad durante el estado pupal de los individuos de *C. externa*. Por el contrario, en *C. asoralis* se registró mortalidad en los individuos tratados con cipermetrina, aunque fue muy baja con un 8,66% (Tabla VI.2) de pupas que no llegaron al estado adulto (mortalidad con cipermetrina: $H = 1,9$; $gl = 1$; $P = 0,31$).

Tabla VI.2. Porcentaje de mortalidad de pupas de *C. asoralis* con los distintos tratamientos. Los datos corresponden al promedio de tres réplicas \pm ES. Las letras iguales denotan que no hay diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada especie ($P < 0,05$)

% mortalidad pupal	Control	Piriproxifén	Acetamiprid	Cipermetrina
	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	8,66 \pm 4,48 a

VI.3.2.2. Tiempo de desarrollo intermuda pupa - adulto

El tratamiento con acetamiprid acortó el período intermuda de *C. asoralis* de manera significativa respecto del control. En *C. externa* se dio el mismo fenómeno diferenciándose este tratamiento de todos los restantes (período pupal a adulto de *C. asoralis*: $H = 22,43$; $gl = 3$; $P < 0,001$. Período pupal a adulto de *C. externa*: $H = 63,96$; $gl = 3$; $P < 0,001$) (Fig. VI.8).

En el tratamiento control *C. asoralis* tuvo un período mayor entre los estados pupal y adulto que *C. externa*. El acetamiprid también alargó el período, sin embargo no hubo diferencias entre especies con piriproxifén ni cipermetrina (período pupal a adulto control: $F = 9,31$; $gl = 1,59$; $P = 0,003$. Período pupal a adulto con piriproxifén: $H = 0,25$; $gl = 1$; $P = 0,61$. Período pupal a adulto con cipermetrina: $H = 1,63$; $gl = 1$; $P = 0,2$. Período pupal a adulto con acetamiprid: $H = 25,02$; $gl = 1$; $P < 0,001$).

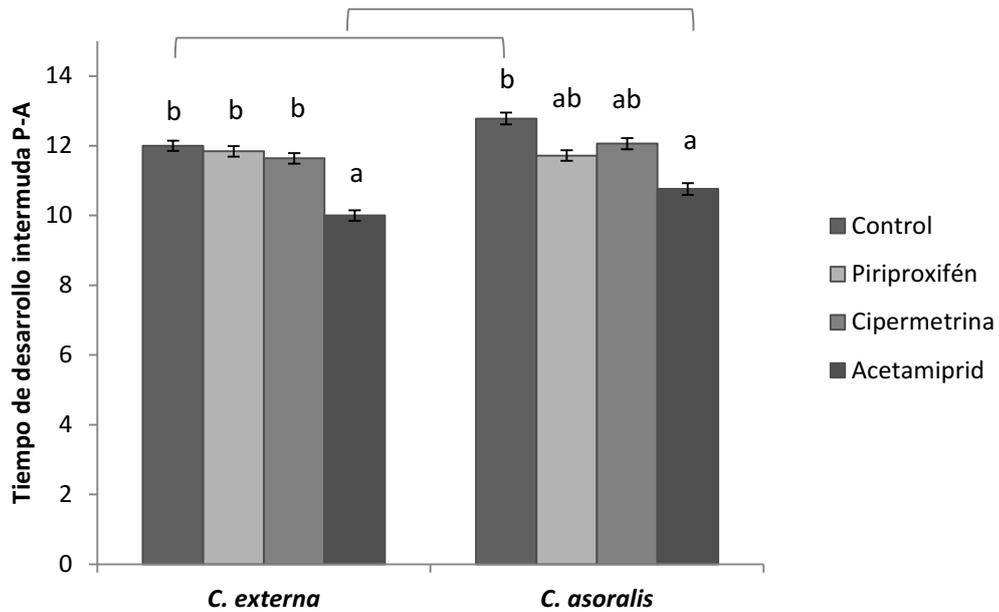


Figura VI.8: Tiempo de desarrollo intermuda pupa - adulto. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Las letras distintas denotan diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada especie. Los corchetes señalan los tratamientos que mostraron diferencias significativas entre especies ($P < 0,05$)

VI.3.2.3. Período preoviposición

Aunque fue posible obtener adultos luego de tratar las pupas con acetamidrid para ambas especies de crisópidos, no se registró la oviposición de ninguna hembra luego de formadas las parejas. En los otros tratamientos, *C. asoralis* tuvo un mayor período preoviposición que *C. externa* de la misma magnitud en todos los casos (período preoviposición control: $F = 26,18$; $gl = 1,12$; $P = 0,0003$. Período preoviposición con piriproxifén: $F = 8,23$; $gl = 1,8$; $P = 0,021$. Período preoviposición con cipermetrina: $F = 9,99$; $gl = 1,10$; $P = 0,01$). Considerando a cada especie, ningún tratamiento afectó dicho período (período preoviposición de *C. asoralis*: $F = 0,65$; $gl = 2,14$; $P = 0,53$. Período preoviposición de *C. externa*: $F = 0,34$; $gl = 2,14$; $P = 0,71$) (Fig. VI.9).

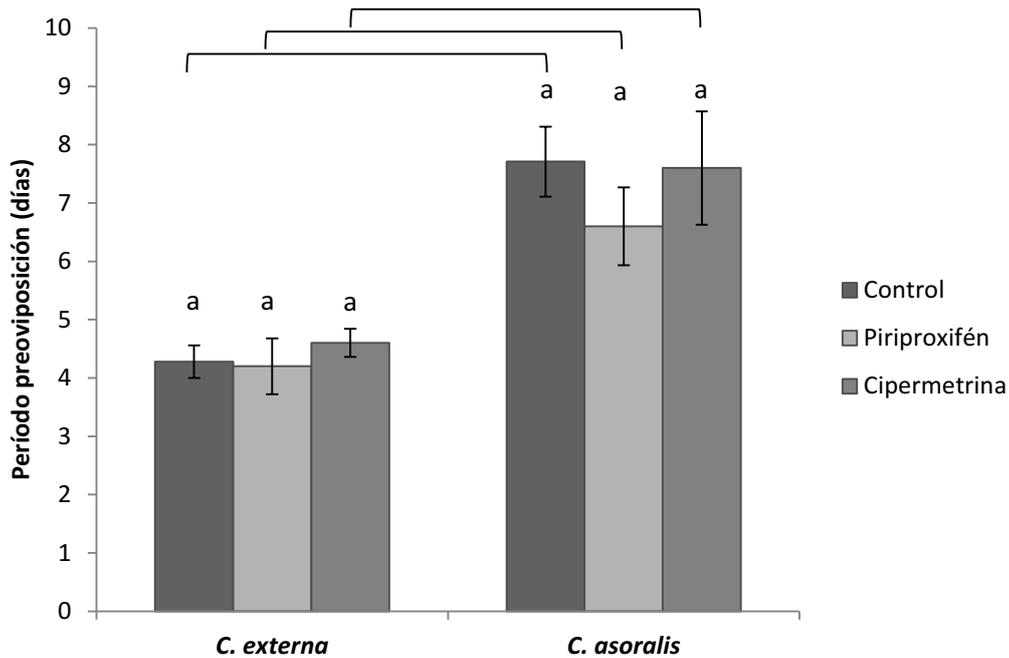


Figura VI.9: Período preoviposición. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Las letras iguales denotan que no hay diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada especie. El corchete señala los tratamientos que mostraron diferencias significativas entre especies ($P < 0,05$)

