



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Mejora del control biológico por conservación de las plagas que afectan a cultivos hortofrutícolas

Carmen Denis López



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

Tesis Doctoral

Mejora del control biológico por conservación
de las plagas que afectan a cultivos
hortofrutícolas

Carmen Denis López



Barcelona, 2021



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Mejora del control biológico por conservación de las
plagas que afectan a cultivos hortofrutícolas**

Carmen Denis López

Barcelona, 2021



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Biologia

**Doctorado en Ecología,
Ciencias Ambientales y Fisiología
Vegetal**

Mejora del control biológico por conservación de las plagas que afectan a cultivos hortofrutícolas.

Memoria presentada por **Carmen Denis López** para optar al grado de doctora por la
Universitat de Barcelona

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries

Carmen Denis López

Directores de tesis

Dr. Jordi Riudavets Muñoz y Dra. Judit Arnó Pujol

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries

Tutora

Dra. Marina Blas Esteban

Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Barcelona, 2021

The more I study science, the more I believe in God.

Albert Einstein

A mi madre, hermanos y sobrinos

Agradecimientos

Cuando decidí realizar un doctorado jamás habría imaginado la travesía que me tocaría vivir. Un sueño siempre anhelado, un camino distinto, con muchos tropiezos, pero con grandes satisfacciones personales. Resumiendo, un proceso donde aprendí que todos somos merecedores de oportunidades y sólo con ellas alcanzamos a explotar nuestras capacidades y hasta incluso descubrirlas. Este doctorado, que además de ser un gran desafío personal, me ha enseñado que cada persona esconde un don único y que la integración de esos dones siempre dará resultados maravillosos.

Detrás de la realización de este trabajo doctoral hay muchas personas a quienes deseo brindar el más sincero y profundo agradecimiento.

A mis directores de tesis, Jordi Riudavets y Judit Arnó por la oportunidad de trabajar con ustedes, por la inmensa paciencia, apoyo, comprensión y guía que me han ofrecido durante el desarrollo de la tesis. ¡Muchas gracias!

Muchas gracias, Jordi, porque sin conocerme me diste la oportunidad de trabajar en tu equipo, me has motivado en situaciones complicadas y me enseñaste con mucha paciencia técnicas de trabajo que desconocía completamente. Muchas gracias por todas las oportunidades que me has brindado para crecer profesionalmente y avanzar en el desarrollo de la tesis.

Gracias Judit por enseñarme tus metodologías de trabajo y por compartir conmigo tus experiencias, por dedicarme tu valioso tiempo. Escribir una tesis en plena cuarentena no podría haber sido posible sin tu gran ayuda. ¡Muchas gracias!

A Rosa Gabarra, muchas gracias ¡trabajar contigo ha sido un verdadero privilegio!

A la Universidad de Barcelona, por la plaza que me han brindado y que permitió el acceso al programa de doctorado.

A la Agencia Estatal de Investigación del Gobierno de España, que a través del financiamiento de los proyectos AGL2016-77373-C2-1-R y PID2019-107030RB-C21 han permitido el desarrollo de los ensayos contenidos en esta tesis.

Al Programa Nacional de Becas de Postgrado en el Exterior (Becal-Py), Becas Don Carlos Antonio López que a través del programa para el Fortalecimiento de la Investigación, Innovación y la Educación me ha beneficiado con la beca para realizar la tesis de doctorado en España.

Al Instituto de Recerca i Tecnologia Agroalimentaria (IRTA) de Cabrils, por permitirme desarrollar la tesis aprovechando sus recursos e instalaciones.

A los agricultores propietarios de fincas comerciales de tomate en Cataluña y el Maresme, gracias por ceder sus parcelas y permitirme realizar los experimentos de campo y por compartir sus datos de campo muy útiles para incorporar en las evaluaciones realizadas durante el desarrollo de la tesis.

A los técnicos de las Asociación de Defensa Vegetal y Agrícola Maresme Segle XXI (Grup Ametller). ¡Muchas gracias!

Al Dr. Ramón Albajes, de la Universitat de Lleida, un gran referente en mi carrera profesional. Me ayudaste tanto sin conocerme... ¡Muchas gracias!

A la Dra. María Isabel Muñoz Gracia, de la Faculta de Biología de la Universidad de Barcelona, estoy eternamente agradecida por toda la ayuda que me brindaste. ¡Muchas Gracias!

A Carmen López Alonso, de la Universitat de Lleida. No dejo de agradecer todo el aprecio y el cariño con el que me has brindado toda tu ayuda. ¡Muchas gracias!

A mis compañeros del laboratorio de Entomología del IRTA de Cabrils, por brindarme la ayuda, el cariño y una amistad tan desinteresada del cual me siento parte. Gracias Víctor,

Pili, Silvia, Marisa, Mari Carmen, Lorena, Yonathan y Lidia. No se olvidan esos momentos tan bonitos que compartí con ustedes.

A Iván Batuecas, muchas gracias por haberme ayudado a instalarme en Barcelona, desde el día en el que llegué al centro, siempre estuviste pronto para ayudarme en todo lo que estuvo a tu alcance. No olvido todo lo que me has facilitado, gracias por tu bondad Iván.

A mis compañeros becarios, por compartir ese café que sube los ánimos, genera risas y transmitieron siempre buenas vibras. Gracias Rey, Yahana, Mar, Gema, Erick y Rubén. ¡He aprendido tanto de cada uno de ustedes!

A mis compañeros pasantes de la India y México (Gokul y Jenifer), en una temporada muy dura de trabajo han colaborado conmigo en los muestreos de campo. ¡Muchas gracias!

A Laura Pequeño, gracias por ayudarme a trasladarme a todos los campos de muestreo y por tu gran ayuda.

A la Dra. Alessandra Carvalho de la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA). Obrigada por cuidar tanto de mim durante minha estada no Brasil. Obrigada por compartilhar sua família e amigos comigo. Sempre me senti em casa tendo seu carinho e companhia. ¡Obrigada!

A los profesionales investigadores del laboratorio de Agroecología de la EMBRAPA, Carolina Araujo, Marcelo Ricalde y Adamastor Pereira. Obrigada pelo apreço, fiquei muito feliz em compartilhar minha estadia com vocês.

Ao Dr. Valmir Costa do Instituto Biológico de Campinas, São Paulo. Seu treinamento em identificação de parasitóides me levou a descobrir uma paixão pela taxonomia de himenópteros. Obrigada por me ensinar tanto, por compartilhar comigo suas técnicas e seus conhecimentos, por todas as horas que você tem dedicado a me ensinar a classificar a “mis bichos”.

Al Dr. Oscar Alomar, gracias por tus aportes para esta tesis.

A los amigos que la vida me regaló y que siempre han estado conmigo acompañando de cerca todos mis logros. Andrea Arriola, Silvia Soglia, Griselda Vera, Juana Moreno y José Abadía. ¡Muchas gracias!

A la familia que Europa me regalo, muchas gracias porque siempre han estado en los buenos y malos momentos. Lejos de casa, el cariño de quienes están cerca hace muchísimo. Gracias Familia Blaires-Ibarra, Silvero-García, Espínola-Cogliolo, Eduardo Paz.

A mis abuelos, Marcelino y Silvia, sé que desde arriba me acompañan y bendicen siempre.

A mi pitu, todo lo que he logrado en la vida fue inspirado en vos, gracias por llenar de alegría y de momentos tan bonitos mi vida. ¡Muchas gracias, Lucía!

A mamá, mi pilar más importante.

A mis hermanos, Silvia, Marco, Estela, Alba, Beatriz y Gabriela, gracias por caminar a mi lado durante estos años y porque siempre me han alentado a seguir adelante cuando parecía todo tan difícil.

A mis sobrinos amados, Camila, Candela, Isabel, Juan Pablo, Milagros, Jazmín, Marcos, Lucas, Sofía, Lara y Lucía (No olvido cada una de sus alentadoras palabras).

A Armando, mi compañero de vida. Gracias por enseñarme que quien te ama no te hace renunciar a tus sueños.

A todos los que de alguna manera han contribuido al desarrollo de esta tesis.

¡Muchas gracias!

Resumen

Esta tesis se ha enfocado en evaluar el potencial de mejora del control biológico por conservación en huertos frutales y hortícolas en Cataluña, mediante la integración de infraestructuras ecológicas que promuevan y favorezcan a los enemigos naturales asociados al control biológico de las plagas que afectan a estos cultivos.

Durante el desarrollo del **primer capítulo** de esta tesis en los huertos frutales, se encontró que las flores que crecen espontáneamente en los márgenes de los campos de melocotonero y manzano albergan grupos de enemigos naturales de pulgones y trips, que son plagas importantes de los árboles frutales. Los parasitoides más abundantes corresponden a la subfamilia Aphidiinae y entre los depredadores destacan los pertenecientes a las familias Coccinellidae y Chrysopidae. Todos estos enemigos naturales están relacionados con el control biológico de pulgones. La presencia de otros enemigos naturales relacionados con el control biológico de trips, como los Aeolothripidae y Anthocoridae, también se destaca en este trabajo y la mayoría de ellos fueron reportados sobre especies de plantas espontáneas de crecimiento precoz y floración prolongada. El estudio de la arquitectura floral ha permitido demostrar que los enemigos naturales asociados al control biológico de pulgones y trips son capaces de acceder al néctar de las flores y que no existiría un impedimento para alcanzar este alimento de su interior. De esta manera, la evaluación de las flores en los márgenes de huertos frutales ha permitido seleccionar las especies herbáceas silvestres adecuadas para utilizar como infraestructuras ecológicas en los márgenes de huertos frutales y que contribuirían al control biológico por conservación de las plagas que afectan a melocotón y manzano, entre ellas *Eruca vesicaria* (L.) Cav. (Brassicaceae), *Cardaria draba* (L.) Desv. (Brassicaceae), *Euphorbia serrata* (L.) S.G. Gmel. (Euphorbiaceae), *Malva*

sylvestris L. (Malvaceae), *Anacyclus clavatus* (Desf.) Pers. (Asteraceae) y *Diplotaxis erucoides* (L.) DC (Brassicaceae).

En el **segundo capítulo**, cuando se estudió en el laboratorio el efecto de las flores de *Lobularia maritima* (L.) Dev. (Brassicaceae) sobre los enemigos naturales más utilizados para el control biológico de *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae), se esperaba que la presencia de la flor produjera un aumento en el control que el depredador *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Hemiptera: Miridae) y el parasitoide *Necremnus tutae* Ribes & Bernardo (Hymenoptera: Eulophidae) ejercen sobre las larvas de *T. absoluta*. Sin embargo, esta hipótesis no se comprobó, la presencia de *L. maritima* no afectó a la actividad depredadora sobre larvas L1 de la plaga tal y como había sido reportado en otros trabajos. En el caso del parasitoide, ni el número de larvas parasitadas ni la mortalidad adicional sobre el huésped (*host-killing/host-feeding*) se incrementó al proporcionarle flores. Aunque el néctar de *L. maritima* no intervino en una mayor parasitación de larvas, la presencia de las flores en jaulas pequeñas, sí que benefició al parasitoide cuando el experimento se realizó en jaulas mayores. Las hembras sobrevivieron más tiempo y la alimentación basada en el néctar de las flores también aumentó la carga de oocitos (y por lo tanto su potencial reproductivo). Por consiguiente, la presencia de flores de *L. maritima* en los campos de tomate permitiría al parasitoide sobrevivir más tiempo y favorecer un aumento en sus poblaciones a largo plazo, contribuyendo a su conservación en el campo. Teniendo en cuenta el beneficio que aporta la incorporación de *L. maritima* en la sobrevivencia y fecundidad del parasitoide nativo *N. tutae*, en el **tercer capítulo** de la tesis se planteó evaluar el impacto del margen floral en la abundancia de los principales enemigos naturales asociados al control biológico de *T. absoluta* en un campo de tomate al aire libre. Los resultados de este trabajo indican que el ataque de *T. absoluta* fue menor en los campos con margen de *L. marítima* que en los campos que carecían del margen.

Sin embargo, la presencia de los parasitoides de larvas de este lepidóptero fue similar en los campos con y sin margen. Sin embargo, sí que se ha cuantificado una mayor abundancia de parasitoides de huevos de la familia Trichogrammatidae en las trampas colocadas en los campos con margen de *L. maritima*, lo que indicaría que las poblaciones de *T. absoluta* estarían afectadas por la presencia de los *Trichogramma* en el campo. Estos parasitoides fueron los más abundantes registrados durante este estudio por lo que se podría suponer que se encuentran completamente establecidos en el campo. El número de depredadores capturados de los campos con margen de *L. maritima* y sin margen no varió. Las familias de estos enemigos naturales reportados son importantes para el control biológico de otras plagas asociadas al cultivo de tomate y, aunque las flores de *L. maritima* posiblemente no tengan un efecto importante sobre las poblaciones de los míridos depredadores, en esta tesis se ofrece información relevante sobre el beneficio que aportaría la incorporación de flores de *L. maritima* a los campos de tomate donde ya se incorpora un margen de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). La primera especie floral mencionada beneficia a los parasitoides y la segunda es muy atractiva para los míridos depredadores. Teniendo en cuenta estos resultados, esta tesis sugiere la incorporación de una siembra mixta de flores de *L. maritima* y *C. officinalis* para mejorar el control biológico por conservación de las principales plagas que afectan al cultivo de tomate.

La evaluación del parasitismo sobre larvas de *T. absoluta* en los distintos campos comerciales de tomate ha permitido reportar diversos géneros de parasitoides que intervienen en el control biológico de *T. absoluta* y entre ellos el género *Necremnus* destaca por ser el más abundante. La evaluación y seguimiento de los enemigos naturales sobre un cultivo es muy importante y no debe ser abandonada puesto que el agroecosistema es cambiante y otros grupos de parasitoides y depredadores de interés podrían tener un papel clave pero desconocido sobre las poblaciones de plagas. Por

ejemplo, durante el desarrollo del tercer capítulo de la tesis en los campos de Cataluña se encontraron parasitoides de origen neotropical asociados a *T. absoluta*. Se reporta en el **cuarto capítulo**, por primera vez en Europa la presencia de *Dolichogenidea gelechiidivoris* Marsh (Hymenoptera: Braconidae) que posiblemente lleva años establecido en España y cuya presencia se desconocía. Este parasitoide es muy utilizado para el control biológico de *T. absoluta* en países de donde es originaria e incluso se ha importado en África para promover el control biológico de *T. absoluta* en ese continente. En las condiciones locales, la actividad conjunta de *N. tutae* y *D. gelechiidivoris* en huertos de tomate, podrían contribuir al desarrollo de un exitoso programa de control biológico de *T. absoluta*, pero en este momento no se conoce cuál es el resultado de esta interacción ni en el laboratorio ni en condiciones de campo.

En conclusión, esta tesis proporciona herramientas importantes para promocionar la mejora del control biológico por conservación en huertos frutales y hortícolas, y demuestra que la incorporación de infraestructuras ecológicas es útil para la conservación de la biodiversidad local en los ecosistemas agrícolas de España. Además, el reporte de un nuevo actor (*D. gelechiidivoris*) en la contribución del parasitismo de *T. absoluta*, abre las puertas a otros trabajos de investigación orientados a potenciar el control biológico por conservación.

Abstract

This thesis has focused on evaluating the potential to improve conservation biological control in fruit and vegetable orchards in Catalonia, by integrating ecological infrastructures that promote and favour natural enemies associated with the biological control of pests that affect these crops.

During the development of the **first chapter**, it was found that the flowers that grow spontaneously on the margins of peach and apple fields harbour several groups of natural enemies of aphids and thrips, which are important pests of fruit trees. The most abundant parasitoids belong to the Aphidiinae subfamily, and among the predators, those belonging to the Coccinellidae and Chrysopidae families are the prevalent ones. All these natural enemies are related to the biological control of aphids. The presence of other natural enemies associated with the biological control of thrips, such as Aeolothripidae and Anthocoridae, is also highlighted in this work and reported most of them on spontaneous plant species with early growth and prolonged flowering. The study of floral architecture has demonstrated that natural enemies associated with the biological control of aphids and thrips can access the nectar of flowers and, therefore, it is not a constraint for reaching this food. Thus, the evaluation of flowers presents on the margins of the fruit orchards made possible to select wild herbaceous species to be used in ecological infrastructures to enhance conservation biological control of pests that affect peaches and the apple trees, among them *Eruca vesicaria* (L.) Cav. (Brassicaceae), *Cardaria draba* (L.) Dev. (Brassicaceae), *Euphorbia serrata* (L.) S.G. Gmel. (Euphorbiaceae), *Malva sylvestris* L. (Malvaceae), *Anacyclus clavatus* (Desf.) Pers. (Asteraceae) and *Diplotaxis eruroides* (L.) DC (Brassicaceae).

In the **second chapter**, the effect of *Lobularia maritima* (L.) Dev. (Brassicaceae) flowers on the natural enemies used for the biological control of *Tuta absoluta* Meyrick

(Lepidoptera: Gelechiidae) was studied in the laboratory. It was expected that the presence of the flowers increases the control that the predator *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) (Hemiptera: Miridae) and the parasitoid *Necremnus tutae* Ribes & Bernardo (Hymenoptera: Eulophidae) exert on *T. absoluta* larvae. However, this hypothesis was not confirmed. The presence of *L. maritima* did not affect the predatory activity on L1 larvae of the pest, as had been reported in other works. In the case of the parasitoid, neither the number of parasitized larvae nor the additional mortality on the host (host-killing/host-feeding) increased with flower provision.

Although the nectar of *L. maritima* did not produce a higher parasitism when the experiment was carried out in small cages, the presence of flowers did benefit the parasitoid when the experiment was conducted in larger cages. Females of *N. tutae* survived longer and feeding based on flower nectar also increased oocyte load, and therefore reproductive potential. Consequently, the presence of *L. maritima* flowers in tomato fields would allow a longer survival of the parasitoid and favor a long-term increase in its populations, contributing to its conservation in the field.

Considering the benefit provided by the incorporation of *L. maritima* in the survival and fecundity of the native parasitoid *N. tutae*, the **third chapter** of the thesis aimed to evaluate the impact of the floral margin on the abundance of main natural enemies associated with the biological control of *T. absoluta* in open-air tomato fields. The results of this work indicate that the level of *T. absoluta* attack was lower in the fields with a margin of *L. maritima* than in the fields with no margin.

The presence of the larval parasitoids of this lepidopteran was similar in the fields with and without margin. However, a greater abundance of egg parasitoids belonging to the Trichogrammatidae family was recorded in traps placed in fields with a margin of *L. maritima*, which indicate that populations of *T. absoluta* would be affected by the

presence of *Trichogramma* in the field. These parasitoids were the most abundant recorded during the study, so it could be assumed that they are completely established in the field. The number of predators captured in the fields with a margin of *L. maritima* and without margin did not vary. The families of the reported natural enemies are important for the biological control of other pests associated with tomato cultivation. Although the flowers of *L. maritima* may not significantly influence the populations of predatory mirids, this thesis provides relevant information on the benefit of incorporating *L. maritima* flowers to tomato fields with margins of *Calendula officinalis* L. (Asteraceae), which is very attractive to predatory mirids. With these results, this thesis suggests incorporating a mixed planting of *L. maritima* and *C. officinalis* flowers to improve the conservation biological control of the main pests of tomato crops.

The evaluation of parasitism on *T. absoluta* larvae in the different commercial tomato fields has made possible to report various genera of parasitoids that may contribute to the biological control of *T. absoluta*. Among them, the *Necremnus* genus was the most abundant. The evaluation and monitoring of natural enemies on a crop are important. They should not be abandoned since the agroecosystem is changing, and other groups of parasitoids and predators of interest could have a key but unknown role on pest populations. For example, during the development of the third chapter of the thesis in Catalonia, parasitoids of neotropical origin were found associated with *T. absoluta*. *Dolichogenidea gelechiidivoris* Marsh (Hymenoptera: Braconidae) is reported for the first time in Europe in the **fourth chapter**. This parasitoid has possibly been established in Spain for years, and its existence was unknown. *Dolichogenidea gelechiidivoris* is widely used for the biological control of *T. absoluta* in the countries where it originates from, and it has even been imported into Africa to promote the biological control of *T. absoluta* in that continent. Under local conditions, the joint activity of *N. tutae* and *D.*

gelechiidivoris in tomato orchards could contribute to develop a successful program of biological control of *T. absoluta*. Still, at this time, it is not known what the result of this interaction is neither in the laboratory nor in field conditions.

In conclusion, this thesis provides important tools to promote the improvement of conservation biological control in fruit and horticultural orchards and shows that the incorporation of ecological infrastructures is helpful to the preservation of local biodiversity in agricultural ecosystems in Spain. In addition, the report of a new actor (*D. gelechiidivoris*) in the contribution of the parasitism of *T. absoluta* opens the doors to other research works aimed at enhancing biological control by conservation.

Contenido

1. Introducción General	3
2. Objetivos	11
3. Capítulo 1 Selection of insectary plants for the conservation of biological control agents of aphids and thrips in fruit orchards	13
3.1 Introduction	15
3.2 Materials and methods	18
3.3 Results	21
3.4 Discussion	33
4. Capítulo 2 Effect of <i>Lobularia maritima</i> on the natural enemies of <i>Tuta absoluta</i> , <i>Macrolophus pygmaeus</i> and <i>Necremnus tuta</i>	41
4.1 Introduction	43
4.2 Materials and methods	45
4.3 Results	48
4.4 Discussion	52
5. Capítulo 3 ¿El margen floral de <i>Lobularia maritima</i> favorece la abundancia de los enemigos naturales de <i>Tuta absoluta</i> en el cultivo de tomate?	57
5.1 Introducción	59
5.2 Materiales y métodos	62
5.3 Resultados	68
5.4 Discusión	74
6. Capítulo 4 Naturalized <i>Dolichogenidea gelechiidivoris</i> Marsh (Hymenoptera: Braconidae) complement the resident parasitoid complex of <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera:Gelechiidae) in Spain	81
6.1 Introduction	83
6.2 Materials and methods	84
6.3 Results	87
6.4 Discussion	89
7. Discusión General	97
8. Conclusiones	105
9. Referencias bibliográficas	111

1. Introducción General

España es el principal productor de frutas de hueso y pepitas (EUROSTAT, 2019) en la Unión Europea, y la producción de melocotones y nectarinas (*Prunus persica* L. Batsch) y manzanas (*Malus domestica* Borkh) se concentra en la región Nordeste del país (MAPA, 2020). Así mismo, este país se constituye en el principal productor de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) dentro de la Comunidad Europea y la mayor producción se concentra en la región Sur del país (MAPA, 2020). Sin embargo, la producción de frutas y hortalizas son afectadas por importantes plagas que reducen su rendimiento. *Myzus persicae* Sulzer y *Hyalopterus* spp. en melocotón y *Eriosoma lanigerum* Hausmann y *Dysaphis plantaginea* Passerini (Hemiptera: Aphididae) en manzana, son los pulgones más comunes que atacan árboles frutales de hueso y pepita (Barbagallo et al., 2017). *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) es la principal especie de trips de nectarina en España y otros países mediterráneos, donde causa daños por alimentación a flores y frutos maduros (Teulon et al., 2018). Entre los lepidópteros, *Cydia Pomonella* (L.) y *Grapholita molesta* Busck (Lepidoptera: Tortricidae), cuyas larvas producen importantes daños en brotes y frutos (Depalo et al., 2016). En el cultivo de tomate, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) es actualmente considerada una de las plagas más importantes. Ataca las hojas, flores, tallos y especialmente los frutos en cualquier etapa de desarrollo (Urbaneja et al., 2009; Urbaneja et al., 2012; Arnó et al., 2018a). Así mismo, otros lepidópteros como *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) y otras orugas nocturnas del género *Spodoptera* spp., y *Helicoverpa* spp., así como del ácaro *Aculops lycopersici* Masee (Eryiophidae) pueden comprometer directamente a la producción por los daños que causan a las hojas, flores y a los frutos (Castañé et al., 2020).

En la actualidad, los tratamientos químicos son la estrategia mayoritaria para el control de las plagas. Sin embargo, el uso de productos químicos se ve afectado por los requerimientos de producir frutos libres de residuos plaguicidas y con un menor impacto sobre el medio ambiente. Además, la disminución del número de sustancias activas autorizadas como fitosanitarios comporta un uso repetitivo de las mismas y la aparición de resistencias de muchos insectos a estas sustancias activas (Dassonville et al., 2013).

En este sentido el Reglamento Europeo de Plaguicidas (EC) No. 1107/2009, desarrollado con el objetivo de no aprobar compuestos con riesgos inaceptables para la salud humana/animal y el medio ambiente (Villaverde et al., 2013), desempeña un papel clave en las políticas de aplicaciones pesticidas en la comunidad europea, pues como consecuencia de este reglamento se ha prohibido la utilización de muchos pesticidas de alta toxicidad utilizados para el control de plagas disponibles en el mercado. Actualmente, Europa es el segundo continente con mayor producción de alimentos orgánicos (Willer y Lernoud, 2019).

En la Unión Europea (UE), la Directiva 2009/128/CE se ha establecido con la finalidad de alcanzar un uso sostenible de plaguicidas, reduciendo los riesgos e impactos del uso de plaguicidas en la salud humana y el medio ambiente y promoviendo el uso del Manejo Integrado de Plagas (MIP) y otras técnicas alternativas que disminuyan el uso de plaguicidas químicos (European Commission, 2021). El MIP es un sistema de manejo de plagas que, en el contexto del entorno asociado y la dinámica poblacional de las especies de plagas, utiliza todas las técnicas y métodos de control adecuados de la manera más compatible posible para mantener la población de las plagas a niveles por debajo de los que causan daño económico FAO (1975).