VI.3.2.4. Fecundidad y fertilidad

En cuanto a la cantidad de huevos puestos, no hubo diferencias con los distintos tratamientos dentro de cada especie, con un número de huevos de 60 a 110 para *C. externa* y de 20 a 90 para *C. asoralis*. La fertilidad, por otro lado, fue menor en *C. asoralis* que en *C. externa* en el tratamiento control (comparación entre especies. Fecundidad control: $F = 1,85$; $gl = 1,12$; $P = 0,19$. Fecundidad piriproxifén: $F = 0,6$; $gl = 1,8$; $P = 0,46$. Fecundidad cipermetrina: $F = 2,57$; $gl = 1,10$; $P = 0,14$. Fertilidad control: $H = 5,63$; $gl = 1$; $P = 0,017$. Fertilidad piriproxifén: $H = 3,23$; $gl = 1$; $P = 0,07$. Fertilidad cipermetrina: $F = 0,63$; $gl = 1,10$; $P = 0,44$). Los distintos tratamientos no afectaron la fecundidad ni la fertilidad de cada especie (fecundidad *C. asoralis*: $F = 0,23$; $gl = 2,14$; $P = 0,8$. Fecundidad *C. externa*: $F = 0,02$; $gl = 2,14$; $P = 0,98$. Fertilidad *C. asoralis*: $F = 0,19$; $gl = 2,14$; $P = 0,82$. Fertilidad *C. externa*: $F = 0,68$; $gl = 2,14$; $P = 0,52$) (Figs. VI.10 y VI.11).

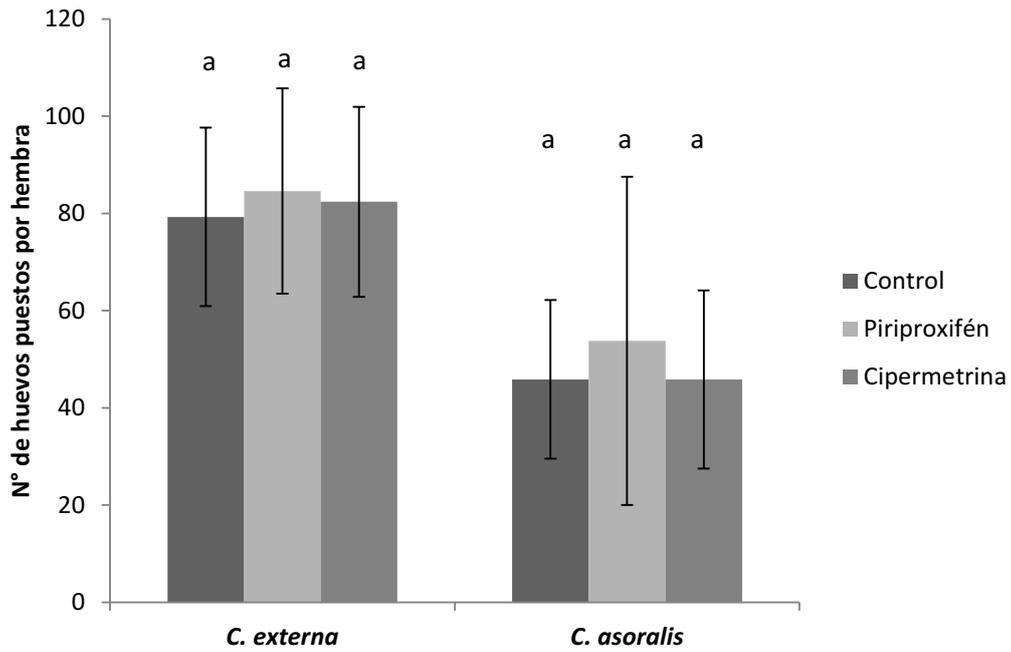


Figura VI.10: Fecundidad. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Las letras iguales denotan que no hay diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada especie ($P < 0,05$)

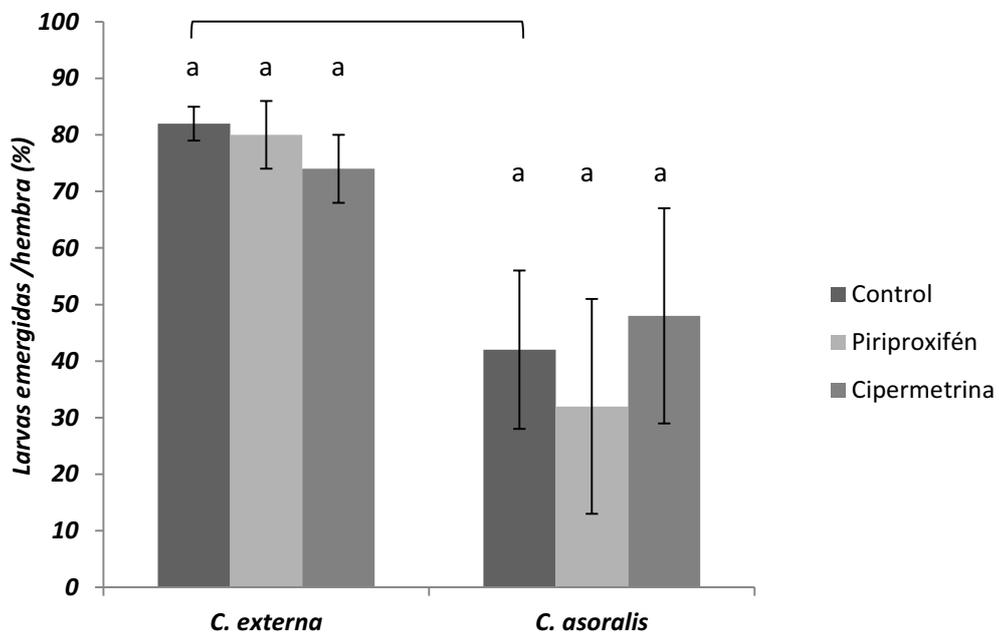


Figura VI.11: Fertilidad. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Las letras iguales denotan que no hay diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada especie. Los corchetes señalan los tratamientos que mostraron diferencias significativas entre especies ($P < 0,05$)

VI.3.3. Comparación de susceptibilidad entre estados de desarrollo tratados

A modo de síntesis de los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad, se comparó la susceptibilidad a insecticidas del tercer estadio larval y del estado pupal. Los datos fueron reagrupados y reanalizados por estado de desarrollo y especie. Para eso se comparó la mortalidad que produjeron los distintos tratamientos sobre el estado directamente tratado por aplicación tópica: la mortalidad de las larvas en los ensayos sobre larvas en relación con la mortalidad de pupas en los ensayos sobre pupas. En ambas especies de crisópidos, hubo alrededor de un 25% de larvas afectadas con acetamiprid mientras que no produjo mortalidad en las pupas tratadas. El piriproxifén tampoco afectó las pupas y las larvas no tuvieron una mortalidad considerable en ninguna de las especies. El tratamiento con cipermetrina sí afectó la mortalidad en *C. asoralis* en el estadio larval con un 85% de larvas muertas, mientras que larvas de *C. externa* no fueron afectadas; en ambas especies las pupas no tuvieron una mortalidad significativa (mortalidad con piriproxifén en *C. asoralis*: $H = 2,5$; $gl = 1$; $P = 0,11$ y *C. externa*: $H = 2,5$; $gl = 1$; $P = 0,11$. Mortalidad con acetamiprid en *C. asoralis*: $H = 4,5$; $gl = 1$; $P = 0,033$ y *C. externa*: $H = 4,5$; $gl = 1$; $P = 0,033$. Mortalidad con cipermetrina en *C. asoralis*: $F = 143,33$; $gl = 1,4$; $P < 0,001$ y *C. externa*: $H = 2,5$; $gl = 1$; $P = 0,11$) (Figs. VI.12 y V.13).