Hoy, en los huertos españoles, se ha demostrado que el control biológico de estas plagas es posible, debido a la riqueza de enemigos naturales presentes en las infraestructuras

ecológicas adyacentes o sembradas en los campos agrícolas (Arnó et al., 2018b; Rodríguez-Gasol et al., 2019; Aparicio et al., 2021; Arnó et al., 2021).

El Control Biológico (CB) implica el uso de organismos vivos para suprimir la densidad de población o el impacto de un organismo de plaga específico, haciéndolo menos abundante o dañino (Eilenberg et al., 2001). Actualmente el CB, se aplica sobre un número creciente de cultivos y ecosistemas gestionados como el método principal de control de plagas Cook (1988). En este sentido, el papel de la agroecología es esencial, pues se prioriza el uso de recursos locales para el mantenimiento de la biodiversidad y, además, busca satisfacer las necesidades de los agricultores y las condiciones naturales para transformar la forma en que producimos los alimentos FAO (2020). El éxito de la conservación de la biodiversidad también depende de las interacciones exitosas entre la ciencia y la formulación de políticas Moonen y Bárberi (2008).

El control biológico por conservación (CBC) consiste en modificar el medio ambiente o las prácticas existentes en él, con la finalidad de proteger y mejorar la presencia y abundancia de los enemigos naturales específicos u otros organismos para reducir el efecto de plagas (Eilenberg et al., 2001). El control biológico por conservación es importante como estrategia para controlar las plagas que afectan a diversos cultivos, especialmente los hortofrutícolas cuyos productos se consumen mayoritariamente en fresco. Este sistema de gestión de plagas es, además, una estrategia para apoyar y mantener la población de parasitoides y depredadores nativos en los huertos (Rodríguez-Gasol et al., 2019; Denis et al., 2021) y proporciona presas y huéspedes, recursos y refugios alternativos durante el invierno (Corbett y Rosenheim, 1996; Alignier et al., 2014). Un aumento en la diversidad de plantas y el manejo del hábitat de los enemigos naturales puede reducir las poblaciones de las plagas y, por lo tanto, el uso de insecticidas

(Hatt et al., 2017). La evidencia del éxito de la aplicación del control biológico por conservación en los huertos de España se refleja en los trabajos de Arnó et al. (2018b).

Una de las medidas más adoptadas para potenciar la presencia de enemigos naturales cerca de los cultivos es el aumento de la biodiversidad vegetal en franjas de flores, cubiertas de suelo, márgenes en bordes de campos, entre otras. El objetivo de promover la siembra y conservación de los márgenes florales próximos a los cultivos es proporcionar recursos vegetales que son elementos clave para la supervivencia y/o reproducción de depredadores y parasitoides, como refugios, huéspedes y presas alternativos, y alimentos de origen vegetal, como néctar y polen (Gurr et al., 2004; Wäckers, 2005; Araj et al., 2008; Heimpel y Jervis 2005) y atraer a diversos enemigos naturales presentes en el área (Rodríguez-Gasol et al., 2019; Denis et al., 2021). El néctar floral es una de las principales recompensas no solo para los polinizadores sino también para los enemigos naturales de importantes plagas que visitan las flores Koptur (2005). El néctar floral favorece la longevidad y fecundidad de parasitoides y depredadores (Baggen et al., 1999; Araj et al., 2008; Wäckers, 2005; Arnó et al., 2018a). Sin embargo, la selección de plantas nativas en el manejo del hábitat para proporcionar alimento a los enemigos naturales se ve obstaculizado por una falta general de conocimiento sobre la biología de estas plantas, incluidos sus efectos sobre parasitoides, depredadores y plagas (Pandey et al., 2018).

Esta tesis se centra en el efecto del control biológico por conservación en los diferentes sistemas agrícolas (melocotonero, manzano y tomate). En márgenes de huertos de manzana, Fitzgerald y Solomon (2004) encontraron que la presencia de flores incrementó la densidad de antocóridos y contribuyó al control de *Cacopsylla pyri* L. (Hemiptera: Psyllidae). Gontijo et al. (2013) demostraron la eficacia de *Lobularia maritima* L. (Brassicaceae) para aumentar las poblaciones de depredadores generalistas y reducir los

ataques de *D. plantaginea*. Cahenzli et al. (2019) demostraron el efecto positivo de las franjas de flores perennes sembradas con especies seleccionadas de dicotiledóneas y gramíneas en comparación con la vegetación espontánea en el control de pulgones en manzanos, en experimentos de campo realizados en países europeos. Rodríguez-Gasol et al. (2019) encontraron que la implementación de un margen en el borde de huertos de manzanos atrae a importantes depredadores (Syrphidae, Thysanoptera, Araneae, Heteroptera, Coleoptera) y la presencia de parasitoides en los alrededores de los huertos incrementó el parasitismo de las colonias de *D. plantaginea*.

En huertos de melocotón Wan et al. (2014 a,b) demostraron que la cubierta vegetal de *Trifolium repens* L. (Fabaceae) aumentó la diversidad de depredadores generalistas en las copas de los árboles y disminuyó la incidencia de pulgones y *G. molesta*. Aparicio et al. (2021) encontraron mayor número de depredadores *Aphidoletes aphidimyza* Rondani (Diptera: Cecidomyiidae) y *Episyrphus balteatus* De Geer (Diptera: Syrphidae) sobre colonias de pulgón centinela próximos a campos con margen floral respecto a huertos sin franjas con flores. En el cultivo de tomate, Balzan y Moonen, 2013, reportaron que la siembra de flores de *Fagopyrum esculentum* Moench (Polygonaceae), *Phaseolus vulgaris* L., *Vicia villosa* Roth (Fabaceae), *Coriandrum sativum* L., *Foeniculum vulgare* Mill. (Apiaceae) y *Borago officinalis* L. (Boraginaceae) en los márgenes, afectó la abundancia de los pulgones debido al incremento en la tasa de parasitismo. También encontraron menor daño foliar causado por plagas de la familia Noctuidae y *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) en las parcelas adyacentes a franjas florales. Haseeb et al. (2018), reportaron que los diferentes cultivares de *L. maritima* sembrado en las proximidades del cultivo de tomate favorecieron la abundancia de importantes depredadores que atacan a *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae). Balzan (2017), demostró que el margen floral de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) sembrado próximo

al cultivo de tomate favoreció la abundancia de los parasitoides, depredadores (Dicyphini) y otros grupos importantes de enemigos naturales que atacan a *T. absoluta* en el cultivo. Además, Balzan et al. (2016) estudiaron la composición de la vegetación espontánea en los márgenes de los campos de tomates y demostraron que la biodiversidad de plantas no cultivadas presentes alberga a importantes grupos de enemigos naturales que contribuyen a la supresión de plagas de *T. absoluta* y otros lepidópteros de la familia Noctuidae en el cultivo. Arnó et al. (2021) demostraron que la siembra de flores de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae), *F. esculentum*, *L. maritima* y *Sinapis alba* L. (Brassicaceae) en el margen del cultivo de tomate, fueron atractivas a numerosos enemigos naturales que atacan a *T. absoluta* y otras plagas asociadas a cultivos hortícolas presentes y que se encuentran adyacentes al cultivo de tomate. Estos antecedentes mencionados evidencian que el control biológico por conservación no es una utopía y que las prácticas de manejo sostenible pueden ser aplicables para el beneficio de la producción agrícola.

2. Objetivos

El objetivo general de esta tesis fue alcanzar una mejora en el control biológico por conservación (CBC) de las principales plagas presentes en huertos de frutales (melocotonero, manzano) y hortalizas (tomate) en el Mediterráneo mediante la integración de los recursos biológicos consistentes en márgenes florales y enemigos naturales que colonizan naturalmente el hábitat.

Para lograr el objetivo principal se plantearon cuatro objetivos específicos.

1. Identificar las especies de plantas candidatas a ser incorporadas como infraestructuras ecológicas para promover el CBC de pulgones y trips en huertos frutales, determinando su abundancia y período de floración, los grupos de enemigos naturales predominantes presentes sobre estas plantas, y la disponibilidad de néctar en términos de arquitectura floral y morfología de los insectos a conservar. **Capítulo 1.**
2. Evaluar en el laboratorio el beneficio de la utilización de flores de *L. maritima* sobre el depredador generalista *M. pygmaeus* y el parasitoide especialista *N. tutae* para mejorar el control biológico de *T. absoluta*. **Capítulo 2.**
3. Estimar la contribución de un margen de *L. maritima* sembrado adyacente a un cultivo de tomate sobre la severidad del ataque de *T. absoluta* y sobre la abundancia de sus enemigos naturales. **Capítulo 3.**
4. Evaluar la contribución del parasitoide especialista *N. tutae* en el control biológico de *T. absoluta* en campos comerciales que implementaron un programa de Manejo Integrado de Plagas e identificar una nueva especie de parasitoide que contribuye al control biológico de *T. absoluta*. **Capítulo 4.**



3. Capítulo 1

Selection of insectary plant for the conservation of biological control agents of aphids and thrips in fruit orchards

Carmen Denis, Jordi Riudavets, Rosa Gabarra, Paula Molina, Judit Arnó
Bulletin of Entomological Research 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0007485321000183>

3.1 Introduction

Spain is the primary producer of stone and pip fruits (EUROSTAT, 2019) in the European Union, and the production of peaches and nectarines (*Prunus persica* L. Batsch) and apples (*Malus domestica* Borkh) are concentrated in the North East (MAPA, 2020). Fruit production can be affected by aphids, which are considered a significant pest of peach, nectarine, and apple orchards under temperate and Mediterranean climates (Barbagallo et al., 2017), whereas thrips inflict damage to nectarines (González et al., 1994). *Myzus persicae* Sulzer and *Hyalopterus* spp. in peach and *Eriosoma lanigerum* Hausmann and *Dysaphis plantaginea* Passerini (Hemiptera: Aphididae) in apple are the most common aphids that attack stone and pome fruit trees (Barbagallo et al., 2017). *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) is the main thrips species of nectarines in Spain and other Mediterranean countries, where it causes feeding damage to flowers and ripe fruits (Teulon et al., 2018). Aphids and thrips are present in the field early in the season. *Myzus persicae*, *Hyalopterus* spp., and *D. plantaginea* overwinter as eggs on trees (Barbagallo et al., 2017). Conversely, *E. lanigerum* overwinters as an adult either on the roots or within the canopy of apple trees (Lordan et al., 2014). Thrips hibernate in the weed flowers that are present around or within the fruit orchards (Trdan et al., 2005), and they fly to the flowers of the nectarine trees during blooming.

To date, aphids and thrips in fruit orchards are mostly managed with insecticides (Penvern et al., 2010). The social concern for healthier food provision and more sustainable agriculture has led to the search for healthy and environmentally friendly tools for pest management. The intensification of agriculture has promoted the simplification of agroecosystems, and the subsequent removal of non-crop habitats has caused a decline in biodiversity (Gurr et al., 2004). Hence, there has been an increasing interest in restoring

biodiversity and in conservation biological control (CBC) by modifying the environment or existing practices to protect and enhance specific natural enemies to reduce the effect of pests (Eilenberg et al., 2001). Dedryver et al. (2010) suggested that CBC was the best option for biological control of aphids in open field crops. That is why it is crucial to determine with confidence which natural enemies to promote. The works by Rodriguez Gasol et al. (2019) and Aparicio et al. (2019) reported on several species of Braconidae and one of Aphelinidae that parasitized several aphid pests in fruit orchards in the same area as the present study, and on hyperparasitoids from the Pteromalidae, Encyrtidae, and Figitidae families. By contrast, only one species, *Ceraninus menes* (Walker) (Hymenoptera: Eulophidae), parasitizes *F. occidentalis* in Mediterranean agroecosystems, although this species only plays a minor role in thrips control (Loomans, 2006). In Spain, several predatory groups (Coccinellidae, Chrysopidae, Anthocoridae, Syrphidae, and Aeolothripidae) have also been recorded from peach and apple orchards (Miñarro et al., 2005; Davidson et al., 2014; Rodriguez-Gasol et al., 2019; Aparicio et al., 2021).

One of the most commonly adopted measures to enhance the presence of natural enemies close to crops is the increase of plant biodiversity in flower strips, ground covers, and field edges, among others. Plants can provide various food sources for adult parasitoids and insect predators, including floral nectar, extrafloral nectar, honeydew, pollen, and seeds (Wäckers, 2005; Araj and Wratten, 2015), and they can also provide suitable habitat for alternative hosts and prey. Wäckers (2005) reviewed the effect of nectar on parasitoids and predators and discussed its role as a survival food when the host or prey is not available and its role in increasing fitness when they are available. Several studies have addressed the selection and field testing of companion plants to enhance biological control in orchards. For example, in apples, Gontijo et al. (2013) demonstrated the

efficacy of *Lobularia maritima* L. (Brassicaceae) at increasing populations of generalist predators and at reducing attacks from *D. plantaginea*. Cahenzli et al. (2019) in field experiments conducted in seven European countries demonstrated the positive effect of sown perennial flower strips with selected dicotyledon and grass species compared to spontaneous vegetation in the control of aphids in apple orchards. Fitzgerald and Solomon (2004) and Winkler et al. (2007) observed that the presence of flowers increased the densities of anthocorids and contributed to the control of *Cacopsylla pyri* L. (Hemiptera: Psyllidae). In Chinese peach orchards, Wan et al. (2014 a, b) demonstrated that a ground cover of *Trifolium repens* L. (Fabaceae) enhanced the diversity of generalist predators in tree canopies and decreased the incidence of aphids and *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae).

The selection of appropriate plant species for target natural enemies is a crucial issue to enhance their populations effectively. Shanker et al. (2013) argued that the selection of plants from their own agroecological system increased the potential for establishment of natural enemies. Similarly, several studies have screened other plants such as weeds that are not conventionally used as insectary plants (Wäckers 2004; Araj and Wratten, 2015; Jado et al., 2018; Araj et al., 2019). Another selection criterion is the bloom period to ensure the presence of flower-food resources before the pest population starts to build up. However, food availability is not only a question of timing but also one of attractiveness and flower architecture, which might constrain nectar accessibility (Wäckers, 2005). Moreover, the selection of candidate plants must take into account their role as a potential reservoir of pests or diseases detrimental to the crop (Bugg and Waddington, 1994).

Considering this background, our work aimed to identify candidate plant species to be included in ecological infrastructure tailored to promote aphid and thrips CBC in fruit orchards in the study area early in the season when these pests are most damaging. To

achieve that we (1) determined the flowering period of the most common herbaceous plants spontaneously present near fruit orchards in the North East of Spain, (2) identified the predominant functional groups of natural enemies present on these plant species, and (3) evaluated the nectar availability of the different plant species in terms of floral architecture and natural enemy morphology.

3.2 Material and Methods

Survey of flowering plants and natural enemies

The survey was conducted from early March (week 11) to the third week of May 2017 (week 21) at 20 sampling sites in the Segrià, Pla d’Urgell and La Litera counties (North East of Spain), which has an area of approximately 20,000 ha of apple and peach orchards (DARP, 2020; Gobierno de Aragón, 2020). The sites were selected to be representative of the orchard vegetation and were all within an area of approximately 400 km² (Fig. 1).

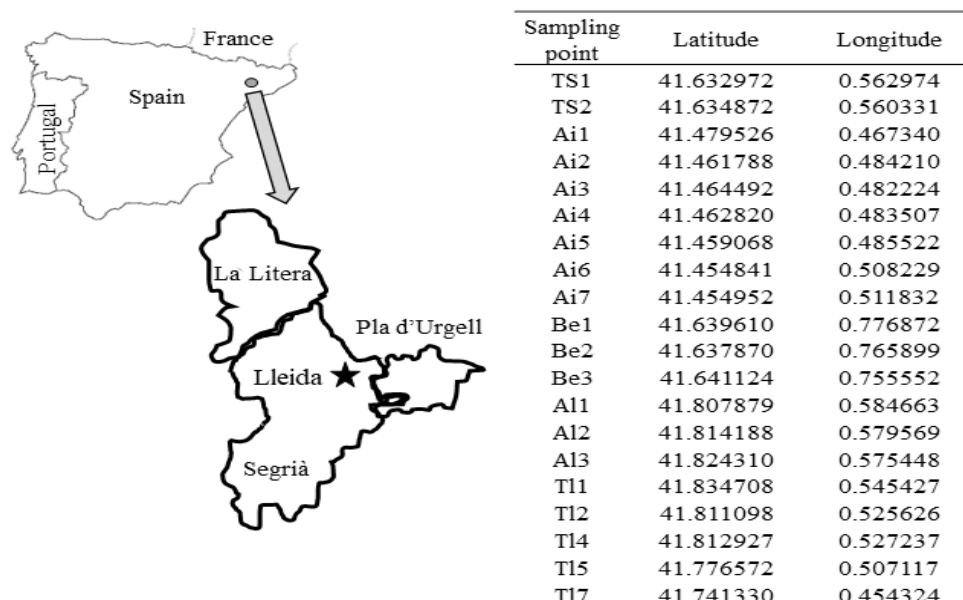


Figure 1. Coordinates of the 20 sampling points of the study located in Segrià, Pla d’Urgell and La Litera (North East of Spain). For reference, coordinates of the city of Lleida are 41.62026 and 0.61976.

All sites were visited fortnightly, and plant species in full-bloom were recorded. At each sampling site and date, one sample was taken. It consisted of beating separately three bunches of flowers of each plant species in bloom on a 30 × 17 cm white plastic tray. The number of hymenopteran parasitoids, Coccinellidae, Chrysopidae, Anthocoridae, Aeolothripidae, aphids and phytophagous thrips (hereafter thrips) in the tray were recorded. The average number of individuals of the different functional groups per tray was calculated for each sampling site, date, and flower species. Hymenopteran parasitoids and Anthocoridae and Aeolothripidae specimens were collected with an aspirator and kept in 70% alcohol for identification. Parasitoids were identified when possible to the family level using the taxonomic keys of Grissell and Schauff (1990) and Hanson and Gauld (2006). Parasitoids that could not be identified were grouped as *Other Parasitica*. Braconidae were identified to species level by Y. Aparicio. Anthocoridae were identified using Péricart (1972) and Aeolothripidae with the taxonomy keys of Alavi and Minaei (2018). The number of aphids and other thrips per tray was also recorded (but were not identified to species level).

Accessibility to nectar

Flowers of the different species were collected and placed in an ice chest cooler and transported to the laboratory, where they were inspected for the presence of nectaries. Plants were classified as harboring extrafloral or floral nectaries (unprotected or protected). Of the flowers with protected nectaries, nectar presentation was observed and classified as fully exposed or protected inside the flower. For species with nectar protected inside the flower, 20 fully open flowers of each plant species were photographed twice: one for width and one for depth measurements of the corolla under

a Stereo Microscope Carl Zeiss stemi 2000C. Measurements were made with the use of ImageJ software (Rueden et al., 2017).

Similarly, measurements were made on the width of the head and the thorax of several natural enemies of aphids and thrips already sighted in the study area (Aparicio et al., 2021 ; Rodriguez-Gasol et al., 2019), including: *Aphidius matricariae* Haliday, *Aphidius ervi* Haliday, *Lysiphlebus testaceipes* Cresson, (Hymenoptera: Braconidae), *Aphelinus abdominalis* Dalman, *Aphelinus mali* Haldemann, (Hymenoptera: Aphelinidae), *Aphidoletes aphidimyza* Rondani (Diptera: Cecidomyiidae), *Orius majusculus* Reuter (Hemiptera: Anthocoridae), and *Aeolothrips intermedius* Bagnall (Thysanoptera: Aeolothripidae). *Orius majusculus* were obtained from the colony kept in the IRTA laboratory, *A. mali* and *A. intermedius* were collected in the field, and the other species were purchased from AgroBio S.L (Almería, Spain). Ten females and ten males randomly selected from each species were used.

Data analysis

The mean number of individuals from each parasitoid and predator family for all the sampling dates and sites was used to calculate the Shannon's diversity index (H') for each plant species: $H' = \sum_{i=1}^S -(P_i \times \ln P_i)$, where P_i is the proportion of the mean number of individuals of family i versus the mean number of individuals of all the natural enemies recorded in this plant species, and S is the number of families encountered. This index was calculated using the Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis (PAST) (Hammer et al., 2001). For males and females of the selected natural enemies, the Student's t-test ($P < 0.05$) was used to test whether the thorax was wider than the head.

3.3 Results

Survey of flowering plants and natural enemies

A total of 36 spontaneous growing herbaceous species belonging to 17 families were found to be blooming during the sampling period in the close surroundings of the fruit tree orchards in Lleida (Table 1). Many blooming plants belonged to Brassicaceae and Asteraceae (10 and 8 species, respectively), whereas Fabaceae, Euphorbiaceae, and Lamiaceae only had two species each in bloom. The remaining 12 families only included one species. Of these plants, 25 were early flowering plants (weeks 11–15) and eleven species started to bloom later (weeks 17–21). Among the early-flowering plants, five of them were already in bloom in week 11 (early March) when the sampling started. Of these, *Eruca vesicaria* (L.) Cav., *Diplotaxis erucooides* (L.) DC, and *Moricandia arvensis* (L.) DC were the most widely distributed as can be inferred by the higher numbers of samplings sites where they were found. Additionally, *E. vesicaria* and *M. arvensis* had an extended flowering period that lasted until weeks 19 and 21, respectively. *Cardaria draba* (L.) Desv, *Euphorbia serrata* (L.) S.G. Gmel., *Crepis sp.* L., and *Sisymbrium irio* L., extended their flowering period from week 13 to week 19. Of those plant species that started to bloom later, *Anacyclus clavatus* (Desf.) Pers. and *Malva sylvestris* L. bloomed from week 15 to week 21 and were present in many sampling sites. Of the plants that bloomed by week 17, *Beta maritima* L., *Galium aparine* L., *Papaver rhoeas* L., and *Rumex crispus* L. were the most prevalent.

Table 1. Number of sample sites where each of the plant species was recorded in full bloom during the sampling weeks. Twenty sampling sites were visited on each sampling date. Plant species are ordered from early to late and from longest to shortest flowering period.

Plant species (Family)	Early period weeks			Late period weeks		
	11	13	15	17	19	21
<i>Moricandia arvensis</i> (Brassicaceae)	3	2	3	2	1	1
<i>Eruca vesicaria</i> (Brassicaceae)	4	5	7	4	2	
<i>Medicago sativa</i> (Fabaceae)	1	1			2	
<i>Calendula arvensis</i> (Asteraceae)	1	1	3	1		
<i>Diplotaxis eruroides</i> (Brassicaceae)	2	5	6	1		
<i>Crepis sp.</i> (Asteraceae)		3	3	4	1	
<i>Cardaria draba</i> (Brassicaceae)		1	6	8	3	
<i>Euphorbia serrata</i> (Euphorbiaceae)		1	5	6	2	
<i>Sisymbrium irio</i> (Brassicaceae)		1	4	1	1	
<i>Euphorbia helioscopia</i> (Euphorbiaceae)		1	1	1		
<i>Fumaria officinalis</i> (Fumariaceae)		1	1	1		
<i>Thymus vulgaris</i> (Lamiaceae)		1	1	2		
<i>Brassica napus</i> (Brassicaceae)		1	3			
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (Brassicaceae)		2	2			
<i>Erodium ciconium</i> (Geraniaceae)		1	2			
<i>Lamium sp.</i> (Lamiaceae)		1	1			
<i>Scandix pecten-veneris</i> (Apiaceae)		1	1			
<i>Taraxacum officinale</i> (Asteraceae)		1				
<i>Anacyclus clavatus</i> (Asteraceae)			4	11	12	8
<i>Malva sylvestris</i> (Malvaceae)			1	10	10	8
<i>Sonchus sp.</i> (Asteraceae)			4	1	4	1
<i>Asphodelus fistulosus</i> (Xanthorrhoeaceae)			5	5	1	
<i>Chrysanthemum segetum</i> (Asteraceae)			1	1	1	
<i>Plantago sp.</i> (Plantaginaceae)			3	1	3	
<i>Diplotaxis virgata</i> (Brassicaceae)			3			
<i>Beta maritima</i> (Amaranthaceae)				4	7	5
<i>Galium aparine</i> (Rubiaceae)				3	6	3
<i>Papaver rhoeas</i> (Papaveraceae)				4	4	5
<i>Rumex crispus</i> (Polygonaceae)				3	4	5
<i>Carduus pycnocephalus</i> (Asteraceae)				3	3	1
<i>Reseda lutea</i> (Resedaceae)				1	1	
<i>Erucastrum sp.</i> (Brassicaceae)				1		
<i>Rapistrum rugosum</i> (Brassicaceae)				2		
<i>Silene vulgaris</i> (Caryophyllaceae)				1		
<i>Dorycnium pentaphyllum</i> (Fabaceae)					5	2
<i>Pallenis spinosa</i> (Asteraceae)					3	3

Natural enemies were collected from 30 plant species and accounted for 145 parasitoid and 285 predator individuals (Table 2). No natural enemies were recruited from six plant species: namely, *Fumaria officinalis* L., *Thymus vulgaris* L., *Erodium ciconium* (L. et Juslin) L'Hér., *Scandix pecten-veneris* L., *Erucastrum* sp. (DC.) C. Presl, and *Silene vulgaris* (Moench) Garcke, and were therefore not included in Table 2 or further analysis. No parasitoids were found in association with *M. arvensis*, *Calendula arvensis* L., *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik., *Chrysanthemum segetum* L., *Plantago* sp. L., and *Pallenis spinosa* (L.) Cass. On the other hand, no predators were recruited from *Lamium* sp. L., *Diploaxis virgata* (Cav.) DC. and *Rapistrum rugosum* (L.) All. The Shannon biodiversity indexes were higher than 1.5 for the following five species— *Carduus pycnocephalus* L., *R. crispus*, *E. vesicaria*, *C. draba*, and *G. aparine*—with values reaching up to 1.87.