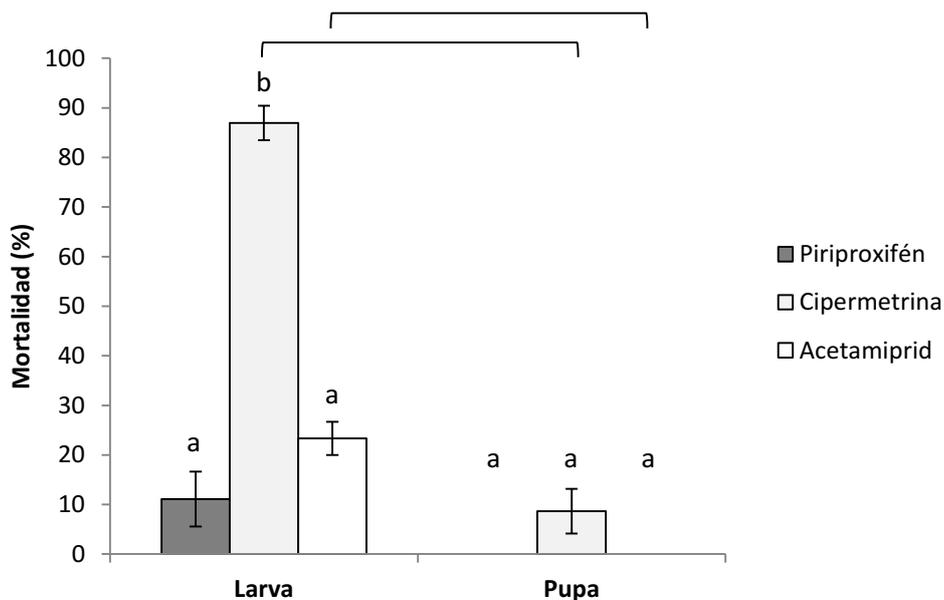


Figura VI.11: Mortalidad en los distintos estados tratados en *Chrysoperla asoralis*. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Las letras distintas denotan diferencias

significativas entre los tratamientos dentro de cada estado. Los corchetes señalan los tratamientos que mostraron diferencias significativas entre especies ($P < 0,05$)

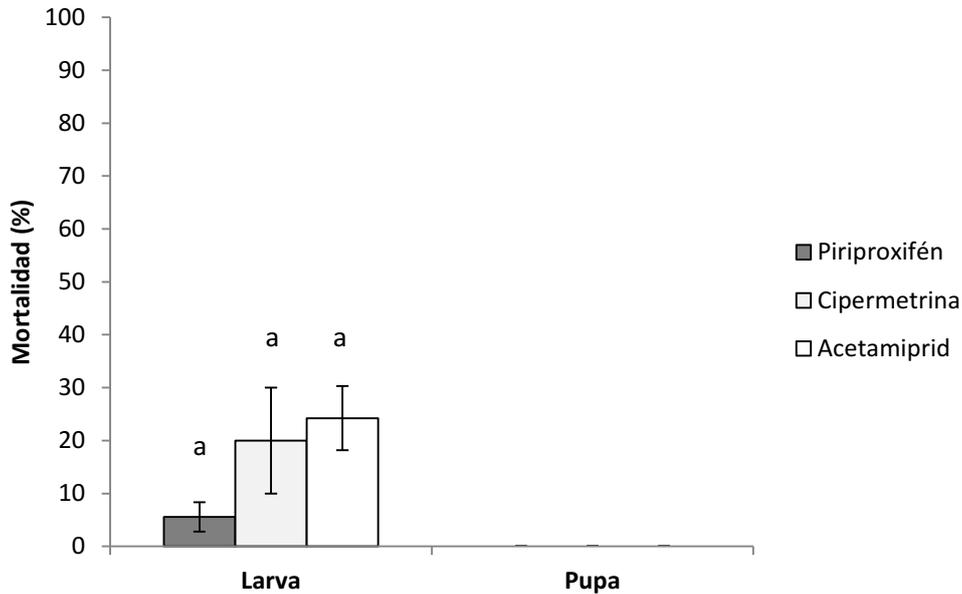


Figura VI.12: Mortalidad en los distintos estados tratados en *Chrysoperla externa*. Cada barra es el promedio de tres réplicas. Las líneas verticales son los ES. Las letras iguales denotan que no hay diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada estado ($P < 0,05$)

VI.4. Discusión

Estos estudios revelaron la mayor susceptibilidad de la especie *C. asoralis* en comparación con *C. externa* a los insecticidas probados. La mortalidad de larvas tratadas con cipermetrina en *C. asoralis* fue de un 90% y en *C. externa* de un 20%. Las larvas de *C. asoralis* que llegaron al estado de pupa, y que habían sido tratadas con acetamiprid, tuvieron una mortalidad del 80% en este estado. *C. externa* por su parte tuvo una muy baja mortalidad de pupas con acetamiprid, pero un 50% con cipermetrina. Piriproxifén no produjo mortalidad larval ni pupal. Ésto coincide con Vivek *et al.* (2012), quienes demostraron una toxicidad alta en larvas de *C. carnea* con acetamiprid llegando a una mortalidad casi del 80% luego de 72 h de alimentadas con presa tratada, al igual que el insecticida neonicotinoide tiametoxán. Shinde *et al.* (2009) observaron una mortalidad que pasó del 53% al 80%, a las 24 h y 72 h post-tratamiento respectivamente, cuando *C. carnea* fue expuesta a acetamiprid de manera residual. A su vez, estudios de campo de acetamiprid sobre la abundancia poblacional de depredadores de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), entre ellos *C. carnea*,

demonstraron ser altamente tóxicos para este último con una reducción del 36% de la población (Naranjo & Akey 2005).

En cuanto a la toxicidad de la cipermetrina sobre *C. asoralis*, pero no en *C. externa*, estos resultados soportan la hipótesis de que la tolerancia a este insecticida que presenta la segunda especie, se debe a una tolerancia natural (Capítulo V). Por otro lado, hay estudios sobre crisópidos que muestran que la toxicidad de piretroides fue alta (Amarasekare & Shearer 2013; Rugno *et al.* 2013), con lo cual se verifica que la distinta susceptibilidad a este tipo de insecticidas varía según la especie y el ingrediente activo. Los resultados obtenidos sobre larvas tratadas con piriproxifén coincidieron con aquellos sobre *Ceraeochrysa cubana* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) donde no se registraron efectos letales ni subletales (Rugno *et al.* 2013).

En cuanto al tiempo de desarrollo de larva a pupa, ambas especies tuvieron un alargamiento del mismo en los tratamientos con acetamiprid. Esto podría indicar un efecto negativo sobre el crecimiento de las larvas viéndose aumentado el tiempo de desarrollo. Efectos de alargamiento de período intermuda de huevo a adulto se observaron en Fogel *et al.* (2013), cuando los huevos de *E. connexa* fueron tratados con acetamiprid.

Los adultos sobrevivientes mostraron un período de preoviposición diferente entre especies en el tratamiento control: aproximadamente 5 días en *C. externa* y 8 días en *C. asoralis*. Los parámetros reproductivos no tuvieron diferencias entre ambas especies. Los distintos tratamientos sobre larvas no afectaron la fecundidad ni la fertilidad de las hembras.

En los tratamientos sobre pupas pudo observarse que este estado es mucho más tolerante que el larval, sin presentar mortalidad con cipermetrina ni acetamiprid, los cuales fueron los más tóxicos sobre larvas. Esto puede deberse a la protección que confiere el cocón de seda que construye la larva de tercer estadio, evitando la penetración de los insecticidas (de Fátima *et al.* 2013, Rugno *et al.* 2015). Es sabido que los cocones o capullos en las pupas, naturalmente brindan protección a dicho estado contra depredadores, por ejemplo.

El período que transcurre hasta llegar a adultos se redujo con el tratamiento con acetamiprid en ambas especies. En *C. asoralis* además se acortó con el piriproxifén y la cipermetrina. Estos resultados podrían deberse a una respuesta de defensa de los individuos expuestos a los insecticidas, en la cual el insecto sufre mecanismos que aceleran los procesos fisiológicos hasta la ecdisis. El fluido ecdisial se acumula entre la vieja y la nueva cutícula durante la muda de los insectos. La secreción de este fluido no solo regula la ecdisis sino que actúa en la protección del organismo (Zhang *et al.* 2014).

En cuanto a los parámetros reproductivos, acetamiprid actuó negativamente sobre las hembras, quienes no ovipusieron. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Fogel *et al.* (2013) sobre *E. connexa*, quienes demostraron que la capacidad reproductiva de adultos provenientes de larvas tratadas con acetamiprid se vio reducida.

Se observó un tiempo de preoviposición mayor en *C. asoralis* que en *C. externa* en el control, con 8 y 5 días respectivamente. La fecundidad y fertilidad tampoco se vieron afectadas y *C. asoralis* presentó una fertilidad menor que *C. externa* en el tratamiento control. Las diferencias entre las especies dentro de los controles eran esperables, siendo estas características propias de cada una. En este sentido puede decirse que la especie *C. asoralis* tiene un tiempo de desarrollo intermuda de larva a pupa y de pupa a adulto, mayor que la especie *C. externa*. También es mayor su período preoviposición y el número de neonatas emergidas es menor que *C. externa*, aunque hacen falta más estudios que permitan concluir sobre los diferentes valores de estos parámetros entre los ensayos sobre larvas y pupas.

Otro aspecto importante en el análisis de toxicidad de un organismo ya sea plaga o enemigo natural, es la tolerancia diferencial a insecticidas según el estado de desarrollo expuesto a los mismos. En el caso de las crisopas, los estados de huevo y pupa son los más resistentes (Rugno *et al.* 2015) y esto pudo corroborarse en el presente estudio.

Resulta indispensable el estudio de insecticidas en la fauna benéfica local. La nueva asociación dada por *C. asoralis* con el cultivo de pimiento, podría aprovecharse e incluir esta especie en programas de control biológico.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- En esta tesis se evaluó la susceptibilidad a insecticidas piretroides (cipermetrina), neonicotinoides (acetamiprid), IGR (piriproxifén) y bioplaguicidas botánicos (azadiractina), en larvas del tercer estadio y pupas de *C. externa*, comparando colonias de campo del CHP, Prov. de Buenos Aires, Argentina, con una colonia de laboratorio.
- También se reportó por primera vez la presencia de *C. asoralis* y *C. argentina*, además de *C. externa*, en el CHP, y en asociación con el cultivo de pimiento *Capsicum annuum* L.
- Las dos poblaciones de campo de *C. externa* probaron ser susceptibles a los insecticidas evaluados, como también lo fue la colonia de laboratorio usada como referencia.
- La toxicidad del piretroide cipermetrina fue baja en ambas poblaciones y en la colonia de *C. externa*. La aplicación tópica de 37,5 mg i.a./L (1,5 veces la MCRC) produjo un 60% de mortalidad en larvas del tercer estadio, mientras que el 100% de las pupas resultantes sobrevivió. En comparación con los controles, la cipermetrina no modificó la fecundidad ni la fertilidad.
- La toxicidad del neonicotinoide acetamiprid fue mayor que la de la cipermetrina en larvas del tercer estadio. La mortalidad aumentó al aumentar la dosis del insecticida. La misma tendencia se observó en las pupas resultantes de las larvas sobrevivientes, llegando a una muy baja cantidad de individuos al estado adulto.
- Ninguna de las concentraciones del bioplaguicida azadiractina produjo mortalidad en larvas del tercer estadio, pero todas causaron un 100% de mortalidad durante el estadio de pupa.
- La aplicación simultánea de cipermetrina y los sinergistas inhibidores enzimáticos, piperonil butóxido (PBO) o el S,S,S tributil fosforotritioato (DEF), aumentó la toxicidad del piretroide. Estos resultados sugieren que las enzimas P450 y esterasas podrían intervenir en la biotransformación de cipermetrina.

- La actividad enzimática de los individuos de laboratorio fue igual a la de individuos de campo, lo cual sugiere que los procesos de detoxificación de la especie, se mantiene sin haber estado expuesta a insecticidas.
- Larvas del tercer estadio de la especie *C. asoralis* resultaron más susceptibles a cipermetrina y acetamiprid en comparación con *C. externa*. El insecticida regulador de crecimiento piriproxifén, no resultó tóxico para ninguna de las dos especies. Por otro lado, aplicaciones de los mismos insecticidas sobre pupas, demostraron que este estado es tolerante a aplicaciones tóxicas comparado con estadios larvales.
- La especie *C. externa* presenta tolerancia natural al insecticida cipermetrina, probablemente por una mayor acción detoxificante por parte de enzimas P450 y esterasas. Esta tolerancia, propia de la especie, hace que incluso individuos de laboratorio sin exposición a insecticidas puedan sobrevivir a aplicaciones de piretroides.
- Dicha característica es de suma importancia en programas de cría masiva de este depredador, ya que al momento de la liberación en campo, los individuos serían capaces de sobrevivir a las aplicaciones y/o presencia de residuos de insecticidas, sin haber sido expuestos a los mismos durante su cría.

REFERENCIAS

- Adams, P. A., & Penny, N. D. (1985). Neuroptera of the Amazon basin. Part 11a. *Acta Amazonica*, 15(3-4), 413-480.
- Al-Deeb, M. A. (2014). Pyrethroid Insecticide Resistance *kdr* Gene in the House Fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), in the United Arab Emirates. *Agricultural Sciences*, 5(14), 1522.
- Alston, D. G. (1996). Pest management decision-making: the economic-injury level concept. Utah State University Cooperative Extension. Utah Pests Fact Sheet IPM-016-11. URL: <http://www.utahpests.usu.edu>.
- Alzogaray, R. A., & Zerba, E. N. (1997). Incoordination, paralysis and recovery after pyrethroid treatment on nymphs III of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92, 431-435.
- Amarasekare, K. G., & Shearer, P. W. (2013). Comparing effects of insecticides on two green lacewings species, *Chrysoperla johnsoni* and *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Journal of economic entomology*, 106(3), 1126-1133.
- Awasthi, N. S., Barkhade, U. P., Patil, S. R., & Lande, G. K. (2013). Comparative toxicity of some commonly used insecticides to cotton aphid and their safety to predatory coccinellids. *The Bioscan*, 8(3), 1007-1010.
- Barbosa, P. A. (Ed.). (1998). *Conservation biological control*. Academic Press.
- Barbosa, L. R., Carvalho, C. F. D., Souza, B., & Auad, A. M. (2008). Efficiency of *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) in the *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) population reduction in sweet pepper (*Capsicum annum* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, 32(4), 1113-1119.
- Barbosa, W. F., De Meyer, L., Guedes, R. N. C., & Smagghe, G. (2015). Lethal and sublethal effects of azadirachtin on the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology*, 24(1), 130-142.
- Bashir, N. H., & Crowder, L. A. (1983). Mechanisms of permethrin tolerance in the common green lacewing (Neuroptera: Chrysopidae). *Journal of Economic Entomology*, 76(3), 407-409.
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S., & Nauen, R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 121:78-87
- Bastidas, J. S., Devia, E. H. V., & Amaya, Ó. S. (2010). Breeding and test of the predatory capacity of *Chrysoperla externa* on *Neohydatotrips signifer*, a pestiferous trips of the passion fruit crop. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecu* 11(1):31-40