Table 2. Abundance of natural enemies (mean number of individuals over all sampling sites and dates) and value of Shannon's diversity index for each plant species. Plant species are ordered from higher to lower Shannon index. Plants species without parasitoids and predators are highlighted in light and dark grey, respectively.

Plant species	Braconidae	Ichneumonidae	Aphelinidae	Eurytomidae	Eulophidae	Platygastridae	Mymaridae	Perilampidae	Megaspilidae	Figitidae	Pteromalidae	Other Parasitica	Coccinellidae	Chrysopidae	Anthocoridae	Aeolothripidae	Shannon Index
<i>C. pycnocephalus</i>	0	0	0	0	0	0.07	0.14	0.05	0	0	0	0.12	0.14	0	0.1	0.21	1.87
<i>R. crispus</i>	0.06	0	0	0	0.15	0	0	0	0.01	0	0	0.21	0.18	0	0.08	0.14	1.76
<i>E. vesicaria</i>	0.02	0.05	0	0.02	0.02	0	0	0.19	0	0	0	0.01	0	0.01	0.07	0.07	1.71
<i>C. draba</i>	0.04	0	0	0	0.02	0.02	0	0	0	0.02	0	0.13	0.02	0	0.02	0.11	1.71
<i>G. aparine</i>	0.08	0	0	0.03	0	0.06	0	0	0	0	0	0.01	0.11	0	0	0.04	1.60
<i>B. maritima</i>	0.02	0	0.02	0	0	0	0	0	0	0.01	0	0.05	0.04	0.04	0	0.31	1.27
<i>E. serrata</i>	0.01	0	0	0	0.02	0	0	0	0	0	0	0.06	0	0	0.02	0.13	1.23
<i>A. clavatus</i>	0	0	0	0	0.05	0.02	0	0	0	0	0	0.01	0.01	0	0.04	0.20	1.23
<i>Crepis sp.</i>	0.12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03	0.03	0	0	0.05	1.20
<i>S. irio</i>	0.05	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0.05	0	0	0.05	0.36	1.12
<i>D. pentaphyllum</i>	0.19	0	0	0	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0.14	0	0	0.57	1.14
<i>D. erucoides</i>	0	0.07	0	0	0.02	0	0	0	0	0	0	0.05	0.02	0	0.45	0.05	1.11
<i>M. sylvestris</i>	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.23	1.08
<i>M. sativa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.08	0.08	0	0	0.17	1.03

Table 2. (Continued.)

Plant species	Braconidae	Ichneumonidae	Aphelinidae	Eurytomidae	Eulophidae	Platygastridae	Mymaridae	Perilampidae	Megaspilidae	Figitidae	Pteromalidae	Other Parasitica	Coccinellidae	Chrysopidae	Anthocoridae	Aeolothripidae	Shannon Index
<i>Sonchus sp.</i>	0	0	0	0	0	0.07	0	0	0	0	0	0.03	0	0	0	0.13	0.95
<i>E. helioscopia</i>	0	0.08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.08	0	0	0	0.69
<i>B. napus</i>	0	0	0	0	0.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.42	0.69
<i>Plantago sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0	0.05	0.69
<i>R. lutea</i>	0	0	0	0	0	0.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.33	0.49
<i>A. fistulosus</i>	0	0	0	0.27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03	0	0.03	0.60
<i>P. rhoeas</i>	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03	0	0.27	0.55
<i>T. officinale</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.16	0	0	0	0.83	0.45
<i>P. spinosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.06	0.56	0.30
<i>M. arvensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.82	0
<i>C. arvensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.11	0
<i>C. bursa-pastoris</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.17	0
<i>Lamium sp.</i>	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. segetum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.33	0
<i>D. virgata</i>	0.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>R. rugosum</i>	0	0	0	0	0.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 3 depicts the number of samples in which families of natural enemies known to be associated with aphids or thrips were found. The number of plant species where the presence of Braconidae and Aphelinidae families were recorded increased from three to nine from the first sampling period (weeks 11–15) to the second sampling period (weeks 17–21), as did the number of samples with at least one individual (from 4 to 21). Of the 30 recruited parasitoids that belonged to the above-mentioned families, 28 were identified as Braconidae and two as Aphelinidae. Among the Braconidae, 24 individuals were classified as belonging to the Aphidiinae subfamily: 10 *A. matricariae*, five *Binodoxys angelicae* Haliday (Hymenoptera: Braconidae), four *Aphidius* sp., three *A. ervi*, and two *Aphidius colemani* Dalman (Hymenoptera: Braconidae). Moreover, three Figitidae and one Pteromalidae, known as hyperparasitoids of aphids, were recruited during the sampling. Aeolothripidae were the most prevalent predators in both sampling periods. They were reported from 12 and 20 plant species and in 17% and 35% of the samples, in the first and second sampling period, respectively. Out of the 205 Aeolothripidae individuals collected in the samples, 88 were identified to the species level. Half of them corresponded to *A. intermedius*, and the other half to *Aeolothrips tenuicornis* Bagnall (Thysanoptera: Aeolothripidae). Other predators were much less widespread, making up less than 10% of the samples. Concerning the 41 individuals belonging to Anthocoridae, *Orius* spp. was the most abundant genus. A sample of 26 individuals were identified to the species level: 20 *O. majusculus* and six *Orius laevigatus* Fieber. Additionally, 33 ladybirds and six lacewings were recruited. During the samplings, aphids or phytophagous thrips were found in all the flowering plants with potential natural enemies, except in *Lamium* sp. For all plant species, the average values of aphids and thrips was highly variable depending on the sampling sites and dates. Pooling together all sampling

Table 3. Total number of samples (#) and samples with presence of target families that include important natural enemies of aphids and thrips during the early and late flowering periods. Parasitoids: Braconidae (Brac), Aphelinidae (Aphel), Pteromalidae (Pter), Figitidae (Figit). Predators: Coccinellidae (Cocc), Chrysopidae (Chry), Anthocoridae (Anth), and Aeolothripidae (Aeol). For an easier table reading, zeros have been replaced by points. Plant species are ordered from early to late and from the longest to shortest flowering period.

Plant species	Early flowering period (weeks 11 to 15)									Late flowering period (weeks 17 to 21)								
	#	Parasitoid families				Predator families				#	Parasitoid families				Predator families			
		Brac	Aphel	Pter	Figit	Cocc	Chry	Anth	Aeol		Brac	Aphel	Pter	Figit	Cocc	Chry	Anth	Aeol
<i>M. arvensis</i>	8	2	4	4
<i>E. vesicaria</i>	16	1	1	4	1	6	1
<i>M. sativa</i>	2	1	.	.	.	2	1
<i>C. arvensis</i>	5	2	1
<i>D. erucoides</i>	13	1	.	3	1	1	1
<i>Crepis sp.</i>	6	1	.	.	1	5	2
<i>C. draba</i>	7	2	11	1	.	.	1	1	.	1	4
<i>E. serrata</i>	6	1	8	1	1	3
<i>S. irio</i>	5	1	.	.	1	.	.	.	1	2	1	2
<i>E. helioscopia</i>	2	1	.	.	.	1
<i>B. napus</i>	4	1
<i>C. bursa-pastoris</i>	4	2
<i>Lamium sp.</i>	2
<i>T. officinale</i>	1	1
<i>A. clavatus</i>	4	31	1	.	5	9
<i>M. sylvestris</i>	1	28	2	.	1	.	3	1	2	9
<i>Sonchus sp.</i>	4	6	2
<i>A. fistulosus</i>	5	1	6	1	.	.
<i>C. segetum</i>	1	2	2
<i>Plantago sp.</i>	3	1	.	.	.	4	1
<i>D. virgata</i>	3	1

Table 3. (Continued.)

Plant species	Early flowering period (weeks 11 to 15)									Late flowering period (weeks 17 to 21)								
	#	Parasitoid families				Predator families				#	Parasitoid families				Predator families			
		Brac	Aphel	Pter	Figit	Cocc	Chry	Anth	Aeol		Brac	Aphel	Pter	Figit	Cocc	Chry	Anth	Aeol
<i>B. maritima</i>	16	1	2	.	1	2	.	7	
<i>G. aparine</i>	12	3	.	.	3	.	.	2	
<i>P. rhoeas</i>	13	1	.	.	.	1	.	6	
<i>R. crispus</i>	12	3	.	.	4	.	1	4	
<i>C. pycnocephalus</i>	7	.	.	.	2	.	1	3	
<i>R. lutea</i>	2	2	
<i>R. rugosum</i>	2	
<i>D. pentaphyllum</i>	7	2	.	.	1	.	.	2	
<i>P. spinosa</i>	6	1	3	

sites and dates, *Medicago sativa* L. hosted the highest number of aphids (11.2 ± 10.3) and *Brassica napus* L. the highest number of thrips (10.2 ± 1.9).

Accessibility to nectar

No nectaries were observed in three out of the 36 plant species sampled (*P. rhoeas*, *Plantago* sp. and *R. crispus*), and four species presented extrafloral nectaries (*Dorycnium pentaphyllum* Scop., *M. sativa*, *Euphorbia helioscopia* L., and *E. serrata*). Unprotected floral nectaries were only recorded in *G. aparine*, whereas all the remaining plants had more or less protected nectaries. Additionally, nectar was observed on the outer surface of the flower as an exudate in *M. sylvestris*, *Asphodelus fistulosus* L., and *Lamium* sp., although nectaries were classified as partially protected. Similarly, nectar exudates were also present outside the florets of some Asteraceae with protected nectaries (*A. clavatus*, *Crepis* sp., *C. pycnocephalus*, *Taraxacum officinale* (L.) Wiggers, and *Sonchus* sp. L.). For the Asteraceae species (*C. arvensis*, *C. segetum*, and *P. spinosa*) and for the Resedaceae species (*Reseda lutea* L.), nectar exudate was not observed. In the other 10 species belonging to Brassicaceae and Amaranthaceae, nectaries were protected or partially protected, and nectar was not observed on the surface of the flower, and the width and depth of their corolla were measured (Fig. 2).

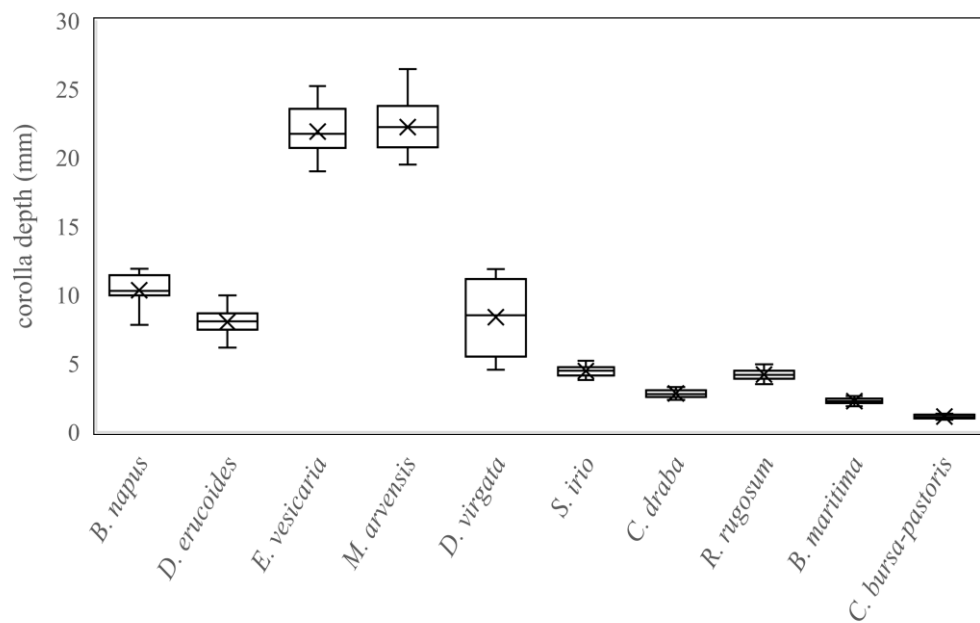
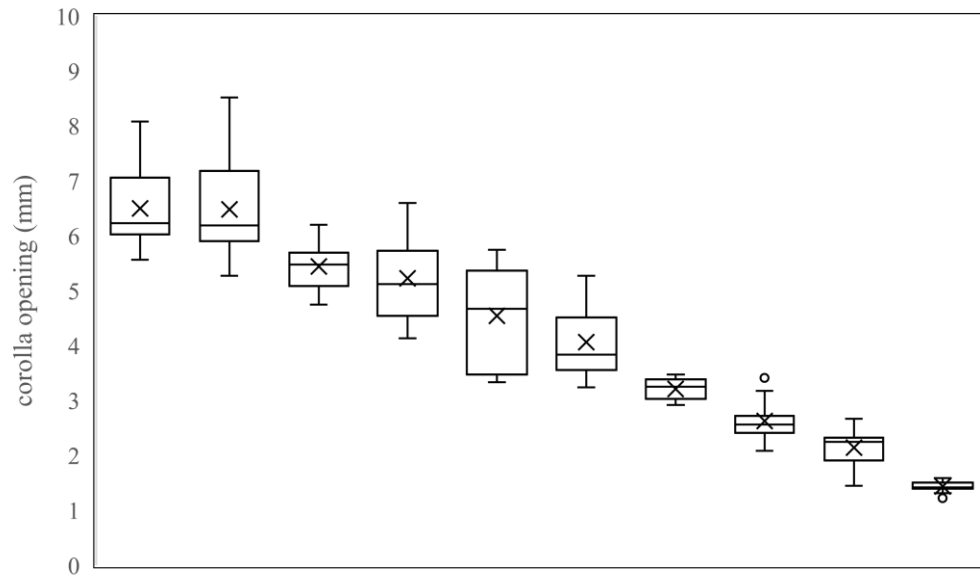


Figure 2. Box plot of flower corolla opening and depth measures of the ten plant species that have their nectaries partially protected. In the X-axis, plant species are ordered from widest to narrowest corolla opening.

The narrowest corolla opening was measured in *C. bursa-pastoris* (1.22–1.59 mm), whereas *B. napus* (5.56–8.07 mm) and *D. erucoides* (5.27–8.51) had the widest corolla opening. *Capsella bursa-pastoris* also had the shallowest corolla (with a mean of 1.11 mm), and *M. arvensis* and *E. vesicaria* presented the deepest (with means of 22.23 and 21.89 mm, respectively).

Table 4 depicts the values of head and thorax width for female and male parasitoids and predators, which in all cases were less than 1.22 mm (the narrowest corolla opening). For the three measured predators, the thorax was always significantly wider than the head. For the parasitoids, the thorax of the female was not significantly wider than the head. By contrast, the thorax of males was significantly wider than their head for *A. ervi*, *L. testaceipes*, and *A. matricariae*.

Table 4. Mean (\pm S.E) and maximum (Max.) size (mm) of thorax and head width of selected insect species ($n = 10$). Bold values indicate significant differences.

Insect species	Sex	Thorax		Head		Statistical analysis	
		Mean	Max.	Mean	Max.	t	P
<i>Aphelinus abdominalis</i>	♀	0.55 \pm 0.01	1.07	0.54 \pm 0.00	0.78	-0.009	0.182
	♂	0.50 \pm 0.01	0.93	0.49 \pm 0.01	0.69	-0.023	0.255
<i>Aphidius ervi</i>	♀	0.57 \pm 0.01	1.07	0.54 \pm 0.01	0.78	-0.009	0.059
	♂	0.54 \pm 0.01	0.93	0.50 \pm 0.01	0.69	0.011	<0.01
<i>Aphelinus mali</i>	♀	0.72 \pm 0.02	1.07	0.69 \pm 0.02	0.78	-0.02	0.117
	♂	0.64 \pm 0.02	0.93	0.61 \pm 0.02	0.69	-0.031	0.132
<i>Aphidius matricariae</i>	♀	0.42 \pm 0.01	1.07	0.41 \pm 0.01	0.78	-0.015	0.188
	♂	0.42 \pm 0.01	0.93	0.38 \pm 0.01	0.69	0.015	<0.01
<i>Lysiphlebus testaceipes</i>	♀	0.42 \pm 0.02	1.07	0.42 \pm 0.02	0.78	-0.048	0.427
	♂	0.49 \pm 0.01	0.93	0.44 \pm 0.01	0.69	0.018	<0.01
<i>Aeolothrips intermedius</i>	♀	0.41 \pm 0.02	1.07	0.24 \pm 0.01	0.78	0.129	<0.001
	♂	0.27 \pm 0.00	0.93	0.17 \pm 0.00	0.69	0.094	<0.001
<i>Aphidoletes aphidimyza</i>	♀	0.44 \pm 0.02	1.07	0.33 \pm 0.01	0.78	0.055	<0.001
	♂	0.39 \pm 0.02	0.93	0.32 \pm 0.01	0.69	0.019	<0.01
<i>Orius majusculus</i>	♀	1.00 \pm 0.01	1.07	0.47 \pm 0.00	0.78	0.509	<0.001
	♂	0.89 \pm 0.01	0.93	0.43 \pm 0.01	0.69	0.429	<0.001

3.4 Discussion

In our study, 36 plant species were found blooming during the sampling period, providing a continuous flowering period that might ensure food resources for natural enemies from early March to late May (Shanker et al., 2013). Target pests in our study were aphids and thrips that start inflicting damage from early spring. Therefore, plants flowering in late winter and early spring are needed. An early establishment of wildflowers on crop margins will provide benefits to various groups of insects as a significant number of natural enemies disperse outside the refuge and colonize adjacent crops before and during the initial accumulation of the pest population (Corbett and Rosenheim, 1996). Many of the early flowering plants close to fruit orchards belonged to Brassicaceae and Asteraceae families, which was in agreement with data reported by Alins et al. (2019) from the same area. In fact, from the five species that were found in bloom at the beginning of the sampling, three were Brassicaceae (*M. arvensis*, *E. vesicaria* and *D. eruroides*) and one was Asteraceae (*C. arvensis*). These species bloom early when temperatures are still low and can keep on flowering up to the first summer months (Alins et al., 2019). Species of Brassicaceae and Asteraceae have also been included in several seed mixtures used either in flower margins or ground covers in orchards (e.g. Pfiffner et al., 2019).

Only five plant species had Shannon's diversity index values between 1.5 and 3.5, which comprise the common values of this index (Magurran, 2004), and another 10 had values slightly above or equal to 1. Therefore, diversity of target natural enemies, collected during the samplings of the flowering plants can be considered in general low. Values were probably influenced either by the sampling period (March–May) when temperatures are still low in the area, a condition that reduces insect activity, and by the method used (beating), which only allows the evaluation of the insects present at a given time. It can be assumed that greater diversity of natural enemies in naturally occurring plants close to

the crop may play a crucial role in maintaining ecosystem services and would lead to better pest control (Bàrberi et al., 2010; Balzan et al., 2014). Therefore, these 15 plants with Shannon indexes higher than 1 can become functional allies to attract beneficial species to the orchards.

Records of natural enemies on plant species can be used as a proxy for plant attraction (Thomson et al., 2007) and enables comparisons among them to select candidates to congregate and provide resources to the natural enemies of interest. Target natural enemies that can be useful to control aphids and thrips were found in a large number of the sampled plant species, which could indicate their potential to contribute to the establishment of these natural enemies in fruit orchards. Regarding parasitoids, Braconidae was the earliest in the season and the most widely distributed (found on more plant species and more samples), with *A. matricariae* being the most abundant. This is a positive result since this species is by far the main parasitoid species attacking *M. persicae* and *D. plantaginea* in the surveyed area (Aparicio et al., 2019; Rodríguez-Gasol et al., 2019). Other aphid parasitoids mentioned in these two studies (*A. colemani* and *A. ervi*) were also found during the present samplings visiting flowers at the border of orchards. Finally, *B. angelicae* has also been reported to parasitize *D. plantaginea* and *M. persicae* (Kavallieratos et al., 2004; Dassonville et al., 2013). By contrast, individuals from the Aphelinidae family were detected only in two samples of *B. maritima*. It is worth noting that *A. mali*, the main parasitoid of *E. lanigerum* in the area sampled (Lordan et al., 2014; Rodríguez-Gasol et al., 2019), belongs to this family.

Predatory, Aeolothripidae were recruited from more plant species and a higher number of samples. The high abundance of Aeolothripidae may be biased by the sampling method used since predatory thrips spend most of their life cycle in flowers, feeding on prey and pollen (Bournier et al., 1978). Pizzol et al. (2017) reported the presence of several species

of *Aeolothrips* in many naturally occurring plants, including many of the ones sampled in the present study. Other predators reported in our survey (i.e., Coccinellidae, Chrysopidae, and Anthocoridae) were by far much less abundant and widespread but also present in the early flowering period. They are frequent visitors of flowers when searching for pollen and nectar to complement their diets, especially when prey is scarce (Wäckers, 2005).

The criteria considered to select appropriate plant species to enhance target natural enemies are summarized in Table 5. Four plant species arose as the most promising candidates (i.e., *E. vesicaria*, *C. draba*, *E. serrata*, and *M. sylvestris*). They had a high diversity index, and their blooming started early in the season and lasted for several sampling weeks. Furthermore, they attracted the target natural enemies of aphids and thrips and were widely distributed. Additionally, *A. clavatus* and *D. eruroides* demonstrated similar characteristics although parasitoids were not recruited from them. Out of these species, three of them belonged to Brassicaceae. Numerous studies demonstrate the benefits of the Brassicaceae for natural enemies (Araj et al., 2019; Badenes-Pérez, 2019). Their nectar favored the longevity and fertility of parasitoids, such as *Diadegma insulare* Cresson (Hymenoptera: Ichneumonidae) and *Cotesia marginiventris* Cresson and *Diaeretiella rapae* McIntosh (Hymenoptera: Braconidae) (Idris and Grafius, 1997; Johanowicz and Mitchell, 2000; Araj and Wratten, 2015).

According to our results, the six selected plant species (*E. vesicaria*, *C. draba*, *D. eruroides*, *E. serrata*, *M. sylvestris*, and *A. clavatus*) have nectar available to natural enemies. Comparing the measures of flowers on the first three mentioned species (Brassicaceae) with measures of insects proved that their floral architecture should not be an impediment for tested target natural enemies to access nectar. For *E. serrata*, Papp (2004) already mentioned the presence of extrafloral nectaries, and an open corolla was

reported by Comba et al. (1999) for *M. sylvestris*. Finally, in the present study, nectar exudates were observed outside the florets for *A. clavatus*.

Measurements of the flower and the width of insect heads and thorax have been used on numerous occasions to evaluate the accessibility of flower nectar to insects (e.g., Patt et al., 1997; Nave et al., 2016; Villa et al., 2017). However, all sampled nectar-producing plants during the study had nectar easily available for all tested natural enemies, suggesting that comparison of measures of insects and flowers would not be a useful criterion for the selection of plants able to promote natural enemy populations. Additionally, for some insects, neither the thorax nor the head would be valid measures to evaluate the capability of an insect to penetrate the flower. Adults of the predator *A. aphidimyza* cannot access the nectaries at the bottom of the open flowers of *L. maritima* not due to their head or thorax width but to their wide leg span (Aparicio et al., 2018). Winkler et al. (2009) also stated that the ability to feed does not only depend on only floral architecture and insect size but also on other factors, such as searching behaviour. Furthermore, the availability of nectar does not guarantee that the insects feed on nectar. Other factors, such as the morphology of insect mouthparts, gustatory response to these sugar and capacity to digest and metabolise them, could affect the exploitation of nectar (Wäckers, 2004; Wäckers, 2005).

In conclusion, 36 plant species were found blooming during the sampling period (from early March to late May), which provided an array of flowers that attracted several families of natural enemies and which might ensure food resources for them. Among them, six species arose as candidates to enhance a complex of predators and parasitoids targeting aphids and thrips: *E. vesicaria*, *C. draba*, *E. serrata*, *M. sylvestris*, *A. clavatus*, and *D. erucoides*. It is worth to note that, according to our results these six species are not

important refuge of aphids and thrips, and to our knowledge, nor of other key pests in orchards such as Tortricidae. This selection does not exclude other potential candidates being included in ecological infrastructure for specific needs. For example, *B. maritima* could be of special interest in apple orchards since it was the only species recruited from Aphelinidae. Little is reported in the literature regarding the effects of such plant species on the biology of natural enemies. *Diplotaxis erucoides* increases the longevity and parasitism rate of *A. colemani* on *M. persicae* (Jado et al., 2018), and it also increases the longevity, egg load, fecundity, and the parasitism rate of *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) on *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) and of *D. rapae* on *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae) (Araj and Wratten, 2015; Araj et al., 2019). *Malva sylvestris* increases the survival of females of *Elasmus flabellatus* Fonscolombe (Hymenoptera: Eulophidae), a major parasitoid of *Prays oleae* Bernard (Lepidoptera: Praydidae), compared to other candidate flowers (Villa et al., 2017), and of *Episyrphus balteatus* De Geer (Diptera: Syrphidae) (Pinheiro et al., 2013), an important aphid predator widely present in apple and peach orchards in the studied area (Rodriguez-Gasol et al., 2019). Therefore, further studies are needed to determine the benefits of such flower rewards on several fitness parameters before verifying their contribution to the biological control of aphids and thrips in fruit orchards.