- Bento, A., Lopes, J., Torres, L., & Passos-Carvalho, P. (1997) Biological control of *Prays oleae* (Bern.) by chrysopids in Trás-os-Montes region (Northeastern Portugal). In *III International Symposium on Olive Growing 474* (pp. 535-540).
- Brooks, S. J. (1994). A taxonomic review of the common green lacewing genus *Chrysoperla* (Neuroptera: Chrysopidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology Series (United Kingdom)*. 63: 137-210.
- Brunstein, L., Digón, A., Licastro, S., Moreno, I. 2009. Generalidades sobre plaguicidas y control de plagas. En: Plaguicidas. Información y estrategias para la gestión ecológicamente racional de plaguicidas de uso sanitario. (Ed) Departamento de Salud Ambiental. Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación. *Ministerio de Salud de la Nación. Buenos Aires, Argentina*. pp 11 [en línea] http://www.sertox.com.ar/img/item_full/LIBRO%20II%20final%20febrero10.pdf 5/5/2013
- Bueno, A. F., & Freitas, S. (2006). Efeito do hexythiazox e imidacloprid sobre ovos larvas e adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). *Revista Ecosistema* 26 (1): 74-76.
- Burgess, I. F. (2004). Human lice and their control. *Annual Reviews in Entomology*, 49(1), 457-481.
- Canard, M. (2001). Natural food and feeding habits of lacewings. *Lacewings in the crop environment*, 116-129.
- Carlson, G. R., Dhadialla, T. S., Hunter, R., Jansson, R. K., Jany, C. S., Lidert, Z., & Slaweki, R. A. (2001). The chemical and biological properties of methoxyfenozide, a new insecticidal ecdysteroid agonist. *Pest management science*, 57(2), 115-119.
- Carvalho, G. A., Carvalho, C. F., Souza, B., & Ulhôa, J. L. (2002). Selectivity of Insecticides to *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). *Neotropical Entomology*, 31(4), 615-621.
- CASAFE. 2015. Mercado Argentino 2015 de Productos Fitosanitarios. Ed: *Kleffmann group, Argentina*.
- Cappello, V. Y., & Fortunato, N. (2008). Plaguicidas en la Provincia de Buenos Aires: información toxicológica, y aspectos ambientales. Organismo Provincial para el Desarrollo Sustentable. *Dirección Provincial de Recursos Naturales, Programa de Gestión Ambiental en Agroecosistemas*. , 1-146.
- Coles, T. B., & Dryden, M. W. (2014). Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. *Parasit Vectors*, 7(8).
- Croft, B. A., & Morse, J. G. (1979). Recent advances in natural enemy-pesticide research. *Entomophaga*, 24, 3-11.

- Daanel, K. M., & Yokota, G. Y. (1997). Release strategies affect survival and distribution of green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) in augmentation programs. *Environmental Entomology*, 26(2), 455-464.
- de Fátima T, A., Andrade, C., Costa, L. V., & Fonseca, M. (2013). Selectivity of seven insecticides against pupae and adults of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). *Revista Colombiana de entomología*, 39(1), 34-39.
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, 52, 81-106.
- Devine, G. J., Eza, D., Ogusuku, E., & Furlong, M. J. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista peruana de medicina experimental y Salud Pública*, 25(1), 74-100.
- Dhadialla, T. S., Retnakaran, A., & Smagghe, G. (2010). Insect growth-and development-disrupting insecticides. *Insect development: morphogenesis, molting and metamorphosis*, 679-740.
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., ... & Zhorov, B. S. (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 50, 1-17.
- Duelli, P. (2001). Lacewings in field crops. In: McEwen, P.K., New, T.R., Whittington, A.E. (Eds.), *Lacewings in the Crop Environment*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 158–164.
- Edi, C. V., Djogbenou, L., Jenkins, A. M., Regna, K., Muskavitch, M. A., Poupardin, R., ... & Weetman, D. (2014). CYP6 P450 enzymes and ACE-1 duplication produce extreme and multiple insecticide resistance in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Genetics*, 10(3).
- Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4), 387-400.
- El-Wakeil, N., Sallam, A., Volkmar, C., & Gaafar, N. (2013). Side effects of insecticides on natural enemies and possibility of their integration in plant protection strategies. *INTECH Open Access Publisher*: 3-56.
- Elliott, M. (1977). Synthetic pyrethroids: a symposium sponsored by the Division of Pesticide Chemistry at the 172nd meeting of the American Chemical Society, San Francisco, California. In: *American Chemical Society. ACS symposium series (USA)*. American Chemical Society.
- FAO. 2000. Las negociaciones comerciales multilaterales sobre la agricultura III. Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias y Acuerdo sobre Obstáculos Técnicos al Comercio. Módulo 5.

- FAO. 2013. La soja ocupará 20 de las 34 millones de hectáreas sembradas en Argentina para 2013 [en línea]. Disponible en: [http://www.fao.org/agronoticias/agronoticias/detalle/es/?dyna_fef\[uid\]=161730](http://www.fao.org/agronoticias/agronoticias/detalle/es/?dyna_fef[uid]=161730) 30/5/2013.
- Fathian, M., Vatandoost, H., Moosa-Kazemi, S. H., Raeisi, A., Yaghoobi-Ershadi, M. R., Oshaghi, M. A., & Sedaghat, M. M. (2015). Susceptibility of Culicidae mosquitoes to some insecticides recommended by WHO in a malaria endemic area of Southeastern Iran. *Journal of arthropod-borne diseases*, 9(1), 22.
- Feyereisen, R. (1999). Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, 44(1), 507-533.
- Fiedler, A. K., Landis, D. A., & Wratten, S. D. (2008). Maximizing ecosystem services from conservation biological control: the role of habitat management. *Biological Control*, 45(2), 254-271.
- Fisher, T. W., Bellows, T. S., Caltagirone, L. E., Dahlsten, D. L., Huffaker, C. B., & Gordh, G. (Eds.). (1999). *Handbook of biological control: principles and applications of biological control*. Academic Press.
- Flores, J. L., Acevedo, L. P. G., Uribe, L. A. A., Chavez, E. C., Zabeh, M. H. B., & Fuentes, Y. M. O. (2013). Functional Response of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) on *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) Eggs. *Southwestern Entomologist*, 38(2), 345-352.
- Fogel, M. N., Schneider, M. I., Desneux, N., González, B., & Ronco, A. E. (2013). Impact of the neonicotinoid acetamiprid on immature stages of the predator *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ecotoxicology*, 22(6), 1063-1071.
- 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.
- Gholizadeh, S., Nouroozi, B., & Ladonni, H. (2014). Molecular Detection of Knockdown Resistance (kdr) in *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae) From Northwestern Iran. *Journal of Medical Entomology*, 51(5), 976-979.
- Gnanamani, R., & Dhanasekaran, S. (2013). Growth inhibitory effects of azadirachtin against *Pericallia ricini* (Lepidoptera: Arctiidae). *World Journal of Zoology*, 8(2), 185-191.
- Godoy, M. S., Carvalho, G. A., Carvalho, B. F., & Lasmar, O. (2010). Seletividade fisiológica de inseticidas em duas espécies de crisopídeos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(11), 1253-1258.
- González Olazo, E., & Heredia, F. (2007). Los Chrysopidae (Insecta: Neuroptera) de la ecorregión paranaense argentina. Fac. de Cienc. Naturales UNT. *Serie Monográfica y Didáctica*, 46, 71.

- González Olazo, E. V., & Reguilón, C. (2002). Una nueva especie de *Chrysoperla* (Neuroptera: Chrysopidae) para la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomologica Argentina*, 61(1-2), 47-50.
- González Olazo, E. V., Lanati, S. J., & Heredia, J. F. (2009). Morfología y datos biológicos de los estados preimaginales de *Chrysoperla asoralis* (Neuroptera: Chrysopidae). *Acta Zoológica Lilloana*, 53(1-2), 21-28.
- González, E. V., Heredia, J. F., Cichón, L., Fernández, D., & Garrido, S. (2011). Crisópidos (Insecta: Neuroptera) asociados a frutales de pepita en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén (región Patagonia Norte Argentina). *Horticultura Argentina*. 30(73): 5-8.
- Goulson, D. (2013). Review: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4), 977-987.
- Grafton-Cardwell, E. E., & Hoy, M. A. (1985). Intraspecific variability in response to pesticides in the common green lacewing, *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). University of California. *Hilgardia* 53 (6): 1-32.
- Grafton-Cardwell, E. E., & Gu, P. (2003). Conserving vedalia beetle, *Rodolia cardinalis* (Mulsant)(Coleoptera: Coccinellidae), in citrus: a continuing challenge as new insecticides gain registration. *Journal of economic entomology*, 96(5), 1388-1398.
- Greathead, D.J., 1995. Benefits and risks of classical biological control. In: H.M.T. Hokkanen and J.M. Lynch (eds), *Biological Control: Benefits and Risks*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 53–63.
- Greeve, L. (1984). Chrysopid distribution in northern latitudes, pp. 180-186. In; *Biology of Chrysopidae*. (ed) Dr. W. Junk Publishers, The Hague, The Netherlands.
- Grigg-McGuffin, K., Scott, I. M., Bellerose, S., Chouinard, G., Cormier, D., & Scott-Dupree, C. (2015). Susceptibility in field populations of codling moth, *Cydia pomonella* (L.)(Lepidoptera: Tortricidae), in Ontario and Quebec apple orchards to a selection of insecticides. *Pest management science*, 71(2), 234-242.
- Guerrero, F. D., Jamroz, R. C., Kammlah, D., & Kunz, S. E. (1997). Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of kdr and super-kdr point mutations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(8), 745-755.
- Hajek, A. E. (2004). Natural enemies: an introduction to biological control. *Cambridge University Press*.
- Henry, C. S., Brooks, S. J., Thierry, D., Duelli, P., & Johnson, J. B. (2001). The common green lacewing (*Chrysoperla carnea* s. lat.) and the sibling species problem. *Lacewings in the crop environment*, 29-42.
- Hodek, I., Honek, A., & van Emden, H. F. (2012). Ecology and behaviour of the ladybird beetles (Coccinellidae). *John Wiley & Sons*.

- Hoffmann, J., & Porchet, M. (Eds.). (2012). Biosynthesis, metabolism and mode of action of invertebrate hormones. *Springer Science & Business Media*.
- Censo Hortiflorícola (2005). Buenos Aires. Ministerio de Asuntos Agrarios, Secretaria de Agricultura y Ganadería.
- Hoy, M. A. (1990). Pesticide resistance in arthropod natural enemies: variability and selection responses. In *Pesticide resistance in arthropods* (pp. 203-236). Springer US.
- Iannacone, J., & Lamas, G. (2002). Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 65, 92-101.
- Iannacone, J., Alvariño, L., La Rosa, R., & La Torre, M. I. (2015). Toxicidad aguda y crónica del metomilo y la lantana camara (verbenaceae) a cinco controladores biológicos de plagas agrícolas en el Perú. *Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego*, 8(1), 169-183.
- Ishaaya, I., & Casida, J. E. (1981). Pyrethroid esterase (s) may contribute to natural pyrethroid tolerance of larvae of the common green lacewing. *Environmental Entomology*, 10(5), 681-684.
- Ishaaya, I., & Horowitz, A. R. (Eds.). (2009). Biorational control of arthropod pests. Springer.
- Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51, 45-66.
- Isman, M. B. (2008). Botanical insecticides: for richer, for poorer. *Pest Management Science*, 64(1), 8-11.
- Joußen, N., Agnolet, S., Lorenz, S., Schöne, S. E., Ellinger, R., Schneider, B., & Heckel, D. G. (2012). Resistance of Australian *Helicoverpa armigera* to fenvalerate is due to the chimeric P450 enzyme CYP337B3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 109(38), 15206-15211.
- Kogan, M. (1998). Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. *Annual Review of Entomology*, 43(1), 243-270.
- Lavagnini, T. C., Morales, A. C., & Freitas, S. (2015). Population genetics of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) and implications for biological control. *Brazilian Journal of Biology*.
- Lin, Y., Jin, T., Zeng, L., & Lu, Y. (2012). Cuticular penetration of β -cypermethrin in insecticide-susceptible and resistant strains of *Bactrocera dorsalis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(3), 189-193.

- Lingren, P. D., Ridgway, R. L., & Jones, S. L. (1968). Consumption by several common arthropod predators of eggs and larvae of two *Heliothis* species that attack cotton. *Annals of the Entomological Society of America*, 61(3), 613-618.
- Lundgren, J. G. (2009). Relationships of natural enemies and non-prey foods (Vol. 7). *Springer Science & Business Media*.
- Maleki, N., & Damavandian, M. R. (2015). Determination of economic injury level for first and second generations of *Pulvinaria aurantii* (Hem: Coccidae) in Thomson navel orange orchards. *Arthropods*, 4(1), 13.
- Mansoor, M. M., Abbas, N., Shad, S. A., Pathan, A. K., & Razaq, M. (2013). Increased fitness and realized heritability in emamectin benzoate-resistant *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Ecotoxicology*, 22(8), 1232-1240.
- McEwen, P. K., New, T. R. R., & Whittington, A. (2001). Lacewings in the crop management. *Cambridge*.
- Medina, P., Budia, F., Tirry, L., Smagghe, G., & Vinuela, E. (2001). Compatibility of spinosad, tebufenozide and azadirachtin with eggs and pupae of the predator *Chrysoperla carnea* (Stephens) under laboratory conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 11(5), 597-610.
- Medina, P., Smagghe, G., Budia, F., Tirry, L., & Vinuela, 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.
- Monserrat, V. J., & de Freitas, S. (2005). Contribución al conocimiento de los Crisópidos de Coquimbo, Patagonia y Tierra del Fuego (Argentina, Chile)(Insecta, Neuroptera, Chrysopidae). *Graellsia*, 61(2), 163-179.
- Mordue, A. J. (2004). Present concepts of the mode of action of azadirachtin from neem. In *Neem: Today and in the New Millennium* (pp. 229-242). Springer Netherlands.
- Morgan, E. D. (2009). Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(12), 4096-4105.
- Morzycka, B. (2002). Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 982(2), 267-273.
- Moura, A. P., Carvalho, G. A., Moscardini, V. F., Lasmar, O., Rezende, D. T., & Marques, M. C. (2010). Selectivity of pesticides used in integrated apple production to the lacewing, *Chrysoperla externa*. *Journal of Insect Science*, 10(1), 121.
- Moura, A. P. D., Carvalho, G. A., Cosme, L. V., Alves, E., Botton, M., & Silva, P. S. (2011). Toxicological and ultrastructural analysis of the impact of pesticides used in temperate fruit