Table 5. Summary of criteria used to select flowering species from those present in sampled area. Only flowering plants with Shannon index higher or equal to one are listed. Two categories of the index were defined: $H \geq 1.5$ (++) , $1.5 > H \geq 1$ (+). Flowering earliness refers to the period when blooming started: early (weeks 11-15) and late (weeks 17-21). Blooming span stands for the number of sampling weeks when the plant was found in bloom. The presence of target parasitoids belonging to Braconidae and Aphelinidae families and predators are identified with +. # Sample sites indicate the total number of sites across the whole sampling where the plant was recorded in bloom.

Plant species	Shannon index ^a	Flowering earliness	Blooming span	Target parasitoids	Target predators	# Sample sites
<i>E. vesicaria</i>	++	early	5	+	+	22
<i>C. draba</i>	++	early	4	+	+	18
<i>M. sylvestris</i>	+	early	4	+	+	29
<i>E. serrata</i>	+	early	4	+	+	14
<i>A. clavatus</i>	+	early	4	0	+	35
<i>D. erucooides</i>	+	early	4	0	+	14
<i>B. maritima</i>	+	late	3	+	+	16
<i>R. crispus</i>	++	late	3	+	+	12
<i>G. aparine</i>	++	late	3	+	+	12
<i>C. pycnocephalus</i>	++	late	3	0	+	7
<i>Crepis sp.</i>	+	early	4	+	+	11
<i>S. irio</i>	+	early	4	+	+	7
<i>Sonchus sp.</i>	+	early	4	0	+	10
<i>M. sativa</i>	+	early	3	0	+	4
<i>D. pentaphyllum</i>	+	late	2	+	+	7

Acknowledgements

This research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Project AGL2016-77373-C2-1-R & PID2019-107030RB-C21) and the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. BECAL-PY funded the PhD grant of C. Denis. We are in debt to the colleagues who helped with insect identification: namely, Dr. Valmir Antonio Costa (Instituto Biológico of Campinas, Brazil) for identifying parasitoids to the

family level; Dr. Yahana Aparicio (IRTA, Spain) for identification of Aphidiinae species; and Dr. Alfredo Lacasa (IMIDA, Spain) for identification of Aeolothripidae species. We also wish to express our gratitude to our colleagues in IRTA: Dr. Oscar Alomar for reviewing an early version of the manuscript and Pili Hernández and Victor Muñoz for their technical support.



4. Capítulo 2

**Effect of *Lobularia maritima* on the natural enemies of
Tuta absoluta, *Macrolophus pygmaeus* and *Necremnus
tutae***

4.1 Introduction

Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) is one of the main pests threatening tomato production worldwide (Biondi et al., 2018; Desneux et al., 2010). Since it was first detected in the Mediterranean, it has been the subject of intensive research to reduce the impact of its damage in the field. Among the control strategies for this Lepidoptera that have been under study, biological control with indigenous natural enemies has been focusing many efforts (Urbaneja et al., 2012; Zappalà et al., 2013; Biondi et al., 2013; Mansour et al., 2018). In the Mediterranean, biological control of the pest has long been based on the use of mirid bug predators, namely *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) and *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae). Both are generalist predators that feed mostly on eggs and in much lower numbers on first instar larvae (Arnó et al., 2009; Urbaneja et al., 2009). These authors reported that the number of predated *T. absoluta* larvae is less than one larva per day from the second instar onward. Therefore, several authors have pointed out the possibility of combining the use of mirid predators with other natural enemies, such as Hymenoptera larval parasitoids, to extend the control over more stages of pest development (Urbaneja et al., 2012). Among parasitoids, is native to the Mediterranean region and has been reported to be the most abundant and widespread in the area (Gebiola et al., 2015). It prefers to parasitize second to fourth instar larvae and can also produce additional mortality by host-feeding (Calvo et al., 2013; Chailleux et al., 2014a, Bodino et al., 2019).

Intraguild predation (IGP) occurs when two or more natural enemies compete for the same resource or when they feed on each other (Polis et al., 1989; Rosenheim et al., 1995). Although parasitoids and mirid predators do not prefer the same stages of *T. absoluta* to parasitize and feed (see references above), the IGP between them has already been documented (Naselli et al., 2017; Chailleux et al., 2014b). Both papers reported

kleptoparasitism or predator feeding on already parasitized *T. absoluta* larvae, and thus stealing the resource for the development to adults of *N. tutae*, *Stenomesus* sp. nr. *japonicus* (Ashmead) Hymenoptera: Eulophidae: and *Bracon nigricans* Szépligeti (Hymenoptera: Braconidae). Additionally, *N. tutae* might be and intraguild prey for these heteropteran predators. Naselli et al. (2017) demonstrated that *N. tenuis* was able to directly feed on the larvae of this parasitoid and of another *T. absoluta* larval parasitoid, *B. nigricans*. In contrast, Chailleux et al. (2014b) recorded no direct attack of *M. pygmaeus* on immatures of *Stenomesus japonicus* Ashmead (Hymenoptera: Eulophidae) when parasitizing *T. absoluta* larvae.

Conservation biological control (CBC) has been acknowledged as a useful strategy to control pests in different agrosystems (Landis et al., 2000; Eilenberg et al., 2001). CBC aim is to enhance natural enemy population and/or impact on pest control by providing beneficials with refuge, alternative preys and host, and/or with plant provided food such as nectar and pollen. Presence of plant derived food has been demonstrated to boost longevity, reproduction and foraging behavior of predators and parasitoids (Jervis et al., 2004). To date, several studies have demonstrated that *N. tutae* may benefit from feeding on flowers. Balzan and Wäckers (2013) and Arnó et al. (2018a) reported an increase in the longevity of the females when feeding on floral nectar of some flowers and the pest was not available. Similarly, flower availability has demonstrated to have a positive impact on reproduction of *N. tutae* (Arnó et al., 2018a). Plant derived foods are also advantageous for mirid bugs. *Macrolophus pygmaeus* can complete its development in the absence of prey by feeding on pollen (Perdikis and Lykouressis 2000; Lykouressis et al., 2014) and its reproduction is enhanced when feeding on extrafloral nectar Portillo et al. (2012).

Among plant species, *Lobularia maritima* (L.) Dev. (Brassicaceae) has been the subject of various studies that demonstrated its attraction and positive effect on survival and reproduction of several natural enemies (Badenes-Pérez, 2019), including *Necremnus* spp. (Balzan and Wäckers, 2013; Arnó et al. 2018a). It is a perennial herb widely distributed in the Mediterranean basin with a long flowering period (Picó and Retana, 2001).

In this scenario, the aim of our study was to investigate if a flower resource that might benefit the generalist predator *M. pygmaeus* and the specialist parasitoid *N. tutae* has any effect on the enhancement of biological control of *T. absoluta*. In laboratory experiments, we evaluated if the presence of *L. maritima* flowers: a) promotes *M. pygmaeus* predation on *T. absoluta*; b) promotes *N. tutae* parasitism and host-feeding on *T. absoluta* and influences *M. pygmaeus* predation on parasitoid immatures; and c) promotes *N. tutae* foraging behavior and egg load when the pest is available.

4.2 Materials and methods

Laboratory experiments were carried out in controlled conditions at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ RH and long photoperiod (16 hours of light: 8 hours of dark). Insects used in the experiments were initially collected from commercial tomato greenhouses in the Northeast of Spain and reared in climatic chambers at the same conditions. *Tuta absoluta* were reared on tomato plants (cv. Roma; Semillas Fitó), and *N. tutae* were reared on *T. absoluta* tomato infested plants. *Macrolophus pygmaeus* were reared on tobacco plants and fed with *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) eggs. All three rearing were periodically refreshed with individuals collected in the field. *Lobularia maritima* flowers used in the experiment had between 3 to 7 days of flowering and were collected from plants grown in pots in a greenhouse.

Effect of *L. maritima* flowers on *T. absoluta* predation by *M. pygmaeus*

Healthy tomato leaflets (same variety used to rear *T. absoluta*) were isolated in plastic cages (11 cm high x 9 cm diameter; 350 cm³ in capacity) with top ventilation and a small hole at the bottom to insert the petiole. To keep turgor, the end of the petiole was sticking out of the cage and submerged in water. When required, floral nectar was supplied using an inflorescence of *L. maritima* (approximately 40 open flowers) in an Eppendorf tube with water. Each tomato leaflet was infested with 10 second- to third-instar *T. absoluta* larvae using a fine paintbrush. After 2 h, when the larvae had penetrated the leaf, a *M. pygmaeus* female (7 days-old) fasted for the previous 24 h was released and kept in the cage for 24 h. After removing the mirid bug predator, all galleries were carefully dissected under a stereomicroscope, and the number of live and dead *T. absoluta* larvae recorder. Fifteen replicates were carried out with and without *L. maritima*. In addition, 15 replicates were made with *T. absoluta* but without the predator as a control treatment.

Effect of *L. maritima* on *N. tutae* parasitism of *T. absoluta* and on predation of *M. pygmaeus* on *N. tutae* immatures.

The experiment was conducted using the same setup as explained above. In this case, a couple of 1 to 10 days-old *N. tutae* (previously fasted for 24 h) was introduced in the cages for 48 h and removed before releasing a *M. pygmaeus* (just female) that remained 24 h in the cages. Were tested four different combinations: *N. tutae* with and without *L. maritima* flowers and with and without *M. pygmaeus* female. After removing the mirid bug predator, all galleries were carefully dissected under a stereomicroscope, and the number of live, dead and parasitized *T. absoluta* larvae were recorded. Fifteen replicates were made for each four-combination mentioned above. The offspring of *N. tutae*

emerged in the presence and absence of *M. pygmaeus* with and without *L. maritima* flowers was also recorded.

Effect of *L. maritima* on the host-feeding/host-killing behaviour and the egg load of *N. tutae*.

A microcosm experiment was conducted in larger arenas using Bugdorm cages (MegaView Science Education Services Co., Ltd., Taichung, Taiwan) (47.5 x 47.5 x 47.5 cm) to evaluate the influence of *L. maritima* flowers on the parasitism and host-killing/host-feeding activity of *N. tutae*. In each cage, 20 tomato seedlings (*cv.* Pometa, Planters Rovira) with two to three leaves were evenly distributed. Ten second- to third-instar *T. absoluta* larvae were carefully transferred with a fine paint brush to 10 of the seedlings (1 larva/seedling) that were alternate with 10 seedlings receiving no *T. absoluta* larvae. A bunch of *L. maritima* (150 to 200 open flowers) was put in a 50 ml pot containing water, and the surface sealed with cotton and kitchen plastic wrap to avoid contact of the insect with the water. These flowers were introduced in half of the cages resulting in two treatments (cages with and without *L. maritima* flowers). A couple of 1 to 5 days-old *N. tutae* adults previously fasted for 24 hours with only water was introduced in each cage without *L. maritima*, whereas a couple of the same age but kept for the last 24 hours with access to *L. maritima* flowers was released in each cage that had the bunch of *L. maritima* flowers. Parasitoids were kept for 48 hours. All females of *N. tutae* that were recovered alive at the end of the experiment were frozen (-20°C) until dissection to quantify the number of mature oocytes inside the abdomen (Arnó et al., 2018a). All the galleries were carefully inspected under a stereomicroscope, and the number of live, dead and parasitized larvae of *T. absoluta* was recorded. All plant material

was kept in aerated cages until the emergence of parasitoid adults, that were counted. Eighteen replicates were conducted for each treatment.

Statistical analysis

A generalized linear model (GLM) with Poisson distribution and logarithmic link function was used to test the effect of *L. maritima* flowers on the predation of *T. absoluta* larvae by *M. pygmaeus*, the joint activity of the parasitoid *N. tutae* and the predator *M. pygmaeus* on *T. absoluta* larvae and the predation of *M. pygmaeus* on immature stages of the parasitoid. We also evaluated the effect of *L. maritima* flowers on the *N. tutae* egg load and the mortality of *T. absoluta* larvae by *N. tutae* (killed or parasitized). The data analysis was performed with the JMP statistical program. Version 14.2.0. The presence of *L. maritima*, predators and parasitoids were each considered as an independent factor.

4.3 Results

Effect of *L. maritima* flowers on *T. absoluta* predation by *M. pygmaeus*

The number of dead *T. absoluta* larvae in the control cages without predators was low (0.07 in average). Mortality of larvae significantly increased with the presence of the predator, although remaining at low rates (less than 1 larvae in average) but was not different in cages with and without *L. maritima* ($\chi^2 = 9.94$; $p = 0.0069$) (**Fig. 1**).

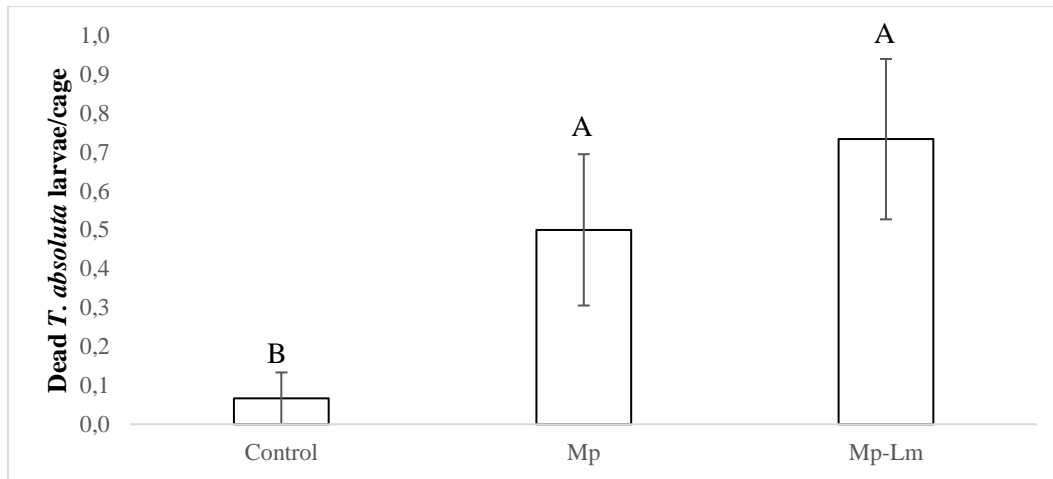


Figure 1. Number of dead *T. absoluta* larvae (mean \pm standard error) in cages with the predator *M. pygmaeus* (Mp) and without (Control) in presence and absence of *L. maritima* (Lm). Different letters above the bars indicate significant differences between the treatments ($p < 0.05$).

Effect of *L. maritima* flowers on *T. absoluta* control by *N. tutae* and *M. pygmaeus*

The number of dead *T. absoluta* larvae (**Fig. 2**) was not affected neither by the presence of the predator *M. pygmaeus* ($\chi^2 = 3.378$; $p = 0.0661$) nor by the availability of *L. maritima* flowers ($\chi^2 = 0.984$; $p = 0.3212$). The interaction between both factors was also non-significant ($\chi^2 = 0.240$; $p = 0.6240$). Similarly, the number of parasitized larvae was not significantly affected either by the presence of the predator *M. pygmaeus* ($\chi^2 = 3.6098$; $p = 0.0574$) or by the availability of *L. maritima* flowers ($\chi^2 = 0.1054$; $p = 0.7454$) (**Fig. 2**). The interaction between both factors was also not significant ($\chi^2 = 0.4894$; $p = 0.4842$).

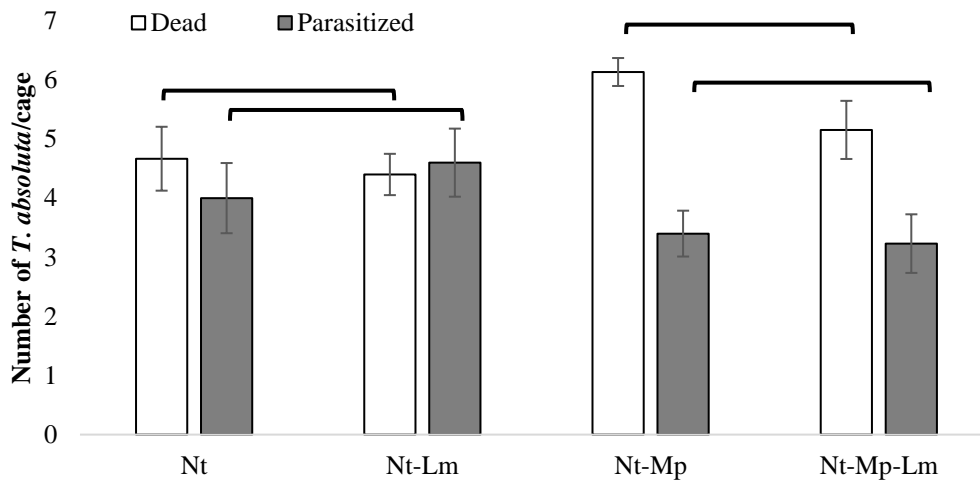


Figure 2. Number of dead and parasitized *T. absoluta* larvae (mean \pm standard error) when lepidoptera larvae were exposed to the parasitoid *N. tutae* (Nt) and to the predator *M. pygmaeus* (Mp) in cages with and without *L. maritima* flowers (Lm). Treatments with (*) are differing significantly ($p < 0.05$).

Presence of *M. pygmaeus* significantly reduced the number of parasitoid's offspring per cage ($\chi^2 = 6.4689$; $p = 0.0110$) from 4.83 ± 0.64 to 3.50 ± 0.47 (**Fig. 3**). No significant differences were found in the progeny related to the presence of *L. maritima* flowers ($\chi^2 = 0.038$; $p = 0.8540$). Likewise, the interaction between the two factors (predator and flowers) was not significant either ($\chi^2 = 2.4010$; $p = 0.1213$).

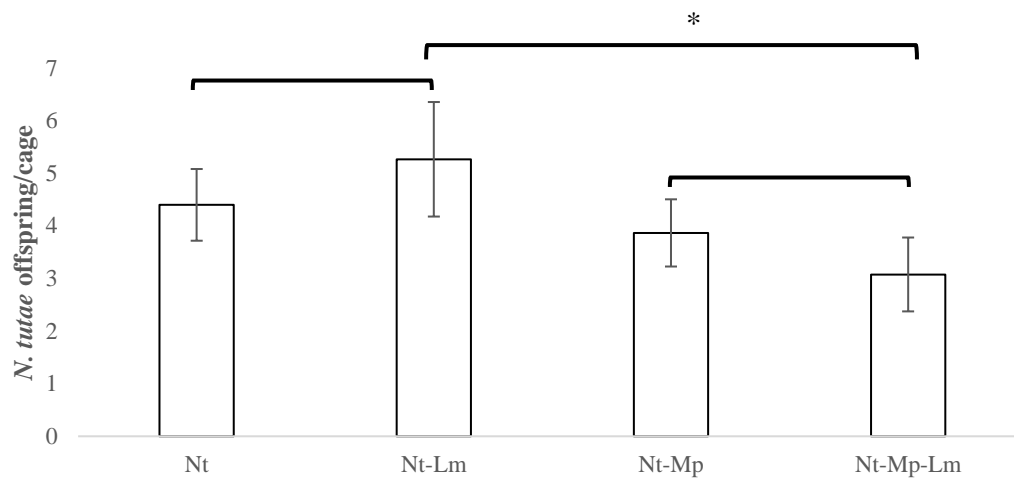


Figure 3. *Necremnus tutae* offspring (mean \pm standard error) when lepidoptera larvae were exposed to the parasitoid *N. tutae* (Nt) and to the predator *M. pygmaeus* (Mp) in microcosm with and without *L. maritima* flowers (Lm). Treatments with (*) are differing significantly ($p < 0.05$).

Effect of *L. maritima* on the host-feeding/host-killing behaviour and the egg load of *N. tutae*.

In the microcosm experiment, survival of *N. tutae* females after 48 hours was significantly lower in cages without flowers than in cages with *L. maritima* ($\chi^2 = 5.7755$; $p = 0.0163$) (**Table 1**). As can be observed, *T. absoluta* mortality in control cages without the parasitoid was low (< 0.5 larvae) and increased with the presence of the parasitoid ($\chi^2 = 51.0021$; $p < 0.0001$). However, no significant differences were found between the number of dead *T. absoluta* larvae in cages with and without *L. maritima*. Similarly, no significant differences were found between number of *T. absoluta* larvae found parasitized in cages with and without the presence of flowers ($\chi^2 = 0.0256$; $p = 0.8728$), nor in the *N. tutae* offspring recorded in each cage ($\chi^2 = 0.9034$; $p = 0.3419$). Egg-load of

surviving *N. tutae* females was significantly higher in those recovered from cages with *L. maritima* than in the cages that had no flowers ($\chi^2 = 14.6160$; $p = 0.0001$).

Table 1. Percentage of *N. tutae* (Nt) female surviving at the end of the experiment and number (mean \pm standard error) of dead and parasitized *T. absoluta* (Ta) larvae, *N. tutae* descendants per cage, and egg-load of *N. tutae* surviving females in microcosm cages with and without *L. maritima* flowers (Lm). Different letters within a column indicate significant differences between the treatments ($p < 0.05$).

Treatments	% <i>N. tutae</i> survival	<i>T. absoluta</i> dead	<i>T. absoluta</i> parasitized	<i>N. tutae</i> descendants	<i>N. tutae</i> Egg-load
Ta	-	0.44 \pm 0.18b	-	-	-
Ta-Nt	38.89 \pm 0.12b	3.22 \pm 0.49a	1.06 \pm 0.37a	0.94 \pm 0.31a	2.67 \pm 0.89b
Ta-Nt-Lm	77.78 \pm 0.10a	3.11 \pm 0.41a	1.11 \pm 0.40a	1.28 \pm 0.60a	5.17 \pm 0.67a

4.4 Discussion

In our first experiment done in small cages, the predation of *T. absoluta* larvae was the same whether they received or not *L. maritima* flowers as an alternative food source. Our results coincide with Arnó et al. (2009) and Urbaneja et al. (2009), who reported a similar number of *T. absoluta* L2-L3 larvae predated by *M. pygmaeus*, of 0.5 to 1 larva in 24 h. *Macrolophus pygmaeus* prefers to prey on eggs of *T. absoluta* than on larvae due to the concealment of the pest within the gallery (Ingegno et al., 2019). In our experiment, the presence of *L. maritima* flowers did not directly influence the number of *T. absoluta* killed by the predator. However, when prey is absent or scarce, the availability of plant-derived food may enhance *M. pygmaeus* fitness. Perdakis and Lykouressis, 2000 reports that 83% of *M. pygmaeus* nymphs fed only pollen from *Ecbalium elaterium* L. (Cucurbitaceae) completed their development. The availability of pollen helps the predator *M. pygmaeus* to develop faster, improving its biological control efficiency in horticultural crops. On the other hand, Portillo et al. (2012) demonstrated the importance of extrafloral nectar for the

reproduction of *M. pygmaeus*. These authors observed a higher proportion of fertile females when they received extrafloral nectar from *Vicia haba* L. (Fabaceae) than when they did not. Urbaneja-Bernat et al. (2015) also demonstrated the benefit of sugar (sucrose) added to the diet of *E. kuehniella*, which improved the fertility of *N. tenuis*.

On the other hand, we did not observe an important additive effect of *M. pygmaeus* on the mortality of *T. absoluta* larvae when it was released in cages where *N. tutae* was present, regardless of the provision of another alternative food source (*L. maritima*). Similarly, Chailleux et al. (2014b) and Naselli et al. (2017) reported no additive effect on the control of *T. absoluta* under the predator-parasitoid association *M. pygmaeus* and *S. japonicus* and *N. tenuis* association with *N. tutae* and *B. nigricans*.

The number of dead *T. absoluta* larvae by host feeding/host killing is important (Calvo et al., 2013; Ferracini et al., 2012; Calvo et al., 2016). *Necremnus tutae* killed 4.5 *T. absoluta* larvae in 48 h and parasitized the same number of larvae. In addition, mortality by host feeding/host killing did not increase in the presence of *L. maritima* flowers. However, Arnó et al. (2018a) showed that feeding *N. tutae* with *L. maritima* improved the parasitoid fitness. Although we did not observe important significant differences, when *M. pygmaeus* was released together with the parasitoid, the predator fed on one larva of the pest.

The offspring of *N. tutae* were affected by the presence of *M. pygmaeus*. We found that fewer adults emerged in cages where the predator was present. Similarly, Naselli et al. (2017) reported that *N. tenuis* affected *N. tutae* and *B. nigricans* offspring, and Chailleux et al. (2014b) observed the negative effects of *M. pygmaeus* on immature stages of the eulophid *S. japonicus*. The impact of predators may be more significant in parasitized than in non-parasitized hosts (Rosenheim et al., 1995). Possibly mirids, attracted by *T.*

absoluta larvae in decomposition (Chailleux et al., 2014b; Naselli et al., 2017), fed on parasitized larvae, leaving *N. tutae* larvae without food (kleptoparasitism). Desneux et al. (2011b), Chailleux et al. (2013) also reported intragremial predation of *M. pygmaeus* on eggs of *T. absoluta* parasitized by *Trichogramma achaeae* Nagaraja & Nagarkatti (Hymenoptera: Trichogrammatidae).