- crops on two populations of *Chrysoperla externa* (Neuroptera, Chrysopidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 55(3), 411-418.
- Moura, A. P., Carvalho, G. A., & Botton, M. (2012). Residual effect of pesticides used in Integrated Apple Production on *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) larvae. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72(2), 217-223.
- Myrick, S., Norton, G. W., Selvaraj, K. N., Natarajan, K., & Muniappan, R. (2014). Economic impact of classical biological control of papaya mealybug in India. *Crop Protection*, 56, 82-86.
- Naranjo, S. E., & Akey, D. H. (2005). Conservation of natural enemies in cotton: comparative selectivity of acetamiprid in the management of *Bemisia tabaci*. *Pest Management Science*, 61(6), 555-566.
- Naranjo, S. E., Ellsworth, P. C., & Frisvold, G. B. (2015). Economic value of biological control in integrated pest management of managed plant systems. *Annual review of entomology*, 60, 621-645.
- Nauen, R., Vontas, J., Kausmann, M., & Wölfel, K. (2013). Pymetrozine is hydroxylated by CYP6CM1, a cytochrome P450 conferring neonicotinoid resistance in *Bemisia tabaci*. *Pest Management Science*, 69(4), 457-461.
- Naumann, K. (2000). Influence of chlorine substituents on biological activity of chemicals: a review. *Pest Management Science*, 56(1), 3-21.
- Ndiath, M. O., Cailleau, A., Diedhiou, S. M., Gaye, A., Boudin, C., Richard, V., & Trape, J. F. (2014). Effects of the *kdr* resistance mutation on the susceptibility of wild *Anopheles gambiae* populations to *Plasmodium falciparum*: a hindrance for vector control. *Malaria Journal*, 13, 340.
- Ndiath, M. O., Cailleau, A., Orlandi-Pradines, E., Bessell, P., Pagès, F., Trape, J. F., & Rogier, C. (2015). Emerging knock-down resistance in *Anopheles arabiensis* populations of Dakar, Senegal: first evidence of a high prevalence of *kdr-e* mutation in West African urban area. *Malaria Journal*, 14(1), 364.
- New, T. R. (2001). Introduction to the systematics and distribution of Coniopterygidae, Hemerobiidae, and Chrysopidae used in pest management. *Lacewings in the crop environment*, 6-28.
- Norris, R. F., Caswell-Chen, E. P., & Kogan, M. (2003). Concepts in integrated pest management (p. 586). *Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall*.
- Onstad, D. W. (Ed.). (2013). Insect resistance management: biology, economics, and prediction. *Academic Press, Elsevier*.

- Osborne, M. P., & Smallcombe, A. (2013). Site of action of pyrethroid insecticides in neuronal membranes as revealed by the *kdr* resistance factor. *Pesticide chemistry: Human welfare and environment*, 3, 103-107.
- Pang, S. C., Chiang, L. P., Tan, C. H., Vythilingam, I., Lam-Phua, S. G., & Ng, L. C. (2015). Low efficacy of deltamethrin-treated net against Singapore *Aedes aegypti* is associated with *kdr*-type resistance. *Tropical Biomedicine*, 32(1), 140-150.
- Papachristos, D. P., & Milonas, P. G. (2008). Adverse effects of soil applied insecticides on the predatory coccinellid *Hippodamia undecimnotata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control*, 47(1), 77-81.
- Pappas, M. L., Broufas, G. D., & Koveos, D. S. (2011). Chrysopid predators and their role in biological control. *Journal of Entomology*, 8(3), 301-326.
- Pathan, A. K., Sayyed, A. H., Aslam, M., Razaq, M., Jilani, G., & Saleem, M. A. (2008). Evidence of field-evolved resistance to organophosphates and pyrethroids in *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Journal of Economic Entomology*, 101(5), 1676-1684.
- Pathan, A. K., Sayyed, A. H., Aslam, M., Liu, T. X., Razaq, M., & Gillani, W. A. (2010). Resistance to pyrethroids and organophosphates increased fitness and predation potential of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Journal of Economic Entomology*, 103(3), 823-834.
- Pessoa, G. C. D., Lopes, J. V., Rocha, M. F., Pinheiro, L. C., Rosa, A. C. L., Michalsky, É. M., & Dias, E. S. (2015). Baseline susceptibility to alpha-cypermethrin in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) from Lapinha Cave (Brazil). *Parasites & vectors*, 8(1), 1-6.
- Pree, D. J., Archibald, D. E., & Morrison, R. K. (1989). Resistance to insecticides in the common green lacewing *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) in southern Ontario. *Journal of Economic Entomology*, 82(1), 29-34.
- Pórfido, O. D., Butler, E., de Titto, E., Issaly, P., & Benítez, R. (2014). Los Plaguicidas en la República Argentina.
- Radcliffe, E. B., Hutchison, W. D., & Cancelado, R. E. (2009). Integrated pest management: concepts, tactics, strategies and case studies. *Cambridge University Press*.
- Reguilón, C., Olazo, E. G., & Campero, S. N. (2006). Morfología de los estados inmaduros de *Chrysoperla argentina* (Neuroptera: Chrysopidae). *Acta Zoológica Lilloana*, 50(1-2), 31-39.
- Ringuelet, R. (2008). La complejidad de un campo social periurbano centrado en la zonas rurales de La Plata. *Mundo agrario*, 9(17) ISSN 1515-5994.
- Rimoldi, F., Schneider, M. I., & Ronco, A. E. (2008). Susceptibility of *Chrysoperla externa* eggs (Neuroptera: Chrysopidae) to conventional and biorational insecticides. *Environmental entomology*, 37(5), 1252-1257.

- Rimoldi, F., Schneider, M. I., & Ronco, A. E. (2012). Short and long-term effects of endosulfan, cypermethrin, spinosad, and methoxyfenozide on adults of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). *Journal of Economic Entomology*, *105*(6), 1982-1987.
- Rinkevich, F. D., Du, Y., & Dong, K. (2013). Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *106*(3), 93-100.
- Rodrigues, A. R., Torres, J. B., Siqueira, H. A., & Lacerda, D. P. (2013). Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance in the predator lady beetle *Eriopis connexa* (Germar)(Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control*, *64*(3), 217-224.
- Rossi, S., Dalpero, A. P., Ghini, S., Colombo, R., Sabatini, A. G., & Girotti, S. (2001). Multiresidual method for the gas chromatographic analysis of pesticides in honeybees cleaned by gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography A*, *905*(1), 223-232.
- Rouaux, J. (2015). Coleopterofauna epigea de importancia agrícola en cultivos de lechuga (*Lactuca sativa* L.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), con diferente manejo sanitario, en el Cinturón Flori-Hortícola Platense (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Naturales y Museo).
- Roversi, P. F., Sabbatini Peverieri, G., Maltese, M., Furlan, P., Strong, W. B., & Caleca, V. (2014). Pre-release risk assessment of the egg-parasitoid *Gryon pennsylvanicum* for classical biological control of *Leptoglossus occidentalis*. *Journal of Applied Entomology*, *138*(1-2), 27-35.
- Rugno, G. R. (2013). Seletividade de inseticidas utilizados na cultura dos citros ao predador *Ceraeochrysa cubana* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae), desenvolvimento em diferentes temperaturas e diversidade de crisopídeos em propriedades com manejo intensivo e convencional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Doctoral dissertation, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz").
- Sabry, K. H., & El-Sayed, A. A. (2011). Biosafety of a biopesticide and some pesticides used on cotton crop against green lacewing, *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). *Journal of Biopesticides*, *4*, 214-218.
- Salamanca Bastidas, J., Varón Devia, E. H., & Santos Amaya, O. (2010). Cría y evaluación de la capacidad de depredación de *Chrysoperla externa* sobre *Neohydatothrips signifer*, trips plaga del cultivo de maracuyá. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, *11*, 31-40.
- Sayed, A. H., Pathan, A. K., & Faheem, U. (2010). Cross-resistance, genetics and stability of resistance to deltamethrin in a population of *Chrysoperla carnea* from Multan, Pakistan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *98*(3), 325-332.
- Scheiner, S. (1998). *Design and analysis of ecological experiments*. CRC Press.