In the microcosm experiment, we observed 78% survival of females provided with *L. maritima* flowers compared to a 39% survival when provided with only water. This agrees with findings of other authors that reported the positive effect of feeding on non-host resources as nectar in parasitoid survival (Balzan and Wäckers 2013 and Arnó et al., 2018a). However, being a synovigenic parasitoid, *N. tutae* requires additional protein for egg production (Hanson and Gauld, 2006) that obtains when feeding on the hemolymph of its host (Godfray, 1994; Ferracini et al., 2012; Calvo et al., 2016; Bodino et al., 2019). We have observed that the presence of flowers did not influence *N. tutae* searching ability in the small cages or the microcosm experiments since number of parasitized and dead larvae were similar in cages with and without *L. maritima*. Nonetheless, many hymenopteran parasitoids rely exclusively on nectar or other sugar sources to meet their energy needs (Wäckers and van Rijn, 2012), but idiobiont and synovigenic parasitoids such as *N. tutae* (Hanson and Gauld, 2006) feed on host hemolymph to obtain protein and lipids but is poor in carbohydrates, so a flower nectar diet is still important for energy (Wäckers and van Rijn, 2012). Parasitoids take advantage of flower nectar not only for energy. The longevity and fecundity of Hymenopterans are determined by the source of sugar they receive in their diets. In this sense, Arnó et al. (2018a), Irvin et al. (2006), Tompkins et al. (2010) and Chen et al. (2020) demonstrated the influence of feeding with *L. maritima* nectar in the longevity of the parasitoids *N. tutae*, *Diadegma semiclausum* (Hellén) (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Dolichogenidea tasmanica* (Cameron)

(Hymenoptera: Braconidae) and *Cotesia vestalis* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae). Our results also confirm that the supply of nectar with *L. maritima* flowers influences the fertility of *N. tutae*. In the present study, *N. tutae* had a higher number of oocytes in females fed with *L. maritima* flowers compared to females that only fed on the host. This result could indicate that in long term, the offspring and longevity of the parasitoid will be greater in the presence of *L. maritima*, favouring the biological control of *T. absoluta*. The *T. absoluta* mortality, including parasitism and host-feeding/host-killing observed in cages (90%) concerning microcosm (40%) suggests that *N. tutae* exploits more the patches where there was a greater concentration of larvae, as pointed out by Roland and Taylor (1997) that demonstrated that, in general, parasitism is higher in areas with high host density. In the small cages of 350 cm³ volume, all the larvae were on a single leaf of 14 cm² while in microcosm, the conditions to locate the host were more extreme (cage of 104 l and approximately 252 cm² foliar surface). Therefore, in the microcosm experiment, the parasitoid had to search more intensively to locate the host. There are several factors that influence the searching behaviour of the parasitoid: host distribution, abundance, and host quality for oviposition (Godfray, 1994; Roland and Taylor, 1997; Xiaoy and Zhongqi, 2008). Leaf miner insects leave a visual trail of their foraging activities that serve as a guide for parasitoids to locate the host. In the cages, the larvae were concentrated on a single leaflet, making it easier for the parasitoid to locate many larvae in a short time. Since the vibration of the substrate also allows the parasitoids to locate their host hidden, it is possible that in the microcosm experiment where the larvae were scattered in several leaflets, the female could have more complications to locating additional hosts (Godfray, 1994; Xiaoy and Zhongqi, 2008) at the same time. In summary, the results obtained in our study indicate that *M. pygmaeus* does not negatively affect the development of *N. tutae* and that the parasitoid would benefit in the

long term from the presence of *L. maritima* flowers in terms of survival and reproduction. Therefore, a management system based on biological control conservation in tomato crops is recommended, incorporating both *L. maritima* and *C. officinalis* flowers in the margins of the crop, since it has been demonstrated that *L. maritima* favours parasitoids and *C. officinalis* is effective for the colonization and conservation of predatory mirids (Agustí et al., 2020; Ardanuy et al., 2021). This management system will benefit the biological control of *T. absoluta* and other pests that affect tomato crops.



5. Capítulo 3

**Influencia de un margen floral de *Lobularia maritima*
en la abundancia de los enemigos naturales de *Tuta*
absoluta en el cultivo de tomate**

5.1 Introducción

La mayoría de los problemas asociados a plagas de insectos en los agroecosistemas están relacionados con la pérdida de la diversidad local del hábitat que afecta a la abundancia y eficiencia de sus enemigos naturales. El papel del control biológico por conservación (CBC) promoviendo la presencia de enemigos naturales autóctonos es clave para el manejo de plagas que atacan un cultivo e implica la manipulación del hábitat para proveer a los enemigos naturales con presas, polen, néctar, refugio, sitios de anidación e hibernación (Altieri y Letourneau, 1982; Landis et al., 2000; Begg et al., 2017). La diversificación de las plantas en los agroecosistemas agrícolas, mediante la incorporación de bandas florales, puede generar mayores oportunidades ambientales para los enemigos naturales y, en consecuencia, un mejor control biológico de las plagas (Altieri y Letourneau, 1982; Corbett y Rosenheim, 1996; He et al., 2021). Además, para que el CBC funcione correctamente, debe producirse una reducción en las cargas de toxicidad química que permitan la supervivencia y desarrollo de los enemigos naturales (Thomson y Hoffman, 2006). Un mayor control de plagas como consecuencia de la acción de los enemigos naturales se traducirá, a su vez, en una reducción de la aplicación de insecticidas, y esto tendrá efectos beneficiosos en cascada sobre otros enemigos naturales, la biodiversidad en general y el medio ambiente (Balmer et al., 2013). De esta forma, un ecosistema agrícola puede proporcionar los servicios ecosistémicos suficientes para el control de plagas, con diversidad de enemigos naturales, y la polinización, que garantizarán la productividad de los cultivos (Balzan, 2017; Westphal et al., 2015). Sin embargo, muchos de los enemigos naturales, principalmente los parasitoides y los depredadores como los sírfidos, dependen estrictamente de los recursos florales en la etapa adulta y sólo pueden alcanzar su máximo potencial biológico cuando tienen fuentes de azúcar adecuadas a su disposición (Wäckers, 2004; Berndt et al., 2002). Además,

muchos Anthocoridae, Chrysopidae y Coccinellidae, dependen del polen y el néctar floral cuando las presas son escasas (Lundgren, 2009). El aprovechamiento del néctar por los enemigos naturales produce un aumento en el parasitismo y depredación de los herbívoros en los monocultivos agrícolas (Balmer et al., 2013).

Numerosos trabajos reportaron la importancia de la utilización de márgenes florales dentro del sistema agrícola. Los enemigos naturales se trasladan desde los márgenes del campo a los cultivos durante los períodos de abundancia de presas, mientras que otros se dispersan al azar en busca de presas utilizando los márgenes como refugios permanentes (Ingrao et al., 2017). Para conformar un margen se han de seleccionar plantas que favorezcan la abundancia de los parasitoides y depredadores deseados y no sean atractivas a plagas potenciales (Balmer et al., 2013; Harvey y Wagenaar, 2006). En este sentido, Balzan y Moonen (2013), observaron que la siembra de flores de *Fagopyrum esculentum* Moench (Polygonaceae), *Phaseolus vulgaris* L. y *Vicia villosa* Roth (Fabaceae), *Coriandrum sativum* L. y *Foeniculum vulgare* Mill (Apiaceae) y *Borago officinalis* L. (Boraginaceae) en los márgenes de campos de tomate incrementó en la tasa de parasitismo y redujo el daño foliar causado por *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) y otras plagas de la familia Noctuidae en las parcelas adyacentes a franjas florales. Por su lado, Haseeb et al. (2018) reportaron que diferentes cultivares de *Lobularia maritima* L. (Brassicaceae) sembrados en las proximidades del cultivo de tomate favorecieron la abundancia de importantes depredadores que atacan a *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae). Balzan (2017), Agustí et al. (2020) y Ardanuy et al. (2021) han demostrado que la utilización de un margen floral sembrado con flores de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) favoreció la abundancia de los depredadores (Dicyphini) y otros grupos importantes de enemigos naturales que atacan a *T. absoluta* en tomate. Además, Balzan et al. (2016) y Ardanuy et al. (2021) estudiaron la composición de la

vegetación espontánea en los márgenes de los campos de tomates y demostraron que la biodiversidad de plantas no cultivadas presentes también alberga a importantes grupos de enemigos naturales que contribuyen a la supresión de plagas de *T. absoluta* y otros lepidópteros de la familia Noctuidae en el cultivo.

En Europa, el CBC de *T. absoluta* ha demostrado ser alentador (Desneux et al., 2010; Biondi et al., 2013; Gabarra et al., 2014; Biondi et al., 2018). Entre los depredadores generalistas, los míridos *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) y *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae) se establecen naturalmente en los cultivos de tomate y han mostrado ser eficaces depredadores de huevos, aunque también depredan larvas de la plaga (Urbaneja et al., 2012). Por lo que respecta a los parasitoides, hasta la fecha, se ha registrado un número importante de parasitoides de la familia Eulophidae, Braconidae, Ichneumonidae, Trichogrammatidae, Encyrtidae y Pteromalidae (Biondi et al., 2018). De entre estas familias, los eulófidos son los más abundantes parasitando larvas de *T. absoluta* (Gabarra et al., 2014; Gebiola et al., 2015). Se trata de ectoparasitoides con diversas especies detectadas sobre la plaga, destacando entre ellas *Necremnus tutae* Ribes & Bernardo (Hymenoptera: Eulophidae). Entre las estrategias para promover el CBC, la incorporación de márgenes florales en las proximidades de los cultivos permitiría a los enemigos naturales instalarse antes de la llegada de la plaga en los cultivos. *Lobularia maritima* es una planta ampliamente utilizada en diferentes agroecosistemas, florece prácticamente durante todo el año y atrae a un gran número de enemigos naturales (Haseeb et al., 2018). Por consiguiente, la incorporación de infraestructuras ecológicas constituidas por flores de *L. maritima* para atraer a los enemigos naturales de las plagas asociadas a *T. absoluta* en tomate, podría promover la presencia de sus enemigos naturales y reducir la aplicación de productos insecticidas dentro de los cultivos hortícolas. Teniendo en cuenta los aspectos arriba mencionados, nuestros objetivos se

enfocaron en: evaluar si la presencia de un margen de *L. maritima* sembrado adyacente a un cultivo de tomate, favorece la abundancia de los enemigos naturales asociados al control biológico de *T. absoluta* y determinar si la presencia de *T. absoluta* en el cultivo se ve influenciada por la proximidad de un margen floral de *L. maritima*.

5.2 Materiales y métodos

Se realizaron dos experimentos diferentes en los años 2018 y 2019 en campos de tomate al aire libre localizados en la comarca del Maresme, Cataluña, España.

Muestreos en campos comerciales con y sin margen de *L. marítima*.

En 2018, los trabajos se desarrollaron en seis campos comerciales de entre 1400 y 4000 m², en tres de los cuales se instaló un margen de *L. maritima* de entre 15 y 50 m de longitud y 0.3 a 0.8 m de ancho en uno de los lados del campo, mientras que los otros tres campos no tenían el margen de *L. maritima*. En estos campos se aplicaba un programa de Manejo Integrado de Plagas (MIP) basado en la conservación de míridos depredadores (Arnó et al., 2018b). Las especies que habitualmente colonizan los cultivos de tomate en la zona son *M. pygmaeus* y *N. tenuis*. Se realizaron 3 tipos de muestreos distintos entre julio y septiembre (semanas 29 y 39 del año). En primer lugar, en las semanas 29, 32, 35 y 39 y con el objetivo de evaluar el nivel de *T. absoluta* en el cultivo y el parasitismo sobre larvas de la plaga, se recolectaron aleatoriamente un máximo de 25 folíolos con galerías de *T. absoluta* durante no más de 20 minutos. En el caso de que los 25 folíolos fueran recolectados en un tiempo menor a los 20 minutos, se detuvo la recolección y se registró el tiempo invertido. Los folíolos de tomate seleccionados debían tener galerías lo suficientemente grandes como para albergar una larva de la polilla del segundo al tercer estadio. Los folíolos recolectados se llevaron al laboratorio donde se inspeccionaron bajo una lupa binocular registrándose por separado el número de larvas vivas (que se movían

cuando se tocaban ligeramente con un pincel), larvas muertas sin signos de ectoparasitoides y larvas ectoparasitadas con huevos o larvas de ectoparasitoide presentes en la galería. Todos los foliolos que tenían larvas de la plaga vivas o muertas, pero sin huevos ni larvas de parasitoides fueron descartados y sólo se mantuvieron larvas parasitadas que se guardaron en vasos de plástico cubiertos con una malla fina para recuperar los adultos ectoparasitoides. Los parasitoides emergidos fueron colectados y preservados en alcohol al 70% para su posterior identificación a nivel de especie, siempre que fuese posible. Para ello se utilizaron las claves de Grissell y Schauff (1990) y Hanson y Gauld (2006) para la identificación a nivel de familia. Los parasitoides de la familia Eulophidae se identificaron a nivel de género mediante las claves taxonómicas de Askew (1968) y para la identificación de la especie *Necremnus* se utilizó la clave taxonómica de Gebiola et al. (2015).

El segundo método de muestreo consistió en la colocación de cuatro trampas adhesivas transparentes en forma de cilindro. El objetivo fue monitorear himenópteros parasitoides y varias familias de depredadores con interés en el control biológico de *T. absoluta*, tales como Miridae, Anthocoridae, Coccinellidae y Chrysopidae. Las trampas cilíndricas se prepararon a partir de papel acetato y se rociaron con cola entomológica en aerosol (Souverode, Plant.Print Diagnostics S.L.). La superficie adhesiva constó de una porción de 26,5 x 16,5 cm. Cada cilindro se fijó a una caña de bambú de aproximadamente 1 m de altura y las cuatro trampas se distribuyeron en el interior del cultivo en una única fila separadas por distancias de entre 3 y 6 m. Las trampas adhesivas se colocaron en el campo en las semanas 29, 32 y 35 y se retiraron una semana más tarde.

El tercer método de muestreo consistió en la utilización de plantas centinela infestadas *ad hoc* con *T. absoluta*. En las semanas 29, 32, 35 y 39, se colocaron cuatro plantas centinela dentro del cultivo en una única hilera de forma similar a las trampas adhesivas.

Se trataba de plantas de tomate (aproximadamente 50 cm de altura) en macetas que se mantenían durante siete días en una jaula aireada (60 cm x 75 cm x 100 cm) con adultos de *T. absoluta*, en una cámara climática a 25°C. Una vez retirados los adultos, las plantas se mantuvieron en las jaulas en la cámara climática durante una semana más para obtener larvas de segundo a tercer estadio de *T. absoluta*. Luego, las plantas se encerraron en una manga (50 cm x 30 cm) hecha de la red fina (7x8 hilos / cm²) seleccionada para permitir la entrada de parasitoides, evitar la salida de adultos de *T. absoluta* y la colonización de míridos depredadores. Para evitar la desecación de las plantas, estas se colocaron en macetas más grandes llenas de agua. Las macetas exteriores se rociaron con cola para atrapar insectos y evitar que las hormigas y otros depredadores del suelo trepan por la planta. Las plantas centinela permanecieron en los campos durante siete días. Pasado ese tiempo, se recolectaron y se llevaron al laboratorio donde se procesaron debajo de la lupa binocular con el mismo método que las muestras de folíolos colectadas en el cultivo.

Para caracterizar el posible impacto de la toxicidad de los pesticidas aplicados durante el cultivo sobre los enemigos naturales de *T. absoluta*, se calculó un índice de toxicidad para insecticidas (ITI), uno para fungicidas (ITF) y uno para las aplicaciones de azufre (ITA). Para ello, se obtuvo el registro de todas las materias activas (m.a.) insecticidas y fungicidas utilizados en cada campo, así como los tratamientos con azufre y las fechas en que se realizaron las aplicaciones. Cada uno de los tratamientos se asignó a uno de los cuatro periodos consecutivos de tiempo que quedaban limitados por la fecha en que retiraron las plantas centinela del campo y que se designaron con una letra (AD). El periodo A va desde el trasplante hasta el día que se retiró el primer lote de plantas centinela (semana 29), el periodo B desde el día después de retirar el primer lote de plantas centinela hasta el día que se retiró el segundo lote de plantas centinela (semana 32), el periodo C desde la semana 32 hasta la 35 y el periodo D incluye los tratamientos

realizados desde la semana 35 hasta el final del cultivo. Para calcular el índice se utilizaron los valores de toxicidad y persistencia recopilados en las bases de datos sobre el efecto secundario de los plaguicidas de las empresas Koppert, Agrobío y Biobest. Para calcular los ITI, ITF e ITA, se usaron los valores promedio de toxicidad para *Macrolophus pygmaeus* y *Nesidiocoris tenuis*, en el caso de los míridos, y para *Diglyphus isaea* (Walker) Hymenoptera: Eulophidae, *Aphidius* spp. o *A. colemani* y *Trichogramma* spp., en el caso de los parasitoides (tomando en cuenta las toxicidades). Cuando los valores de toxicidad y persistencia en las diferentes bases de datos diferían para más de un estado de desarrollo del insecto o entre las diferentes bases de datos, se escogió el valor más alto para cada especie. La falta de información en estas bases de datos se completó hasta donde se pudo con información científica publicada. Para muchas m.a. fungicidas no se encontró información, y en este caso se le adjudicó el valor promedio de los datos disponibles de otras m.a. (0.2 para míridos y 0.4 para parasitoides). Los índices ITI, ITF e ITA se calculan sumando para cada periodo el número de tratamientos realizados con cada materia activa multiplicado por su valor de toxicidad. Si la persistencia del pesticida se extendía a los siguientes periodos en que se dividió el cultivo, se consideró como una aplicación más en el cálculo del índice. Siguiendo el criterio de Thomson y Hofmann (2006), a los valores del índice le restamos 1, para asegurar que las sustancias químicas de clasificación 1 que no tiene efectos negativos detectables sobre los enemigos naturales, no influyera en la puntuación general. La Tabla 1 recoge los valores de ITI, ITF e ITA para cada campo y cada periodo y para los dos grupos de enemigos naturales considerados, míridos y parasitoides.

Tabla 1. Se muestra los distintos números de aplicaciones insecticidas, fungicidas y azufre (N° I, N° F, N° A) así como los índices de toxicidad insecticidas (ITI), fungicidas (ITF) y azufre (ITA), calculados para los parasitoides (P) y míridos depredadores (M), durante 4 periodos de muestreo en los distintos campos (FL, FO, GU, LL, RO, XA). Las filas sombreadas indican un promedio de las aplicaciones realizadas en los campos con margen floral de *L. maritima* (Lm) y control (Con).

Periodo	Campo	Tmt.	N° <i>T. absoluta</i>	N° I	ITI (M)	ITI (P)	N° F	ITF (M)	ITF (P)	N° A	ITA (M)	ITA (P)
A	FL	Lm	6	1	0.0	0.0	0	0.0	0.0	1	3.0	2.3
A	FO	Lm	0	0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0	0.0	0.0
A	GU	Lm	5	2	3.0	2.5	4	0.8	4.2	0	0.0	0.0
A	LL	Con	4	0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0	0.0	0.0
A	RO	Con	12	1	3.0	2.5	0	0.0	0.0	0	0.0	0.0
A	XA	Con	12	1	0.0	0.3	1	0.0	0.3	1	3.0	2.3
B	FL	Lm	4	1	0.0	0.3	1	0.0	0.3	0	0.0	0.0
B	FO	Lm	2	0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	1	2.0	1.5
B	GU	Lm	6	1	3.0	2.8	2	0.4	3.4	1	3.0	2.3
B	LL	Con	12	1	0.0	1.0	0	0.0	0.0	2	3.0	3.0
B	RO	Con	13	2	3.0	0.7	0	0.0	0.0	1	3.0	2.3
B	XA	Con	23	3	0.0	0.7	5	1.8	4.2	1	3.0	2.3
C	FL	Lm	0	1	3.0	2.5	1	0.2	0.3	1	3.0	2.3
C	FO	Lm	6	0	0.0	0.0	1	0.0	0.3	1	0.0	1.5
C	GU	Lm	4	1	3.0	1.0	4	1.4	0.8	1	3.0	2.3
C	LL	Con	6	1	0.0	1.3	0	0.0	0.0	2	2.0	3.0
C	RO	Con	15	2	0.0	0.0	0	0.0	0.0	2	3.0	4.7
C	XA	Con	4	2	0.0	0.0	3	0.2	0.4	1	3.0	2.3
D	FL	Lm	3	7	19.0	11.0	7	2.2	2.3	3	9.0	7.0
D	FO	Lm	0	0	0.0	0.0	2	0.4	3.4	0	0.0	0.0
D	GU	Lm	1	1	3.0	3.0	4	0.6	1.1	1	0.0	2.3
D	LL	Con	13	4	3.0	6.0	0	0.0	0.0	2	2.0	3.0
D	RO	Con	23	6	14.0	9.3	4	0.4	1.1	2	6.0	4.7
D	XA	Con	0	2	0.0	1.0	8	1.8	1.6	3	9.0	7.0
		Lm		1.25±0.55	2.83±1.53	1.93±0.90	2.17±0.63	0.50±0.20	1.36±0.45	0.83±0.24	1.92±0.76	1.80±0.56
		Con		2.08±0.47	1.92±1.16	1.90±0.83	1.75±0.77	0.35±0.20	0.64±0.36	1.42±0.26	3.08±0.70	2.89±0.56

Muestreos en un cultivo experimental de tomate y en un margen de *L. marítima* adyacente.

En 2019, el estudio se desarrolló en un campo de experimentación agrícola de 450 m², que tenía un margen de *L. marítima* en uno de los lados de aproximadamente 10 m de largo y 1 m de ancho. Dentro del cultivo y en el margen en flor se colocaron trampas adhesivas, similares a las descritas anteriormente. Se colocaron una vez al mes entre julio y diciembre siete trampas en el margen y siete dentro del campo. Pasada una semana se recogieron las trampas y se llevaron al laboratorio para cuantificar todos los parasitoides que pertenecían a las familias con especies citadas como parasitoides de *T. absoluta* y los individuos de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* capturados. Todos los insectos se identificaron utilizando una lupa binocular y las claves taxonómicas arriba mencionadas. Todos los parasitoides de *T. absoluta* se identificaron a nivel de género o a nivel de especie siempre que fuese posible. El resto de los himenópteros y depredadores fueron identificados a nivel de familia.

Análisis estadístico

Los datos para cada año de estudio se analizaron por separado utilizando un modelo lineal generalizado de efectos mixtos (GLMM) con una distribución de respuesta binomial negativa (NB) utilizando una función de enlace logarítmico. La variable respuesta consistió en el número de artrópodos presentes en las trampas adhesivas. El número de larvas de *T. absoluta* provenientes de los folíolos colectados durante 20 minutos también se consideró como variable respuesta. La presencia de margen de *L. marítima* (tratamiento) y la ausencia de margen floral (control) fueron los efectos principales fijos. El campo, la semana y la interacción tratamiento × semana fueron los factores aleatorios.

Los artrópodos fueron denominados individuos por trampas adhesivas y las larvas de *T. absoluta* se denominaron conteo de *T. absoluta* por minuto. Se realizaron comparaciones por pares (pruebas post-hoc) utilizando el método de Tukey para comparaciones múltiples. El análisis estadístico se realizó mediante el software R. Versión 3.5.3. (2020), utilizando los paquetes MASS (Venables y Ripley, 2002), medias marginales estimadas (Russell Lenth, 2020) y el paquete de gráficos para el análisis de datos ggplot2 (Wickham, 2016). Para todas las pruebas estadísticas se utilizó un nivel de significancia nominal del 5% ($P < 0.05$) para el estudio.

5.3 Resultados

Muestreos en campos comerciales con y sin margen de *L. marítima*.

Tal y como se observa en la Figura 1, el número de larvas de *T. absoluta* fue significativamente menor en los campos con margen floral que en los campos control sin margen, de forma consistente durante las 4 semanas de muestreo (semana 29: $Z = -2.625$, $p < 0.01$; semana 32: $Z = -4.295$, $p < 0.001$; semana 35: $Z = -2.449$, $p < 0.05$; semana 39: $Z = -4.169$, $p < 0.001$). De forma global, y promediando los valores de los 4 muestreos, en los campos control se registró un valor de 11.41 ± 2.05 larvas de *T. absoluta* por minuto de recolección de foliolos respecto a las 3.08 ± 0.70 larvas por minuto colectadas de campos con margen floral de *L. marítima*.

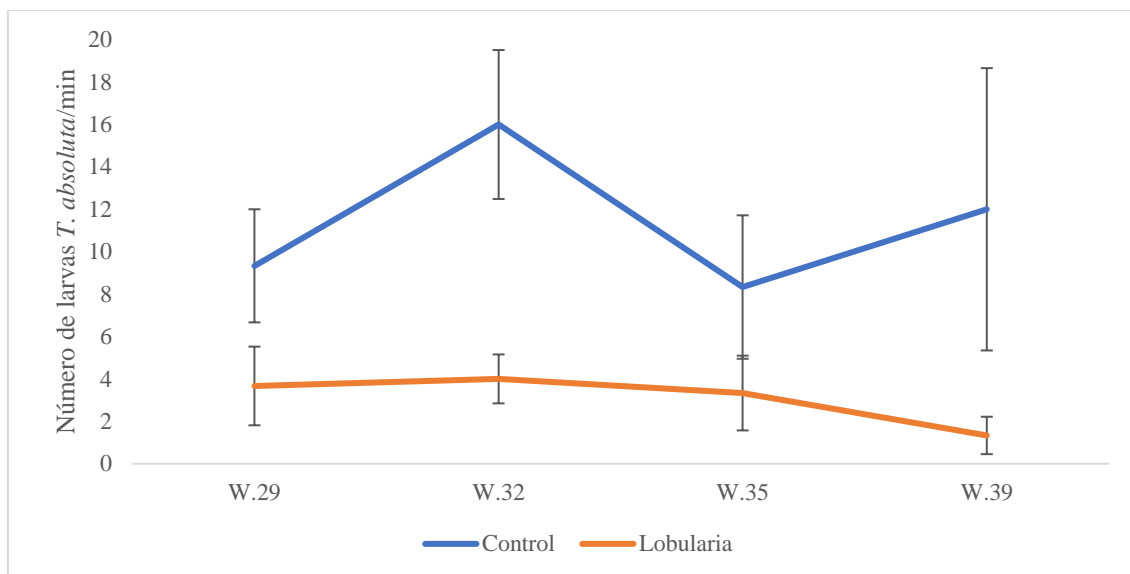


Figura 1. Número de larvas de *T. absoluta* por minuto colectadas de folíolos de tomate con presencia de minas durante 4 semanas de muestreo provenientes de campos con margen de *L. maritima* y campos sin margen (control). En cada muestra el número de folíolos estaba limitado a 25, recolectados durante un máximo de 20 minutos.

En el año 2018 se recolectaron un total de 1876 insectos depredadores potenciales de *T. absoluta* (Miridae, Anthocoridae, Chrysopidae y Coccinellidae) de los campos control sin margen floral respecto a los 2069 individuos depredadores capturados de los campos con margen floral. La presencia del margen de *L. maritima* no tuvo efecto significativo sobre la abundancia de míridos, que fueron los depredadores mayoritarios. Tampoco sobre otros grupos minoritarios como antocóridos y crisopas (Tabla 2).

Tabla 2. Media (\pm error estándar) de los enemigos naturales (insectos/trampa) capturados. Los resultados provienen de 3 trampas adhesivas colocadas durante 3 fechas de muestreo en 3 campos de tomate con un margen floral compuesto de *L. maritima* y sin margen en el año 2018. N=27.

Los valores en negrita indican diferencias significativas.

Orden	Familia	Género	Margen	No Margen	Z	P
PARASITOIDES						
Hymenoptera	Eulophidae Total		3.81 \pm 0.57	3.26 \pm 0.60	0.674	0.500
		<i>Necremnus</i> sp.	1.04 \pm 0.31	1.30 \pm 0.48	0.415	0.678
		<i>Diglyphus</i> sp.	1.59 \pm 0.29	1.00 \pm 0.24	1.580	0.114
		<i>Neochrysocharis</i> sp.	0.37 \pm 0.14	0.00	0.004	0.997
		<i>Elasmus</i> sp.	0.04 \pm 0.04	0.04 \pm 0.04	0.000	1.000
		<i>Pnigalio</i> sp.	0.07 \pm 0.05	0.04 \pm 0.04	0.566	0.571
		<i>Sympiesis</i> sp.	0	0.04 \pm 0.04	0.002	0.998
		O. Eulophidae	0.70 \pm 0.16	0.85 \pm 0.30	0.444	0.657
	Encyrtidae		3.74 \pm 0.97	2.26 \pm 0.42	1.641	0.100
	Trichogrammatidae		10.22 \pm 2.44	2.41 \pm 0.40	4.750	<0.0001
	Pteromalidae		0.33 \pm 0.11	0.22 \pm 0.08	0.769	0.441
	Ichneumonidae		0.52 \pm 0.20	0.67 \pm 0.32	0.406	0.685
	Braconidae		3.78 \pm 0.72	2.41 \pm 0.53	1.613	0.107
DEPREDADORES						
Hemiptera	Miridae		74.26 \pm 14.96	66.15 \pm 11.13	0.436	0.663
	Anthocoridae		2.26 \pm 0.55	2.70 \pm 0.64	0.481	0.630
Coleoptera	Coccinellidae		0.07 \pm 0.05	0.56 \pm 0.20	2.373	0.017
Neuroptera	Chrysopidae		0.04 \pm 0.04	0.07 \pm 0.05	0.566	0.571

Respecto a los parasitoides asociados al control biológico de *T. absoluta*, la presencia del margen de *L. maritima* incrementó significativamente el número de parasitoides de la familia Trichogrammatidae, pero no el de las otras familias consideradas en el estudio. En total, se capturaron 303 adultos de parasitoides en las trampas adhesivas colocadas en campos sin margen, mientras que en los campos con márgenes florales se recolectaron 605 individuos. Después de los Trichogrammatidae, las familias más abundantes fueron Eulophidae, Braconidae y Encyrtidae.

De las plantas centinela colocadas en los campos que tenían un margen floral de *L. maritima* se recuperaron 30.3 ± 8.9 larvas vivas, 50.2 ± 7.3 larvas muertas y 19.5 ± 5.3 larvas parasitadas mientras que de los campos controles se recuperaron 27.9 ± 7.4 ; 49.4 ± 5.9 y 22.7 ± 4.7 larvas vivas, muertas y parasitadas respectivamente. De todos los parasitoides adultos emergidos de las plantas centinela, los individuos correspondientes al género *Necremnus* representaron el 99.3% y 91.8% en los campos sin y con margen floral, respectivamente. De 472 parasitoides adultos clasificados a nivel de género como *Necremnus* sp., 67 muestras seleccionadas al azar fueron identificadas como *N. tutae*.

Muestreos en un cultivo experimental de tomate y en un margen de *L. maritima* adyacente.

En la tabla 3 se compara los valores de las capturas en las trampas adhesivas situadas en el cultivo de tomate y en las situadas en el margen. En lo que se refiere a parasitoides, de las seis familias que pueden estar relacionadas con el control biológico de *T. absoluta*, cuatro (Eulophidae, Trichogrammatidae, Pteromalidae y Braconidae) registraron significativamente mayor número de individuos en los márgenes de *L. maritima* que en el interior del cultivo. La abundancia de los parasitoides *Diglyphus* sp. y *Pnigalio* sp. también fue mayor en las trampas colocadas en el interior del margen floral. En total, el

número de parasitoides de las seis familias consideradas en el estudio fue de 382 en las trampas colocadas en el interior del cultivo y de 997 en trampas colocadas en el margen de *L. maritima*. El número de eulófidos identificados a nivel de género, fue de 78 individuos en las trampas colocadas en el interior del cultivo y de 194 individuos parasitoides contabilizados en las trampas del margen adyacente.

Respecto a los depredadores, se registraron 324 individuos en las trampas colocadas en el interior del cultivo respecto a 282 de las colocadas en el margen floral. Los depredadores *M. pygmaeus* y *N. tenuis* fueron significativamente más abundantes en el interior del cultivo que en el margen de *L. maritima*, mientras que el número de antocóridos fue significativamente mayor en las trampas provenientes del margen que en las del cultivo.

Tabla 3. Media (\pm error estándar) de los enemigos naturales capturados por trampa, colectados de 7 trampas adhesivas durante 6 fechas de muestreo en un campo de tomate con margen de *L. maritima* en el año 2019. N=42. Los valores en negrita indican diferencias significativas.

Familia	Género	Cultivo	Margen	Z	P
PARASITOIDES					
Eulophidae total		2.98 \pm 0.87	10.31 \pm 2.34	6.960	<0.0001
	<i>Necremnus</i> sp.	0.55 \pm 0.26	0.36 \pm 0.10	1.129	0.2590
	<i>Diglyphus</i> sp.	0.98 \pm 0.54	2.95 \pm 0.81	4.002	<0.0001
	<i>Stenomesus</i> sp.	0	0.02 \pm 0.02	0.002	0.999
	<i>Neochrysocharis</i> sp.	0.29 \pm 0.23	0.86 \pm 0.80	1.565	0.1175
	<i>Elasmus</i> sp.	0	0.02 \pm 0.02	0.002	0.9990
	<i>Pnigalio</i> sp.	0.02 \pm 0.02	0.31 \pm 0.18	2.420	0.0155
	<i>Sympiesis</i> sp.	0.02 \pm 0.02	0.05 \pm 0.03	0.566	0.5710
	<i>Cirrospilus</i> sp.	0	0.05 \pm 0.03	0.003	0.9880
	O. Eulophidae	1.12 \pm 0.31	5.69 \pm 1.53	7.488	<0.0001
Encyrtidae		1.71 \pm 0.85	2.76 \pm 1.11	1.658	0.0973
Trichogrammatidae		0.62 \pm 0.26	3.24 \pm 1.51	4.915	<0.0001
Pteromalidae		0.48 \pm 0.19	1.52 \pm 0.31	4.091	<0.0001
Ichneumonidae		0.43 \pm 0.06	0.62 \pm 0.24	1.059	0.2897
Braconidae		2.88 \pm 0.48	5.29 \pm 1.11	3.308	0.0009
DEPREDADORES					
Miridae Total		6.55 \pm 3.70	2.29 \pm 1.23	2.588	0.0009
	<i>M. pygmaeus</i>	4.79 \pm 3.00	1.57 \pm 0.91	2.326	0.0200
	<i>N. tenuis</i>	1.76 \pm 0.80	0.71 \pm 0.37	2.266	0.0234
Anthocoridae		1.10 \pm 0.49	4.21 \pm 1.10	4.609	<0.0001
Coccinellidae		0.07 \pm 0.03	0.14 \pm 0.09	0.980	0.3270
Chrysopidae		0	0.07 \pm 0.05	0.003	0.9880

5.4 Discusión

Al parecer, los tratamientos insecticidas, fungicidas y las aplicaciones de azufre realizados en los campos con y sin margen floral no han tenido un impacto importante sobre los enemigos naturales, si tenemos en cuenta los valores presentados en la tabla 1, la media de los índices, indica valores muy bajos de toxicidad. Los muestreos de *T. absoluta* realizados en campos comerciales en 2018 nos indican que la incidencia de la plaga fue menor en los campos con margen de *L. marítima* que en los que no disponían del margen. Esto a pesar de que la abundancia de míridos y de parasitoides larvarios de *T. absoluta*, que se consideran los principales enemigos de esta plaga (Urbaneja et al., 2012; Arnó et al., 2018b), fueran similares en campos con y sin margen de *L. marítima*, lo que sugiere que ninguno de estos dos grupos de enemigos naturales fue el responsable de la diferencia de incidencia de la plaga. Posiblemente el menor número de larvas de *T. absoluta* reportado de foliolos colectados de los campos con margen de *L. marítima* respecto a los campos sin margen se debe a la presencia de parasitoides de la familia Trichogrammatidae, que parasitan huevos de lepidópteros y colonizan naturalmente el hábitat donde aparece *T. absoluta* (Oliveira et al., 2017). Esto nos indicaría que la situación actual es diferente a la descrita por Gabarra et al. (2014), que encontraron que el parasitismo de huevos de *T. absoluta* era muy bajo en los muestreos realizados entre 2008 y 2011 en la misma zona de nuestro estudio. Sin embargo, los parasitoides del género *Trichogramma* son los insectos más utilizados a nivel mundial en programas de control biológico contra una gran cantidad de plagas de importancia agrícola y forestal (Ghnoeim, 2014). Además, el control de *T. absoluta* en países de Sudamérica, de donde la plaga es originaria, se ha logrado exitosamente mediante la utilización de diversas especies del género *Trichogramma* (Salas-Gervasio et al., 2019). En España, las liberaciones de *Trichogramma achaeae* Nagaraja & Nagarkatti (Hymenoptera:

Trichogrammatidae) se ha considerado una buena opción para mejorar el control biológico de *T. absoluta* (Cabello et al., 2012; Crisol-Martínez y van der Blom, 2019). A unas conclusiones similares llegaron Oliveira et al. (2017) después de constatar que el parasitismo natural debido a esta especie era del 2,5% en campos de las Azores, donde este parasitoide se introdujo de forma accidental. La naturalización en la zona, de *T. achaeae*, o la proliferación de otras especies introducidas accidentalmente desde la zona de origen, tal y como ha sucedido con al menos una especie de parasitoide de larvas (ver Capítulo 4 de esta tesis) pueden ser la causa de esta elevada presencia de *Trichogramma* en los campos de tomate. La introducción accidental de enemigos naturales es muy común tal y como señalan Roy et al. (2011).

Los resultados obtenidos en 2018 respecto a la mayor abundancia de *Trichogramma* sp. en los campos con un margen de *L. marítima* están en concordancia con los obtenidos en 2019, cuando se capturó un número mayor de individuos de este género en las trampas situadas en el margen que en las situadas en el cultivo. Esto indicaría que estos parasitoides visitan el margen con frecuencia de donde probablemente obtienen recursos en forma de néctar y polen tal y como constataron Begum et al. (2006). Estos autores comprobaron el efecto beneficioso de las flores de *L. marítima* en la longevidad y fecundidad de *Trichogramma carverae* Oatman & Pinto (Hymenoptera: Trichogrammatidae).

La distribución de plantas centinela en 2018, en el interior de los cultivos, nos ha permitido identificar los principales parasitoides asociados al control biológico de *T. absoluta* y son mayoritariamente parasitoides de la familia Eulophidae, tal y como confirman diversos estudios, entre ellos; Zappalá et al. (2013), Gabarra et al. (2014) y Biondi et al. (2018). De entre los eulófidos, *N. tutae* es el más abundante. Esto está de acuerdo con otros resultados de campo obtenidos por diversos autores Abbas et al. (2014),

Gebiola et al. (2015), Crisol-Martínez y van der Blom (2019), Arnó et al. (2021). La presencia de eulófidos en los campos de tomate y en particular de *N. tutae* puede tener un impacto importante sobre las poblaciones de *T. absoluta*. Este ectoparasitoide sinovigénico no sólo parasita larvas, sino que produce una mortalidad adicional importante por *host-feeding* y *host-killing* de larvas de *T. absoluta* (Ferracini et al., 2012; Calvo et al., 2013; Calvo et al., 2016), lo que incrementa su impacto sobre la plaga.

En nuestros estudios, la presencia de un margen de *L. marítima* no ha incrementado la presencia de ningún eulófido en los campos de tomate en el experimento llevado a cabo en 2018. En 2019, tampoco observamos que los individuos de esta familia visitaran más frecuentemente el margen comparado con el cultivo excepto en el caso de *Diglyphus isaea* (Walker) (Hymenoptera: Eulophidae), un parasitoide muy frecuente sobre larvas del género *Liriomyza* Mik (Diptera: Agromyzidae) (Albajes et al., 1994; Arnó et al., 2018b). Esta atracción no se ha observado para *Necremnus* sp. a pesar de que Arnó et al. (2018a) y Balzan y Wäckers (2013) reportaron beneficios de esta a planta sobre la longevidad y reproducción de este parasitoide tal y como también se ha obtenido en los experimentos reportados en el capítulo 2 de esta tesis.

Posiblemente, la similitud entre las capturas en los campos con y sin margen de *L. marítima* observadas en 2018 pueden deberse a las elevadas poblaciones de enemigos naturales presentes en la zona. El área mediterránea es muy abundante en enemigos naturales y la aplicación continuada de programas de control biológico desde hace tiempo ha contribuido a incrementar las poblaciones de los parasitoides y depredadores (Arnó et al., 2018b).

En los estudios de 2019, sí se observó que el margen de *L. marítima* fue atractiva para algunos pteromálidos y braconidos. Los pteromálidos presentan gran diversidad de especies, algunos parasitoides están asociados con los minadores de hojas que atacan a

los cultivos, otros parasitan coleópteros, o pueden comportarse como hiperparasitoides de áfidos. Existen además especies que se alimentan de huevos, por lo que pasan incluso a convertirse en depredadoras (Hanson y Gauld, 2006). Además, pocos pteromálicos se han encontrado parasitando *T. absoluta*, únicamente en el Mediterráneo (Biondi et al. 2018) y su prevalencia no parece elevada. Sin embargo, y según estos mismos autores, existen 22 géneros de parasitoides de larvas de *T. absoluta* y 9 especies están citadas en el mediterráneo. A estas nueve especies hay que añadir *Dolichogenidea gelechiidivoris* Marsh (Hymenoptera: Braconidae) que es originaria de América del Sur y que recientemente se ha encontrado parasitando *T. absoluta* en nuestra zona (ver capítulo 4 de esta tesis). Hay diversos estudios que reportan los beneficios de las flores sobre los braconidos según la revisión de Bádenes-Pérez (2019). Arnó et al. (2018a) demostraron en el laboratorio el efecto beneficioso de *L. marítima* sobre la carga de oocitos del parasitoide de *T. absoluta*, *Bracon nr. nigricans* Szépligeti (Hymenoptera: Braconidae). Por lo que se refiere a los míridos depredadores, en 2018 su abundancia fue similar en los campos con y sin margen de *L. marítima*, mientras que los resultados del experimento llevado a cabo en 2019 muestran que estos enemigos naturales fueron más abundantes en el interior del campo que en el margen floral. No encontramos trabajos que describan a los míridos alimentándose del néctar floral, sin embargo, Portillo et al. (2012) demostraron que *M. pygmaeus* aprovecha el néctar extrafloral y obtiene beneficios en la sobrevivencia y fecundidad. Del mismo modo, Urbaneja-Bernat et al. (2015) observaron el mismo beneficio en *N. tenuis* cuando se agregó a la dieta, pequeñas dosis de azúcar. *Macrolophus pygmaeus* y *N. tenuis* son enemigos naturales muy abundantes en el cultivo de tomate en todo el mediterráneo y son clave en el control biológico de diversas plagas en este cultivo (Albajes y Alomar, 1999; Castañé et al., 2011). Aunque el número de míridos depredadores registrado en el margen de *L. marítima* sembrado adyacente al

cultivo de tomate fue bajo, y no existan trabajos que documenten el beneficio que esta planta aporta a los míridos, nuestros resultados indican que estos depredadores visitan las flores, probablemente para aprovechar el néctar o el polen o para localizar otras presas. Sin embargo, otros autores han reportado la importancia de la utilización de plantas con flores para el establecimiento de los míridos depredadores en cultivos de tomate. Agustí et al. (2020) y Ardanuy et al. (2021) observaron que las poblaciones de *M. pygmaeus* se establecen y colonizan eficazmente sobre flores de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). Del mismo modo Balzan (2017), reportó que los depredadores Dicyphinae y parasitoides himenópteros asociados al control biológico de *T. absoluta* se establecieron exitosamente en márgenes de *C. officinalis* adyacente al cultivo de tomate.

Un caso diferente es el de los antocóridos, que mayoritariamente pertenecían al género *Orius*. Estos enemigos naturales se alimentan frecuentemente de polen y Pumariño y Alomar (2012) demostraron que la fertilidad de las hembras aumentó con la provisión de presas y flores de *L. maritima*. Sin embargo, a pesar de que algunas especies de este género están citadas como depredadores de *T. absoluta*, las especies europeas raramente colonizan los cultivos de tomate (Riudavets et al., 1994) y, por lo tanto, su efecto sobre las poblaciones de la plaga puede considerarse escaso.

En resumen, nuestros resultados indican que la presencia de un margen de *L. maritima* contribuye a la reducción de las poblaciones de ataque de *T. absoluta*. El margen de *L. maritima* sembrado adyacente al cultivo de tomate benefició a diversos grupos de parasitoides y depredadores que atacan a *T. absoluta* en tomate. Del mismo modo Haseeb et al. (2018), han documentado que la siembra de *L. maritima* adyacente al cultivo de tomate benefició el control de *N. viridula*. Balzan y Moonen (2013) observaron que la inclusión de complementos florales constituidos por una siembra mixta de flores mejoró la tasa de parasitismo de pulgones y redujo el aumento de lepidópteros que atacan al

cultivo de tomate y Arnó et al. (2021) encontraron que la siembra de flores en los márgenes de tomate beneficio a diversos enemigos naturales asociados a plagas que atacan en tomate, incluso atrajo a parasitoides y depredadores de plagas que afectan a otros cultivos hortícolas adyacentes al tomate. El trabajo de Agustí et al. (2020) y Ardanuy et al. (2021) demostraron que el depredador *M. pygmaeus* coloniza las flores de *C. officinalis* y se traslada al cultivo de tomate, mientras que Balzan y Wäckers (2013) y Arnó et al. (2018a) demostraron que las flores de *L. maritima* benefician a los parasitoides que visitan el margen y aumentan su longevidad. Teniendo en cuenta los hallazgos mencionados, la incorporación de un margen compuesto por flores de *L. maritima* podría complementarse con la siembra de *C. officinalis*, adyacente al cultivo de tomate para promocionar a los depredadores y parasitoides de *T. absoluta* registrados en este estudio. Como varios trabajos han demostrado que la disponibilidad de los recursos florales en los márgenes del cultivo favorece la abundancia de los enemigos naturales que atacan a *T. absoluta* (Balzan y Wäckers, 2013; Balzan et al., 2016; Arnó et al., 2021), el resultado de este trabajo considera importante la incorporación del margen de *L. maritima* adyacente al cultivo de tomate para atraer y conservar a los enemigos naturales de *T. absoluta* y otras plagas que afectan al cultivo de tomate.



6. Capítulo 4

**Naturalized *Dolichogenidea gelechiidivoris* Marsh
(Hymenoptera: Braconidae) complement the resident
parasitoid complex of *Tuta absoluta* (Meyrick)
(Lepidoptera: Gelechiidae) in Spain**

6.1 Introduction

Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) is native to South America where has been considered an important tomato pest since a long time Larrain (1987). The first report outside its area of origin was from Spain in 2006 (Urbaneja et al., 2007). From then onwards, the pest did spread over the Mediterranean basin, and then quickly colonized Africa and Asia (Desneux et al., 2010; Desneux et al., 2011a), threatening tomato production (Biondi et al., 2018).

Although insecticides still remain the main control tool in many world areas, many efforts have targeted sustainable biological control methods (Biondi et al., 2018). In Spain, the positive role of the predatory mirid bugs *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) and *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae) was soon acknowledged (Arnó et al., 2009; Urbaneja et al., 2009). Successful IPM programs based on both predators already in use at the time of invasion did greatly contribute to the control of *T. absoluta* (Urbaneja et al., 2012). These two bugs remain as cornerstones for the biological control of several pests in the area (Arnó et al., 2018b).

Surveys of parasitoids that could complement the poor predator action on *T. absoluta* larvae were soon undertaken in the Mediterranean (Zappalà et al., 2013; Gabarra et al., 2014), and several larval parasitoids of *T. absoluta* within the Eulophidae, Braconidae, Chalcididae, Ichneumonidae and Pteromalidae were recorded (Biondi et al., 2018; Mansour et al., 2018). Out of these species, *Necremnus tutae* Ribes & Bernardo (Hymenoptera: Eulophidae), first identified as *Necremnus* nr. *artynes*, was found consistently parasitizing *T. absoluta* (Gebiola et al., 2015), and several studies have recognized the contribution of natural populations to the biological control of the pest (Abbes et al., 2014; Crisol-Martínez and van der Blom, 2019; Arnó et al., 2021). The parasitoid attracted the attention of the biocontrol industry, and for some time it was

commercially available, but the high host-killing rate was a serious drawback for successful mass rearing (Calvo et al., 2016) and production has been discontinued.

To further assess the contribution of *N. tutae* to the biological control of *T. absoluta*, our first goal was to estimate the natural parasitism in commercial plots where the IPM program based on the use of predatory mirid bugs was implemented. However, since we observed the presence of another parasitoid, the second part of our study aimed to identify this species and to evaluate the importance of its natural populations in the biological control of *T. absoluta*.

6.2 Materials and methods

Samples were collected during 2017–2020 from commercial tomato plots in the horticultural production area of Catalonia (Northeast Spain), including greenhouses, open fields, and roof covered tunnels that lack side walls (Table 1). Each plot was sampled up to 21 times depending on crop duration and *T. absoluta* infestation levels. Plots were sampled by randomly walking in the plot and collecting leaflets that had galleries big enough to host a second to third instar larva of *T. absoluta*. Sampling terminated after 20 minutes or a maximum of 25 leaflets, whichever was reached first, in order to minimize sampling time and costs, particularly when infestation levels are low Naranjo (2008).

Table 1: Number of plots surveyed, number of samples that had leaflets with at least one *T. absoluta* larva, and week of the year when first and last samples were taken. Each sample corresponds to a collection of a maximum of 25 leaflets during up to 20 minutes from one crop on one date.

Year	Number of		Week of the year	
	Plots	Samples	First	Last
2017	32	235	17	41
2018	61	296	11	40
2019	37	186	12	39
2020	32	228	12	46

Leaflets were taken to the laboratory and inspected under a stereomicroscope. *Tuta absoluta* larvae were classified as “ectoparasitized” (with pupae, larvae or eggs of a parasitoid on the *T. absoluta* larva), “alive” (not ectoparasitized and able to crawl when touched with a fine brush), or “dead” (not ectoparasitized and unable to crawl when touched with a fine brush), and the number of each category was recorded. As our initial interest was on the contribution of *N. tutae* to the control of *T. absoluta*, during 2017, 2018 and 2019, only the ectoparasitized larvae were placed inside Petri dishes (maximum of 3 larvae per dish) and kept at room temperature for at least 2-3 weeks.

During 2019, the recurrent presence in the samples, albeit at a low rate of a parasitoid belonging to the Braconidae was observed. Therefore, additional samples were collected from nine tomato fields in September. From these samples, alive, dead and ectoparasitized larvae were individualized in Petri dishes and kept in the climatic chamber (25°C) for a maximum of 42 days until the emergence of *T. absoluta* or adult parasitoids.

From samples collected in 2020, the number of alive, dead, and ectoparasitized *T. absoluta* larvae was also recorded as before, but only larvae alive, with not clearly visible ectoparasitoids, were kept in order to determine the parasitization rate by endoparasitoids. Larvae were placed in a Petri dish (maximum of 3 larvae per dish) together with the leaflet and stored at room temperature for a maximum of 3 weeks until the pupation of *T. absoluta* or the emergence of a parasitoid. Emerged parasitoids from the four years samples were collected and stored in 70% alcohol for further identification.