- 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(10), 1451-1455.
- SENASA PERÚ. 2015. <http://www.senasa.gob.pe/senasa/especies-beneficas-producidas-por-laboratorios-en-convenio>
- Sfara, V., Zerba, E. N., & Alzogaray, R. A. (2006). Toxicity of pyrethroids and repellency of diethyltoluamide in two deltamethrin-resistant colonies of *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(1), 89-94.
- Shinde, C. U., Patel, M. B., & Mehendale, S. K. (2009). Relative toxicity of different insecticides to the larvae of *Chrysoperla carnea* (Stephens) under laboratory conditions. *Pest Management In Horticultural Ecosystems*, 15(2), 161-164.
- Silva, R. A., Carvalho, G. A., Carvalho, C. F., Reis, P. R., Souza, B., & Pereira, A. M. A. R. (2006). Action of pesticides used in coffee crops on the pupae and adults of *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861)(Neuroptera: Chrysopidae). *Ciência Rural*, 36(1), 8-14.
- Simberloff, D. (2012). Risks of biological control for conservation purposes. *BioControl*, 57(2), 263-276.
- Smith, E. H., Kennedy, G. G., & Pimentel, D. (2002). History of pesticides. *Encyclopedia of Pest Management*, 376-372.
- Soderlund, D. M. (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of Toxicology*, 86(2), 165-181.
- Soderlund, D. M. (2015). Resmethrin, the first modern pyrethroid insecticide. *Pest Management Science*, 71(6), 801-807.
- Soto, J., & Iannacone, J. (2008). Efecto de dietas artificiales en la biología de adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). *Acta Zoológica Mexicana (ns)*, 24(2), 1-22.
- Stark, J. D., & Banks, J. E. (2003). Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annual Review of Entomology*, 48(1), 505-519.
- Stenersen, J. (2004). Chemical pesticides mode of action and toxicology. *CRC press*.
- Sullivan, J. J., & Goh, K. S. (2008). Environmental fate and properties of pyriproxyfen. *Journal of Pesticide Science*, 33(4), 339-350.
- Tabashnik, B.E. & Johnson, M.W., 1999. Evolution of pesticide resistance in natural enemies. In: Bellows, T.S., Fisher, T.W. (Eds.), Handbook of Biological Control. *Academic Press, New York*, pp. 673–698.

- Tauber, C. A., & Tauber, M. J. (1973). Diversification and secondary intergradation of two *Chrysopa carnea* strains (Neuroptera: Chrysopidae). *The Canadian Entomologist*, 105(09), 1153-1167.
- Tauber, M. J., Tauber, C. A., Daane, K. M., & Hagen, K. S. (2000). Commercialization of predators: recent lessons from green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae: Chrysoperla). *American Entomologist*, 46(1), 26-38.
- Thompson, W. T. (1992). A worldwide guide to beneficial animals used for pest control purposes.
- Tillman, P. G., & Mullinix, B. G. (2004). Comparison of susceptibility of pest *Euschistus servus* and predator *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae) to selected insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 97(3), 800-806.
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*, 45, 247-268.
- Urbaneja, A., Llácer, E., Tomás, Ó., Garrido, A., & Jacas, J. A. (1999). Effect of temperature on development and survival of *Cirrospilus* sp. near *lyncus* (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoid of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *Environmental Entomology*, 28(2), 339-344.
- Van de Veire, M., & Tirry, L. (2003). Side effects of pesticides on four species of beneficials used in IPM in glasshouse vegetable crops:" worst case" laboratory tests. *IOBC WPRS Bulletin*, 26(5), 41-50.
- Van Driesche, R., Hoddle, M., & Center, T. D. (2007). Control de plagas y malezas por enemigas naturales. *US Department of Agriculture, US Forest Service, Forest Health Technology Enterprise Team*.
- van Lenteren, J. C. (2000). Success in biological control of arthropods by augmentation of natural enemies. In *Biological control: measures of success*(pp. 77-103). Springer Netherlands.
- van Lenteren, J. C. (2012). The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl*, 57(1), 1-20.
- van Lenteren, J. C., Babendreier, D., Bigler, F., Burgio, G., Hokkanen, H. M. T., Kuske, S., ... & Tommasini, M. G. (2003). Environmental risk assessment of exotic natural enemies used in inundative biological control. *BioControl*, 48(1), 3-38.
- Vargas, C. A. (1988). Estudio sobre técnicas y equipos para la producción masiva del depredador *Chrysoperla carnea* (Stephens)(Neuroptera: Chrysopidae). *Revista Palmas*, 9(2), 35-41.
- Vega, F. E., & Kaya, H. K. (2012). *Insect pathology*. Academic Press.

- Villaamil Lepori, E. C., Mitre, G. B., & Nassetta, M. (2013). Situación actual de la contaminación por plaguicidas en Argentina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 25-43.
- Vivek, S. H. A. H., Bishwajeet, P., Pirasanna, P., & Shankarganesh, K. (2012). Relative toxicity of insecticides on larval stages of green lacewing, *Chrysoperla* sp.(Carnea-group)(Chrysopidae: neuroptera). *Indian Journal of Entomology*, 74(4), 394-397.
- Vogt, H., Gonzalez, M., Adán, A., Smagghe, G., & Viñuela, E. (1998). Efectos secundarios de la azadiractina, vía contacto residual, en larvas jóvenes del depredador *Chrysoperla carnea* (Stephens)(Neuroptera, Chrysopidae). *Boletín De Sanidad Vegetal. Plagas*, 24(1), 67-78.
- Vogt, H., Bigler, F., Brown, K., Candolfi, M. P., Kemmeter, F., Kühner, C., ... & Schmuck, R. (2000). Laboratory method to test effects of plant protection products on larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Guidelines to evaluate side-effects of plant protection products to non-target arthropods*, 27-44.
- Wakeling, E. N., Neal, A. P., & Atchison, W. D. (2012). Pyrethroids and their effects on ion channels. *INTECH Open Access Publisher*.
- Walorczyk, S., & Gnusowski, B. (2009). Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction and gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(37), 6522-6531.
- Welch, K. D., & Harwood, J. D. (2014). Temporal dynamics of natural enemy–pest interactions in a changing environment. *Biological Control*, 75, 18-27.
- Whalon, M. E., Mota-Sanchez, D., & Hollingworth, R. M. (Eds.). (2008). *Global pesticide resistance in arthropods*. CABI.
- Wilson, T. G. (2001). Resistance of *Drosophila* to Toxins. *Annual Review of Entomology*, 46(1), 545-571.
- Wondafraash, M., Getu, E., & Terefe, G. (2012). Life-cycle parameters of African bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) affected by neem, *Azadirachta indica* (A. Juss) extracts. *Agricultural Science Research Journal*, 2, 335-345.
- Wong, S. K., & Frank, S. D. (2013). Pollen increases fitness and abundance of *Orius insidiosus* Say (Heteroptera: Anthocoridae) on banker plants. *Biological Control*, 64(1), 45-50.
- Wratten, S. & G. Gurr (eds), 2000. *Measures of Success in Biological Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 448 pp.
- Xi, J., Pan, Y., Bi, R., Gao, X., Chen, X., Peng, T., ... & Shang, Q. (2015). Elevated expression of esterase and cytochrome P450 are related with lambda–cyhalothrin resistance and lead to cross resistance in *Aphis glycines* Matsumura. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 118, 77-81.

- Youn, Y. N., Seo, M. J., Shin, J. G., Jang, C., & Yu, Y. M. (2003). Toxicity of greenhouse pesticides to multicolored Asian lady beetles, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control*, 28(2), 164-170.
- Zhang, J., Lu, A., Kong, L., Zhang, Q., & Ling, E. (2014). Functional analysis of insect molting fluid proteins on the protection and regulation of ecdysis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(52), 35891-35906.
- Zhong, D., Chang, X., Zhou, G., He, Z., Fu, F., Yan, Z., ... & Yan, G. (2013). Relationship between knockdown resistance, metabolic detoxification and organismal resistance to pyrethroids in *Anopheles sinensis*. *PLoS One*, 8(2), 55475.