Due to the high irregularity of infestation levels in the plots, the number of leaflets collected from each plot and each date (a sample) was very variable, and furthermore, not all the galleries had a *T. absoluta* larvae inside. Consequently, the total number of larvae (alive, dead or ectoparasitized) collected in each plot was very variable, and sometimes very low. Leaflets with only empty galleries and no *T. absoluta* larvae were discarded. To summarize the levels of parasitism, samples were pooled for each month and year. The percentage of monthly ectoparasitism was calculated by dividing the number of ectoparasitized larvae by the total number of larvae recorded each month. Additionally, for the 2020 samples of alive *T. absoluta* larvae, monthly parasitism due to endoparasitoids was calculated dividing the number of emerged parasitoids by the total number of larvae recorded each month.

Adult parasitoids were first identified to family and sub-family level using the keys by Grissell and Schauff (1990) and Hanson and Gauld (2006). Eulophidae were further identified to genus using the keys by Askew (1968) and Gebiola et al. (2015). Microgastrinae (Hymenoptera: Braconidae) were first identified to genus following the descriptions of Fernández-Triana et al. (2020), and then as *Dolichogenidea gelechiidivoris* Marsh (= *Apanteles gelechiidivoris*) using the description of Marsh (1975). Additional material examined for morphological identification were 10 ♂♂ and

10 ♀♀, from a laboratory rearing started with adults that emerged from *T. absoluta* larvae collected during 2019 from several tomato fields in El Maresme county (31TDF49 to 31TDG92, Catalonia, Spain). These voucher specimens were prepared and deposited in Naturalis Biodiversity Center (Leiden, The Netherlands).

6.3 Results

Monthly levels of ectoparasitized larvae over the four sampling years are displayed in Table 2. They were recorded from April to November, with levels ranging from 0.1% (May 2017) to 35.7% (November 2020). Apart from this exceptionally high value, each year the parasitism peaked during the summer months of August and September with values between 9 and 15%.

Table 2. Percentages of ectoparasitized *T. absoluta* larvae recorded from tomato leaflets collected in commercial tomato plots. Percentages were calculated as the number of ectoparasitized larvae over the total number of larvae collected per month. In brackets are the number of samples that had leaflets with at least one *T. absoluta* larvae.

Month	% ectoparasitized larvae				<i>T. absoluta</i> larvae (num. samples)			
	2017	2018	2019	2020	2017	2018	2019	2020
Mar	-	0	0	0	-	480 (25)	113 (12)	11 (3)
Apr	0	0.8	1.0	0	32 (5)	612 (47)	308 (22)	14 (6)
May	0.1	3.0	5.0	0	714 (50)	833 (52)	360 (25)	148 (19)
Jun	0.6	7.3	6.2	0.3	519 (52)	575 (43)	389 (27)	398 (48)
Jul	4.9	5.2	4.3	0.6	409 (53)	515 (55)	531 (45)	530 (43)
Aug	10.6	5.5	13.5	1.8	256 (31)	455 (48)	319 (36)	610 (47)
Sep	11.6	14.6	7.6	9.2	242 (27)	213 (21)	197 (19)	370 (40)
Oct	9.1	3.1	-	7.4	186 (16)	65 (5)	-	202 (17)
Nov	-	-	-	35.7	-	-	-	14 (5)

Most parasitoids that emerged from ectoparasitized larvae from 2017 to 2019 were Eulophids (87%) and a smaller percentage (11%) belonged to Braconidae (Table 3). Among the Eulophidae, eight genera were recorded: *Necremnus* (162 individuals), *Pnigalio* (7), *Neochrysocharis* (5), *Diglyphus* (4), *Stenomesus* (4), *Aprostocetus* (3), *Cirrospilus* (2), and *Sympiesis* (1). Out of the 25 individuals belonging to Braconidae that emerged from larvae that had an ectoparasitoid on them (Table 3), 23 were morphologically identified as *D. gelechiidivoris* same as the four individuals collected in 2016.

Table 3: Number of adult parasitoids of different Hymenoptera families reared from ectoparasitized *T. absoluta* larvae in samples collected from commercial plots.

Hymenoptera family	Year of sampling		
	2017	2018	2019
Eulophidae	23	68	98
Braconidae	5	8	12
Torymidae	1	0	0
Platygastridae	1	0	0
Diapriidae	0	1	0
Aphelinidae	0	0	1

The additional samples collected in September 2019 yielded 170 *T. absoluta* larvae. From 21 ectoparasitized *T. absoluta* larvae emerged 11 *Necremnus* sp., 2 *Diglyphus* sp., 1 *Neochrysocharis* sp., and 1 unidentified Eulophid. From 114 dead *T. absoluta* larvae emerged 6 *Necremnus* sp., and from the 35 alive larvae emerged 13 *D. gelechiidivoris*.

In 2020, 1,872 alive larvae were collected from 228 samples from 32 plots. From these larvae, we obtained a total of 264 parasitoids that emerged from 92 different samples

collected from 20 plots. A subsample of 165 were morphologically identified as *D. gelechiivoris*, together with one *Neochrysocharis* sp., and one from the subfamily Alysiinae. As can be observed in Figure 1, the percentage of endoparasitism steadily increased from May until October. No endoparasitoids were recorded in March, April and November.

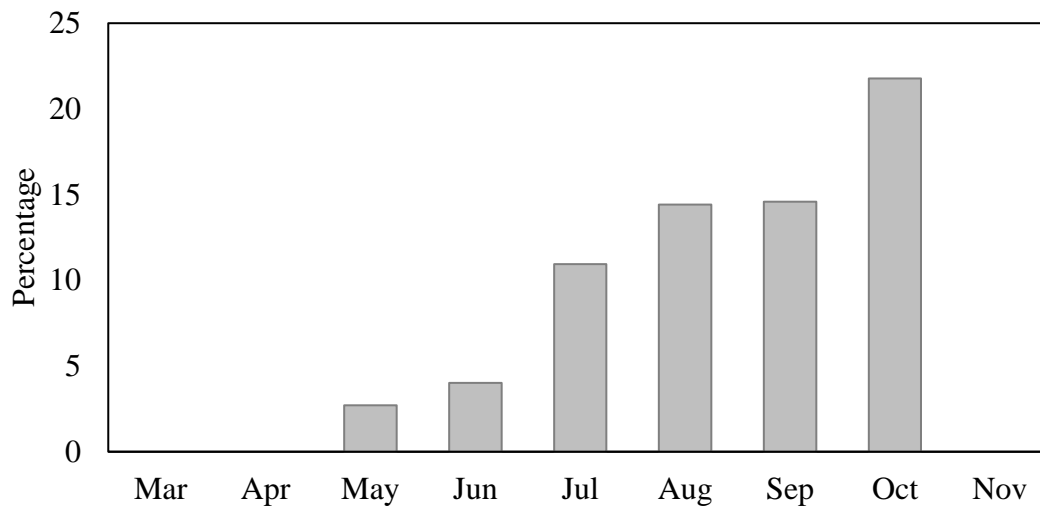


Figure 1: Monthly percentage of endoparasitized *T. absoluta* larvae in commercial tomato plots in 2020. Percentages were calculated as the number of emerged parasitoids over the total number of larvae recorded per month. Total number of *T. absoluta* larvae and number of samples are displayed in Table 2.

6.4 Discussion

Results of our four-years field survey confirmed the relevance of Eulophidae as larval parasitoids of *T. absoluta* in the Mediterranean basin. All genera except *Aprostocetus* had been previously reported (Biondi et al., 2018). We reared three individuals of this genus from a single sample collected in September 2017. *Aprostocetus* are parasitic or hyperparasitic in Lepidoptera (Sakaltaş and Tüzün, 2014), and Mirchev et al. (2001) refer to an *Aprostocetus* sp. as an hyperparasitoid of a Braconid parasitizing a Gelechiid.

Among Eulophidae, our results corroborate the importance of *Necremnus* sp. as the most widespread ectoparasitoid of *T. absoluta* larvae in the Mediterranean, as reported before (Ferracini et al., 2012; Zappalà et al., 2013; Gabarra et al., 2014; Gebiola et al., 2015; Biondi et al., 2018). In fact, *N. tutae*, which is by far the predominant *Necremnus* species in the area of our survey (Arnó et al., 2021), was considered a promising parasitoid to be released for *T. absoluta* control (Calvo et al., 2013; Chailleux et al., 2014a; Bodino et al., 2016; Calvo et al., 2016), although currently it is not commercially available. Rates of ectoparasitized larvae found in the present study, mostly due to *Necremnus* sp., were similar to those recorded in other field studies in the Mediterranean basin. In the same area of the present study, parasitism rates by *N. tutae* in sentinel plants were close to 20% (Arnó et al., 2021), and in Tunisia it was of 26% in sentinel plants, and between 11 and 15% when sampling the crop (Abbes et al. 2014). Much higher rates, up to 73%, were recorded in tomato greenhouses in the southeast of Spain (Crisol-Martínez and van der Blom, 2019).

Contribution of *N. tutae* to the control of *T. absoluta* goes further than only parasitization. As many Eulophidae, it kills more larvae than parasitizes in order to obtain nutrients that have a strong positive effect on its reproduction (Ferracini et al., 2012; Balzan and Wäckers, 2013; Calvo et al., 2013; Chailleux et al., 2014a; Calvo et al., 2016; Bodino et al., 2019). In the present study, and although the number of dead larvae was recorded, we could not determine the exact causes of mortality because even all sampled plots were managed according to an IPM program based on predatory mirids, insecticide applications were also occasionally required.

An important outcome of our study was the detection of *D. gelechiidivoris* in field collected samples from 2017 to 2020, and also in one sample collected in 2016. *Dolichogenidea gelechiidivoris* is native of South America, where it is considered as an

important agent of biological control (Larrain, 1987, Agudelo and Kaimowitz, 1997; Vallejo, 1999; Salas-Gervasio et al., 2019). In Colombia, mass rearing protocols were developed to release this parasitoid for *T. absoluta* control (Morales et al., 2013). Furthermore, in 2017 it was imported to Kenya from Peru to contribute to the control of *T. absoluta* in Africa (Aigbedion-Atalor et al., 2020a). Another species, *Dolichogenidea appellator* (Telenga) (= *Dolichogenidea litae* (Nixon)), was occasionally found parasitizing *T. absoluta* in the same area as the present study (Gabarra et al., 2014) and was found also associated with this pest in Sudan (Mansour et al., 2018).

To our knowledge, this is the first report of *D. gelechiidivoris* naturally occurring outside its area of origin. Since there is no record of intentional introduction of *D. gelechiidivoris* into Europe, and the importation to Africa took place in 2017, one year after our first detection of this species in 2016, the results of our survey suggest that this parasitoid was unintentionally introduced from the Neotropics together with the pest. Accidental introductions of natural enemies in new territories are not strange. Roy et al. (2011) stated that most of the alien arthropod predator and parasite species in Europe arrived accidentally, as part of worldwide movement of invasive pests that is facilitated by global trade. Trade of infested fruits has been pointed out as the most probable cause of the arrival of *T. absoluta* to Spain from South America and the quick spread of the pest (Desneux et al., 2010).

As all Microgastrinae, *D. gelechiidivoris* is a koinobiont solitary larval endoparasitoid (Fernandez-Triana et al., 2020), and the host remains alive until the end of the parasitoid development. Of the 2017–2019 samples of *T. absoluta* larvae, we only kept those that had an ectoparasitoid egg or larva on them, but 11.5% of the emerged parasitoids were *D. gelechiidivoris* (Table 3). This suggests that there is no clear recognition of previous parasitism between ectoparasitoids (mainly *Necremnus* sp.), and *D. gelechiidivoris*.

When we maintained all alive larvae to record parasitoid emergence (additional 2019 samples, and all 2020 samples), the endoparasitism rate was 7.6% in September 2019 and increased up to 22% from May to October 2020 (Fig. 1). However, the real rate of parasitism by *D. gelechiidivoris* in 2020 was probably underestimated since about 11% of ectoparasitized larvae collected between 2017 and 2019 yielded *D. gelechiidivoris*, and ectoparasitized larvae of 2020 had been discarded.

In this scenario of coexistence of several natural enemies, the interactions between *D. gelechiidivoris* and *Necremnus* sp. will be of great importance. For example, young females of the eulophid ectoparasitoid *Dineulophus phthorimaeae* De Santis (Hymenoptera: Eulophidae) avoided multiparasitism on the microgastrinid endoparasitoid *Pseudapanteles dignus* (Muesebeck) (Hymenoptera: Braconidae), but older females did not discriminate heterospecific parasitized *T. absoluta* larvae, and joint action of both parasitoids exerted an important control of *T. absoluta* (up to 80% of host larvae mortality) (Salas-Gervasio et al., 2019). The outcome of competition between parasitoids attacking the same host depends on many factors that may explain the dominance of one parasitoid over another, e.g. where the venom of idiobiont ectoparasitoids has little or no effect on the development of endoparasitic koinobionts (Harvey et al., 2013), although in multiple parasitism between an ectoparasitoid and an endoparasitoid, the former normally wins (Mitsunaga and Yano, 2004). Furthermore, the interaction between *D. gelechiidivoris* and predatory mirids will be also of interest. These predators prefer to prey on eggs but may also feed on young *T. absoluta* larvae (Arnó et al., 2009; Urbaneja et al., 2009), which are the preferred host instar of the parasitoid (Aigbedion-Atalor et al., 2020b). *Nesidiocoris tenuis* did not prey on nor reduce the oviposition by *D. gelechiidivoris*, and the efficacy of both natural enemies together on *T. absoluta* was significantly higher than either natural enemy alone (Aigbedion-Atalor

2020a). The outcome of the interactions among these biocontrol agents will be determinant for more successful control of *T. absoluta* (Tarusikirwa et al., 2020).

7. Discusión General

En la sociedad actual existe un interés creciente en reducir la dependencia de los pesticidas y los riesgos asociados a su uso, con el objetivo de proteger la salud humana y el medio ambiente. Se trata de una tendencia general en toda Europa, y a la que España y Cataluña, la zona productora donde se ha realizado el estudio, no son ajenas. Este interés social se refleja en la legislación europea y en su trasposición en las normativas nacionales que tienen por finalidad reducir las aplicaciones de pesticidas tóxicos (Villaverde et al., 2013). A esta reducción puede contribuir de forma relevante el control biológico de plagas mediante la conservación de los enemigos presentes en el agroecosistema, lo que se conoce como control biológico por conservación (CBC) (Ehler, 1998). El manejo del hábitat se considera un factor importante para mantener estables las poblaciones de los insectos plagas que atacan a los cultivos y a sus enemigos naturales en los sistemas agrícolas (Landis et al., 2005). Así, la incorporación del CBC dentro de los programas de manejo integrado de plagas (MIP) cada vez va tomando mayor interés, como lo demuestran las publicaciones recientes de estudios realizados en la misma zona donde se ha desarrollado esta tesis tanto en cultivos frutales (Rodríguez-Gasol et al., 2019; Aparicio et al., 2021) como en hortícolas (Ardanuy et al., 2021; Arnó et al., 2021). Estos trabajos documentan que la existencia de infraestructuras ecológicas en los bordes de los campos puede favorecer la abundancia de los principales enemigos naturales asociados a las plagas de los cultivos en el área Mediterránea.

En la zona de estudio, en Cataluña, existen avances significativos en la implementación del MIP en varios cultivos frutales y hortícolas (Albajes et al., 2003; Arnó et al., 2018b). En frutales, la confusión sexual para controlar lepidópteros se realiza desde 1988 y constituye la piedra angular sobre la que se estructura el programa MIP. El uso de la confusión sexual está muy generalizado y se aplica para controlar *Cydia pomonella* (L.)

y *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae), y otros tortrícidos importantes que afectan al melocotón (incluyendo nectarinas) y manzanos (Torá, 2006). Sin embargo, el control de otras plagas todavía se realiza mayoritariamente con insecticidas y es para ellas que el CBC puede jugar un papel destacado (Miñarro et al., 2005).

En el caso de las hortícolas, la piedra angular de los programas MIP es el control biológico, y más concretamente los depredadores polífagos de la familia Miridae (Arnó et al., 2018b). Estos depredadores colonizan y/o se inoculan con éxito en los cultivos de tomate contribuyendo al control de diversas plagas entre las que se incluye *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), Arnó et al. (2018b). En tomate, la incorporación de infraestructuras ecológicas basadas en la siembra de flores de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) para atraer míridos depredadores es una realidad en muchas explotaciones (Agustí et al., 2020; Ardanuy et al., 2021). Míridos aparte, los cultivos hortícolas se benefician de la reducción de plaguicidas que supone la utilización del programa MIP, y hay otros depredadores y un gran número de especies de parasitoides que contribuyen al control de otras plagas como pulgones, dípteros minadores o larvas y huevos de lepidópteros.

Los resultados de esta tesis demuestran que en las inmediaciones de los huertos frutales de melocotonero y manzano de las principales zonas productoras de Cataluña existe una diversidad de especies herbáceas de floración espontánea, que albergan una importante riqueza de enemigos naturales de los pulgones y los trips. Los hallazgos reportados en este estudio coinciden con los resultados obtenidos por Rodríguez-Gasol et al. (2019) y Aparicio et al. (2021) quienes observaron que los recursos florales adyacentes a huertos de manzano y melocotonero albergan a poblaciones relevantes de enemigos naturales. Las especies vegetales seleccionadas en este estudio para ser utilizadas como infraestructuras ecológicas tienen una floración precoz y prolongada, lo que permitiría un

aporte continuo de alimentos alternativos para los enemigos naturales. El solapamiento de los periodos de floración permitiría además conservar a los enemigos naturales ya presentes en la zona y en el caso de que se plantee realizar liberaciones de enemigos naturales, favorecería su establecimiento en el campo. El estudio realizado para comprobar la accesibilidad del néctar en todas las especies vegetales registradas en los márgenes ha permitido verificar que para la mayoría de los enemigos naturales el tamaño de la cabeza y el tórax no es un impedimento para acceder al néctar de las flores, en contraposición a lo que indican otros autores (Patt et al., 1997; Nave et al., 2016; Villa et al., 2017). Sólo en casos excepcionales, otras características morfológicas del insecto como la envergadura de las patas en el caso de *Aphidoletes aphidimyza* Rondani (Diptera: Cecidomyiidae) podrían afectar el acceso al néctar de la flor (Aparicio et al., 2018). Esta situación, para algunos enemigos naturales en concreto, podría paliarse incorporando en los márgenes especies florales que proporcionen néctar extra floral (Portillo et al., 2012). En el caso de las hortícolas, esta tesis se ha centrado en evaluar la contribución de la presencia de *Lobularia marítima* L. (Brassicaceae) al control de *T. absoluta*.

En el laboratorio, la incorporación de *L. marítima* no afectó la actividad de los principales enemigos naturales (*Macrolophus pygmaeus* Rambur, Hemiptera: Miridae y *Necremnus tutae* Ribes & Bernardo, Hymenoptera: Eulophidae), que habitualmente intervienen en el control biológico de *T. absoluta* en la zona de estudio (Arnó et al. 2018b). Nuestros resultados indican que la presencia de *L. marítima* no tuvo ningún efecto al menos en periodos de tiempo cortos en la depredación de larvas por *M. pygmaeus* ni en el número de larvas parasitadas y larvas muertas (*host-feeding* y/o *host-killing*) por el parasitoide *N. tutae*. Sin embargo, la presencia de *Lobularia* sí que indica un beneficio en términos de supervivencia y reproducción del parasitoide. *Necremnus tutae* alimentados con flores de *L. marítima* mostraron mayor sobrevivencia y un número mayor de oocitos. Se observó

también que este parasitoide nativo es el más abundante reportado sobre *T. absoluta* en los campos de tomate y coinciden con los resultados obtenidos por Balzan y Wäckers (2013) y Arnó et al. (2018a).

Macrolophus pygmaeus disminuye la descendencia del parasitoide bien sea por cleptoparasitismo o bien por depredación directa tal y como han visto en otras asociaciones de míridos y eulófidos Chailleux et al. (2014b) y Naselli et al. (2017). Sin embargo, este comportamiento no afectaría la liberación conjunta de *M. pygmaeus* y *N. tutae* para controlar las poblaciones de *T. absoluta* en el campo.

La siembra del margen de *L. maritima* adyacente al cultivo de tomate beneficio a varios grupos de parasitoides y depredadores de *T. absoluta*. Se capturaron parasitoides relacionados con el control biológico de *T. absoluta* que no se consideraba en los estudios y que a la luz de los resultados obtenidos tienen un papel muy importante sobre la regulación de la plaga en los cultivos. Llama la atención la presencia de los parasitoides de huevos de la familia Trichogrammatidae. Estos parasitoides fueron considerados poco relevantes en el control de *T. absoluta* en la zona (Gabarra et al., 2014). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis indican que su abundancia en los campos con presencia de *L. marítima* en el margen coincide con un menor ataque de la plaga. Estos parasitoides visitan el margen de *L. maritima* con frecuencia como se demuestra en el experimento de campo en que se comparan las capturas en trampas situadas en el margen y en el interior del cultivo, además Begum et al., 2006 observó que los parasitoides *Trichogramma* se benefician de las flores de *L. maritima*. Estas observaciones podrían indicar que *L. maritima* atrae a los parasitoides de huevos de la familia Trichogrammatidae, por lo que sugiere indagar más a fondo sobre los parasitoides del género *Trichogramma* y su relación con las flores de *L. maritima*.

Otro hallazgo importante reportado durante el desarrollo de esta tesis fue la identificación de un importante agente de control biológico asociado a *T. absoluta*, *Dolichogenidea gelechiidivoris* Marsh (Hymenoptera: Braconidae), del cual no se tiene reporte en Europa. Se trata de un parasitoide que se considera relevante para el control de *T. absoluta* en la zona de origen de la plaga (Sudamérica) y que según los datos de que se disponen ha sido introducido de forma accidental en Europa. La introducción accidental de enemigos naturales no es rara (Roy et al., 2011). La discrepancia entre los resultados obtenidos por Gabarra et al. (2014) y los obtenidos en esta tesis respecto a la relevancia de *Trichogramma* sp. en el control de la plaga, podría tal vez, deberse a una introducción accidental de alguna especie de estos parásitos de huevos más adaptada a parasitar *T. absoluta*. Cabe recordar que diversas especies de *Trichogramma* están utilizándose en el mundo (Biondi et al., 2018; Salas-Gervasio et al., 2019), para el control de esta plaga.

Los resultados de este trabajo son alentadores por lo que se refiere a la incorporación de infraestructuras ecológicas para atraer y establecer tempranamente a los parasitoides y depredadores de plagas que atacan a frutales y hortícolas. Se reportaron diversos grupos de enemigos naturales que visitan el interior del cultivo y el margen de flores. Para el caso de melocotonero y manzano se recomienda incorporar márgenes florales en los huertos y que estén constituidos por flores de *Eruca vesicaria* (L.) Cav., *Cardaria draba* (L.) Dev. (Brassicaceae), *Euphorbia serrata* (L.) S.G. Gmel. (Euphorbiaceae), *Malva sylvestris* L. (Malvaceae), *Anacyclus clavatus* (Desf.) Pers. (Asteraceae) y *Diplotaxis erucoides* (L.) DC (Brassicaceae), puesto que albergan a los principales enemigos naturales de pulgones y trips, además estas especies tienen una floración precoz y florecen por largos periodos en los márgenes de los huertos. Y en el caso de hortícolas, se recomienda la siembra mixta de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) junto con *L. maritima* para beneficiar a los míridos y parasitoides de *T. absoluta*. Si bien los trabajos realizados en esta tesis se han

centrado, en el caso de hortícolas, en incrementar las posibilidades del control de *T. absoluta*, también han servido para demostrar que la presencia de recursos florales, y más concretamente *L. marítima*, favorece la presencia de diversos grupos de enemigos naturales como diversas familias de parasitoides, y depredadores del género *Orius* sp., que son claves en el control de otras plagas relevantes en diversos cultivos hortícolas, por lo que la funcionalidad de un margen que incluya *L. marítima* se extiende más allá del modelo *L. marítima* - *T. absoluta* planteado en esta tesis.

En conclusión, los datos obtenidos en este trabajo pueden contribuir a diseñar estrategias novedosas para la mejora del programa MIP en la zona. Los hallazgos reportados en la tesis están orientados a establecer un exitoso programa de control biológico por conservación en el que se minimice la utilización de pesticidas perjudiciales para la salud humana y las poblaciones de enemigos naturales presentes en los cultivos sea beneficiada.

8. Conclusiones

Capítulo 1

1. En los márgenes adyacentes a los huertos de melocotonero y manzano de la zona productora de Lleida florecen entre marzo y mayo al menos 36 especies herbáceas espontáneas de 17 familias. Las familias con más especies representadas corresponden a las Brassicaceae y Asteraceae.
2. En base a los criterios de abundancia, precocidad y duración de la floración, y presencia de enemigos naturales, las plantas candidatas seleccionadas para promover la presencia de parasitoides y depredadores de pulgones y trips incluyen: *Eruca vesicaria*, *Cardaria draba*, *Malva sylvestris*, *Euphorbia serrata*, *Anacyclus clavatus* y *Diplotaxis erucooides*. Esta selección no excluye otras candidatas, como *Beta vulgaris*, la única especie en la que se detectó parasitoides de la familia Aphelinidae.
3. Los parasitoides de pulgones encontrados pertenecen mayoritariamente a la familia Braconidae, y destacan las especies *Aphidius matricariae*, *Aphidius ervi*, *Aphidius colemani* y *Binodoxys angelicae*. Por lo que se refiere a depredadores, destacan por orden de abundancia *Aeolothrips intermedius* y *Aeolothrips tenuicornis*, *Orius* sp., coccinélidos y crisopas.
4. La disponibilidad del néctar para los enemigos naturales en la vegetación espontánea de la zona de estudio está garantizada por la exposición superficial del mismo (floral o extra-floral) o por la arquitectura de la flor que es compatible con la morfología de los parasitoides y depredadores medidos.

Capítulo 2

1. En el laboratorio, la presencia de flores de *Lobularia maritima* no aumenta la depredación de *Macrolophus pygmaeus* sobre larvas de *Tuta absoluta* y tampoco influye en la relación intragremial entre el depredador y el parasitoide *Necremnus tutae*. Sin embargo, la presencia de *M. pygmaeus* disminuye la descendencia de este parasitoide.
2. La presencia de estas flores tampoco aumenta ni el parasitismo de *N. tutae* sobre las larvas de la plaga ni la mortalidad adicional causada por este eulófido (*host-feeding* o *host-killing*). Sin embargo, la disponibilidad de *L. marítima* aumenta la sobrevivencia y el potencial reproductor del parasitoide.

Capítulo 3

1. Los márgenes florales de *L. marítima* adyacentes a los campos de tomate favorecen la abundancia parasitoides del género *Trichogramma*, que parasitan huevos de *T. absoluta*. No se detectó un incremento en las poblaciones de los parasitoides que atacan a las larvas de esta plaga.
2. *Lobularia maritima* no es atractiva para los míridos depredadores, básicos en el control biológico de *T. absoluta*, pero sí para otras familias de enemigos naturales de importantes plagas que atacan a tomate.
3. La proximidad de *L. marítima* a los campos de tomate contribuye a reducir el número de larvas de *T. absoluta* en el cultivo. Su adición a los márgenes de *Calendula officinalis*, que se utilizan para conservar míridos depredadores, puede proporcionar beneficios en términos del control biológico de *T. absoluta* y de otras plagas hortícolas.

Capítulo 4

1. Los resultados de cuatro años de muestreos en campos comerciales de tomate confirman que *Necremnus* sp. es el ectoparasitoide asociado al control de *T. absoluta* más abundante en el tomate de la zona hortícola estudiada.
2. Los muestreos ponen de manifiesto la presencia de un endoparasitoide de *T. absoluta* de origen neotropical, *Dolichogenidea gelechiidivoris*. Este parasitoide ha sido detectado en muestras de los cuatro años y en una muestra anterior colectada en 2016.
3. Ambas especies de parasitoides contribuyen al control de *T. absoluta* de forma significativa con parasitismos esperables que pueden alcanzar valores de hasta un tercio de las larvas de la plaga.

9. Referencias Bibliográficas

- Abbes K, Biondi A, Zappalà L, Chermiti B (2014) Fortuitous parasitoids of the invasive tomato leafminer *Tuta absoluta* in Tunisia. *Phytoparasitica* 42:85-92
- Agudelo LA, Kaimowitz D (1997) Tecnología agrícola sostenible: retos institucionales y metodológicos. Dos estudios de caso en Colombia. Instituto interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) / Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH. San José, Costa Rica.
- Aigbedion-Atalor PO (2020a) Elucidating *Tuta absoluta* (Meyrick) invasion and enhancing its management in Eastern Africa: spread, socio-ecological impacts, and potential of a newly imported larval parasitoid for classical biological control Eastern in Africa. PhD dissertation. Rhodes University
- Aigbedion-Atalor PO, Mohamed SA, Hill MP, Zalucki, MP, Azrag AGA, Srinivasan R, Ekesi S (2020b) Host stage preference and performance of *Dolichogenidea gelechiidivoris* (Hymenoptera: Braconidae), a candidate for classical biological control of *Tuta absoluta* in Africa. *Biol Control* 144:104215
- Agustí N, Castañé C, Alomar O (2020) Development of a PCR-based method to monitor arthropod dispersal in agroecosystems: *Macrolophus pygmaeus* (Hemiptera: Miridae) from banker plants to tomato crops. *Insect Science* 27:1125-1134
- Alavi J, Minaei K (2018) Studies on the genus *Aeolothrips* (Thysanoptera: Aeolothripidae) in Iran, with a key to species. *Zootaxa* 4446(3):343-360
- Albajes R, Gabarra R, Castañé C, Alomar O, Arnó J, Riudavets J, Ariño J, Martí M, Moliner J, Martínez M (1994) Implementation of an IPM program for spring tomatoes in Mediterranean greenhouses. *IOBC/WPRS Bull.* 17(5):14-21
- Albajes R, Sarasúa MJ, Avilla J, Arnó J, Gabarra R (2003) Integrated Pest Management in the Mediterranean Region: the Case of Catalonia, Spain. Pp. 341-355. En

- Maredia KM, Dakouo D, Mota-Sanchez D (eds). Integrated Pest Management in the Global Arena. CABI Publishing, Wallingford.
- Albajes R, Alomar O (1999) Current and potential use of polyphagous predators, pp. 265-275. In Albajes R, Lodovica Gullino M, van Lenteren JC, & Elad Y (eds.). Integrated pest and disease management in greenhouse crops. Kluwer, Dordrecht
- Alignier A, Raymond L, Deconchat M, Menozzi P, Monteil C, Sarthou JP, Vialatte A, Ouin A (2014) The effect of semi-natural habitats on aphids and their natural enemies across spatial and temporal scales. *Biological Control* 77:76-82
- Alins G, Lordan J, Rodriguez-Gasol N, Belmonte J, de Linares C, Alegre S, Arnó J, Avilla J, Sarasúa MJ (2019) Guia de plantes per afedir els enemics naturals de les plagues. Lleida, IRTA.
- Altieri MA, Letourneau, DK (1982) Vegetation management and biological control in agroecosystems. *Crop Protection* 1(4):405-430
- Aparicio Y, Gabarra R, Arnó J (2018) Attraction of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) and *Aphidoletes aphidimyza* (Diptera: Cecidomyiidae) to sweet alyssum and assessment of plant resources effects on their fitness. *Journal of Economic Entomology* 111(2):533-541
- Aparicio Y, Gabarra R, Riudavets J, Starý P, Tomanović Ž, Kocić K, Pujade Villar J, Ferrer Suay M, Cuesta Porta V, Arnó J (2019) Hymenoptera complex associated with *Myzus persicae* and *Hyalopterus spp.* in peach orchards in Northeastern Spain and prospects for biological control. *Insects* 10(4):109
- Aparicio Y, Riudavets J, Gabarra R, Agustí N, Rodríguez-Gasol N, Alins J, Blasco-Moreno A, Arnó J (2021) Can insectary plants enhance the presence of natural enemies of the green peach aphid (Hemiptera: Aphididae) in Mediterranean peach orchards? *Journal of Economic Entomology*. Jan. DOI:10.1093/jee/toaa298.

- Araj SE, Shields MW, Wratten SD (2019) Weed floral resources and commonly used insectary plants to increase the efficacy of a whitefly parasitoid. *BioControl* 64: 553-561
- Araj SE, Wratten S, Lister A, Buckley H (2008) Floral diversity, parasitoids and hyperparasitoids – A laboratory approach. *Basic and Applied Ecology* 9:588-597
- Araj SE, Wratten SD (2015) Comparing existing weeds and commonly used insectary plants as floral resources for a parasitoid. *Biological Control* 81:15-20
- Ardanuy A, Figueras M, Matas M, Madeira F, Arnó J, Alomar O, Albajes R, Gabarra R (2021) Banker plants and land-scape composition influence colonisation precocity of tomato greenhouses by mirid predators. *Journal of Pest Science*. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01387-y>
- Arnó J, Castañé C, Alomar O, Riudavets J, Agustí N, Gabarra R, Albajes R (2018b) Forty years of biological control in Mediterranean tomato greenhouses: The story of success. Review. *Israel Journal of Entomology*. 48(2). pp. 209-226
- Arnó J, Molina P, Aparicio Y, Denis C, Gabarra R, Riudavets J (2021) Natural enemies associated with *Tuta absoluta* and functional biodiversity in vegetable crops. *BioControl*. <https://doi.org/10.1007/s10526-021-10097-4>
- Arnó J, Oveja MF, Gabarra R (2018a) Selection of flowering plants to enhance the biological control of *Tuta absoluta* using parasitoids. *Biological Control* 122:41-50
- Arnó J, Sorribas R, Prat M, Matas M, Pozo C, Rodríguez D, Garreta A, Gómez A, Gabarra R (2009) *Tuta absoluta*, a new pest in IPM tomatoes in the northeast of Spain. *IOBC/WPRS Bull* 9:203-208

- Askew RR (1968) Hymenoptera 2. Chalcidoidea section (b). Handbooks for the identification of British insects Vol. 8, Part 2b. Royal Entomological Society of London. London
- Badenes-Pérez FR (2019) Trap crops and insectary plants in the order Brassicales. *Annals of the Entomological Society of America* 112(4):318-329
- Baggen LR, Gurr GM, Meats A (1999) Flowers in tri-trophic systems: mechanisms allowing selective exploitation by insect enemies for conservation biological control. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 91:155-161
- Balmer O, Pfiffner L, Schied J, Willareth M, Leimgruber M, Luka H, Traugott M (2013) Non crop flowering plants restore top-down herbivore control in agricultural fields. *Ecology and Evolution* 3(8):2634-2646
- Balzan MV (2017) Flowering banker plants for the delivery of multiple agroecosystem services. *Arthropod-Plant Interactions* 11:743-754
- Balzan MV, Bocci G, Moonen AC (2014) Augmenting flower trait diversity in wildflower strips to optimise the conservation of arthropod functional groups for multiple agroecosystem services. *Journal of Insect Conservation* 18:713–728
- Balzan MV, Bocci G, Moonen A-C (2016) Landscape complexity and field margin vegetation diversity enhance natural enemies and reduce herbivory by Lepidoptera pests on tomato crop. *BioControl* 61:141-154
- Balzan MV, Moonen AC (2013) Field margin vegetation enhances biological control and crop damage suppression from multiple pests in organic tomato fields. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 150:45-65
- Balzan MV, Wäckers FL (2013) Flowers to selectively enhance the fitness of a hostfeeding parasitoid: Adult feeding by *Tuta absoluta* and its parasitoid *Necremnus artynes*. *Biological Control* 67:21-31

- Barbagallo S, Cocuzza GE, Cravedi P, Komazaki S (2017) IPM Case Studies: Deciduous fruit tree. Pp. 651-661 in van Emden, H. & Harrington, R. (Eds) Aphids as crop pests, 2nd edn. Wallingford, CABI Publishing
- Bàrberi P, Burgio G, Dinelli G, Moonen AC, Otto S, Vazzana C, Zanin G (2010) Functional biodiversity in the agricultural landscape: relationships between weeds and arthropod fauna. *Weed Research* 50:388-401
- Begg GS, Cook SM, Dye R, Ferrante M, Franck P, Lavigne C, Lövei GL, Mansion-Vaquie A, Pell JK, Petit S, Quesada N, Ricci B, Wratten SD, Birch A.NE (2017) A functional overview of conservation biological control. *Crop Protection* 97: 145-158
- Begum M, Gurr GM, Wratten SD, Hedberg PR, Nicol HI (2006) Using selective food plants to maximize biological control of vineyard pest. *Journal of Applied Ecology* 43: 547-554
- Berndt LA, Wratten SD, Hassan PG (2002) Effects of buckwheat flowers on leafroller (Lepidoptera: Tortricidae) parasitoids in a New Zealand vineyard. *Agricultural and Forest Entomology* 4:39-45
- Biondi A, Chailleux A, Lambion J, Desneux N (2013) Indigenous natural enemies attacking *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Southern France. *Egyptian Journal of Pest Control* 23:117-121
- Biondi A, Guedes RNC, Wan FH, Desneux N (2018) Ecology, worldwide spread, and management of the invasive south american tomato pinworm, *Tuta absoluta*: past, present, and future. *Annual Review of Entomology* 63:239-258
- Bodino N, Ferracini C, Tavella L (2016) Is host selection influenced by natal and adult experience in the parasitoid *Necremnus tutae* (Hymenoptera: Eulophidae)? *Animal Behaviour* 112:221-228

- Bodino N, Ferracini C, Tavella L (2019) Functional response and age-specific foraging behaviour of *Necremnus tutae* and *N. cosmopterix*, native natural enemies of the invasive pest *Tuta absoluta* in Mediterranean area. *Journal of Pest Science* 92:1467-1478
- Bournier A, Lacasa A, Pivot Y (1978) Biologie d'un thrips prédateur *Aeolothrips intermedius* (Thys.: Aeolothripidae). *Entomophaga* 23(4):403-410
- Bugg RL, Waddington C (1994) Using cover crops to manage arthropods pests of orchards: A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 50:11-28
- Cabello T, Gallego JR, Fernandez FJ, Gamez M, Vila E, del Pino M, Hernandez- Suarez E (2012) Biological control strategies for the South American tomato moth (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouse tomatoes. *Journal of Economical Entomology* 105: 2085-2096
- Cahenzli F, Sigsgaard L, Daniel C, Herz A, Jamar L, Kelderer M, Jacobsen SK, Kruczyńska D, Matray S, Porcel M, Sekrecka M, Świergiel V, Tasin M, Telfser J, Pfiffner L (2019) Perennial flower strips for pest control in organic apple orchards - A pan-European study. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 278: 43-53
- Chailleux A, Desneux N, Arnó J, Gabarra R (2014a) Biology of two key Palaearctic larval ectoparasitoids when parasitizing the invasive pest *Tuta absoluta*. *Journal of Pest Science* 87:441-448
- Chailleux A, Bearez P, Pizzol J, Amiens-Desneux E, Ramirez-Romero R, Desneux N (2013) Potential for combined use of parasitoids and generalist predators for biological control of the key invasive tomato pest *Tuta absoluta*. *Journal of Pest Science* 86:533-541

- Chailleux A, Wajnberg E, Zhou Y, Amiens-Desneux E, Desneux N (2014b) New parasitoid-predator associations: female parasitoids do not avoid competition with generalist predators when sharing invasive prey. *Naturwissenschaften* 101:1075-1083
- Chen Y, Mao J, Reynolds OL, Chen W, He W, You M, Gurr GM (2020) *Alyssum (Lobularia maritima)* selectively attracts and enhances the performance of *Cotesia vestalis*, a parasitoid of *Plutella xylostella*. *Scientific Reports* 10:6447
- Calvo FJ, Soriano JD, Bolckmans K, Belda JE (2013) Host instar suitability and life-history parameters under different temperature regimes of *Necremnus artynes* on *Tuta absoluta*. *Biocontrol Science and Technology* 23(7):803-815
- Calvo FJ, Soriano JD, Stansly PA, Belda JE (2016) Can the parasitoid *Necremnus tutae* (Hymenoptera: Eulophidae) improve existing biological control of the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)? *Bulletin of Entomological Research* 106(4):502-11
- Castañé C, Arnó J, Gabarra R, Alomar O (2011). Plant damage to vegetable crops by zoophytophagous mirid predators. *Biological Control* 59: 22-29
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.03.007>
- Castañé C, van der Blom J, Nicot PC (2020) Tomatoes. In: Gullino M, Albajes R, Nicot P. (eds) *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops. Plant Pathology in the 21st Century*, vol 9. Springer, Cham. pp. 487-511
- Comba L, Corbet SA, Hunt L, Warren B (1999) Flowers, nectar and insect visits: Evaluating British plant species for pollinator-friendly gardens. *Annals of Botany* 83:369-383
- Cook RJ (1988) Biological control and holistic plant-health care in agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture* 3(2/3). pp. 51-62

- Corbett A, Rosenheim JA (1996) Impact of a natural enemy overwintering refuge and its interaction with the surrounding landscape. *Ecological Entomology* 21:155-164
- Crisol-Martínez E, van der Blom J (2019) *Necremnus tutae* (Hymenoptera, Eulophidae) is widespread and efficiently controls *Tuta absoluta* in tomato greenhouses in SE Spain. *IOBC/WPRS Bull* 147:22–29
- DARP, Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació (2020) Superfícies, rendiments i produccions comarcals dels conreus agrícoles. Available at <http://agricultura.gencat.cat/ca/departament/estadistiques/agricultura/estadistiques-definitives-conreus/> (last accessed July 2020)
- Dassonville N, Thiellemans T, Gosset V (2013) FresaProtect and Berryprotect: mixes of parasitoids to control all common aphid species on protected soft fruit crops product development and case studies from three years of experience. *Aspects of Applied Biology* 119:79-88
- Davidson MM, Nielsen M-C, Butler RC, Castañé C, Alomar O, Riudavets J, Teulon DAJ (2014) Can semiochemicals attract both western flower thrips and their anthocorid predators? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 155(1):54-63
- Dedryver CA, Le Ralec A, Fabre F (2010) The conflicting relationships between aphids and men: a review of aphid damage and control strategies. *Comptes Rendus Biologies* 333:539-553
- Denis C, Riudavets J, Gabarra R, Molina P, Arnó J (2021) Selection of insectary plants for the conservation of biological control agents of aphids and thrips in fruit orchards. *Bulletin of Entomological Research*. <https://doi.org/10.1017/S0007485321000183>
- Depalo L, Masetti A, Avilla J, Bosch D, Pasqualini E (2016) Toxicity and residual activity of spinetoram to neonate larvae of *Grapholita molesta* (Busck) and *Cydia*

- pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae): Semi-field and laboratory trials, Crop Protection 89:32-37
- Desneux N, Luna MG, Guillemaud T, Urbaneja A (2011a) The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: The new threat to tomato world production. Journal of Pest Science 84:403-408
- Desneux N, Pizzol J, Thomas C, Pautrat E, Bearez P, Poncet C, Tabone E, Kabiri F, Frandon J (2011b) Potential for direct interference between natural enemies of *Tuta absoluta* on tomato. Acta Horticulturae 917:31–37
- Desneux N, Wajnberg E, Wyckhuys KAG, Burgio G, Arpaia S, Narváez-Vasquez C, González-Cabrera J, Catalán Ruescas D, Tabone E, Frandon J, Pizzol J, Poncet C, Cabello T, Urbaneja A (2010) Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. Journal of Pest Science 83:197–215
- Ehler LE (1998) Conservation Biological control: past, present and future. Conservation Biological Control. ed. Barbosa P, Academic Press, San Diego, pp. 1-8
- Eilenberg J, Hajek A, Lomer C (2001) Suggestions for unifying the terminology in biological control. BioControl 46:387-400
- Eurostat. (2019) Structure of orchards in 2017. Two-thirds of the EU's fruit plantation area is concentrated in Spain, Italy and Poland. Eurostat. Available at https://ec.europa.eu/eurostat/documents/portlet_file_entry/2995521/5-21022019-AP-EN.pdf/826b6eac-e1ce-43d2-816e-062b0be9859f
- European Commission (2021) Pesticides. Available at https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides_en (accessed on 21 April 2021)

- FAO (2020) Agroecology in Europe and Central Asia - An overview. Budapest. Available at <https://doi.org/10.4060/ca8299en> (accessed on 5 May 2021)
- FAO (1975) Panel of Experts on Integrated Pest Control. Rome, Italy: FAO-UN, Meeting Rep. M/2. 41 pp.
- Fernandez-Triana J, Shaw MR, Boudreault C, Beaudin M, Broad GR (2020) Annotated and illustrated world checklist of Microgastrinae parasitoid wasps (Hymenoptera, Braconidae). *ZooKeys* 920:1–1089
- Ferracini C, Ingegno BL, Navone P, Ferrari E, Mosti M, Tavella L, Alma A (2012) Adaptación of indigenous larval parasitoids to *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Italy. *Journal of Economic Entomology* 105(4):1311-1319
- Fitzgerald JD, Solomon MG (2004) Can flowering plants enhance numbers of beneficial arthropods in UK apple and pear orchards? *Biocontrol Science and Technology* 14(3):291-300
- Gabarra R, Arnó J, Lara L, Verdú MJ, Ribes A, Beitia F, Urbaneja A Téllez MM, Mollá O, Riudavets J (2014) Native parasitoids associated with *Tuta absoluta* in the tomato production areas of the Spanish Mediterranean Coast. *BioControl* 59:45-54
- Gebiola M, Bernardo U, Ribes A, Gibson GAP (2015) An integrative study of *Necremnus* Thomson (Hymenoptera: Eulophidae) associated with invasive pests in Europe and North America: Taxonomic and ecological implications. *Zoological Journal of the Linnean Society of London* 173:352-423
- Ghoneim K (2014) Parasitic insects and mites as potential biocontrol agents for a devastating pest of tomato, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) in the world: a review. *International Journal of Advanced Research* 8(2):81-115

- Gobierno de Aragón (2020) Estadísticas Agrícolas. Resumen del sector leñosos 2015-2017. Available at <https://www.aragon.es/-/estadisticas-agricolas#anchor4> (last accessed July 2020)
- Godfray HCJ (1994) Parasitoids: Behavioral and evolutionary ecology. Princeton University Press Books, Princeton
- Gontijo LM, Beers EH, Snyder WE (2013) Flowers promote aphid suppression in apple orchards. *Biological Control* 66:8-15
- González E, Alvarado M, Verlanga E, Serrano A, de la Rosa A (1994) Daños producidos por trips en nectarinas en el Valle del Guadalquivir. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 20(1):229-241
- Grissell EE, Schauff ME (1990) A handbook of the families of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera). Washington, Entomological Society of Washington
- Gurr GM, Wratten SD, Altieri MA (2004) Ecological engineering for pest management: Advances in habitat manipulation for arthropods. CSIRO publishing, Collingwood, Vic, Australia, p. 225
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontología Electrónica* 4(1):1-9
- Hanson PE, Gauld ID (2006) Hymenoptera de la región neotropical. Gainesville, FL: American Entomological Institute 77, p. 994
- Harvey JA, Poelman EH, Tanaka T (2013) Intrinsic inter- and intraspecific competition in parasitoid wasps. *Annual Review of Entomology* 58:333-351
- Harvey JA, Wagenaar R (2006) Development of the herbivore *Pieris rapae* and its endoparasitoids *Cotesia rubecula* on crucifers of field edges. *Journal of Applied Entomology*. 130(9-10):465-470

- Haseeb M, Gordon TL, Kanga LHB, Legaspi JC (2018) Abundance of natural enemies of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) on three cultivars of sweet alyssum. *Journal of Applied Entomology* 1-7
- Hatt S, Uyttenbroeck R, Lopes T, Mouchon P, Chen J, Piqueray J, Monty A, Francis F (2017) Do flower mixtures with high functional diversity enhance aphid predators in wildflower strips? *European Journal of Entomology* 114:66-76
- He X, Kiær LP, Jensen PM, Sigsgaard L (2021) The effect of floral resources on predator longevity and fecundity: A systematic review and meta-analysis. *Biological Control*. 153, 104476. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104476>
- Heimpel G, Jervis M (2005) Does floral nectar improve biological control by parasitoids? in Wäckers, F.L., van Rijn, P.C.J. & Bruin, J. (Eds) *Plant-provided food for carnivorous insects: a protective mutualism and its applications*. Cambridge, Cambridge University Press. pp. 267-304
- Idris AB, Grafius E (1997) Nectar-collecting behavior of *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae), a parasitoid of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Environmental Entomology* 26:114-120
- Ingegno BL, Messelink GJ, Bodino N, Iliadou A, Driss L, Woelke JB, Leman A, Tavella L (2019) Functional response of the mirid predators *Dicyphus bolivari* and *Dicyphus errans* and their efficacy as biological control agents of *Tuta absoluta* on tomato. *Journal of Pest Science* 92:1457-1466
- Ingrao AJ, Schmidt J, Jubenville J, Grode A, Komondy L, VanderZee D, Szendrei Z (2017) Biocontrol on the edge: Field margin habitats in asparagus fields influence natural enemy-pest interactions. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 243: 47-54

- Irvin NA, Scarratt SL, Wratten SD, Frampton CM, Chapman RB, Tylianakis M (2006) The effects of floral understoreys on parasitism of leafrollers (Lepidoptera: Tortricidae) on apples in New Zealand. *Agricultural and Forest Entomology* 8:25-34
- Jado RH, Araj SE, Irmaileh BA, Shields MW (2018) Floral resources to enhance the potential of the parasitoids *Aphidius colemani* for biological control of the aphid *Myzus persicae*. *Journal of Applied Entomology* 143(1-2):34-42
- Jervis MA, Lee JC, Heimpel GE (2004) Use of behavioural and life-history studies to understand the effects of habitat manipulation. *In: Ecological engineering for pest management: advances in habitat manipulation for arthropods*. Gurr, Wratten & Altieri (eds.), CSIRO Publishing, Australia. pp: 65-100
- Johanowicz DL, Mitchell ER (2000) Effects of sweet alyssum flowers on the longevity of the parasitoid wasps *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae) and *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Florida Entomologist* 83(1): 41-47
- Kavallieratos NG, Tomanovic Z, Stary P, Athanassiou CG, Sarlis GP, Petrovic O, Niketic M, Veroniki MA (2004) A survey of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) of Southeastern Europe and their aphid-plant associations. *Applied Entomology and Zoology* 39(3):527-563
- Koptur S (2005) Nectar as fuel for plant protectors. *In: Wackers FL, van Rijn PCJ, Bruin J (Eds), Plant-provided food for carnivorous insects: a protective mutualism and its applications*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 75–108
- Landis DA, Menalled FD, Costamagna AC, Wilkinson TK (2005) Manipulating plant resources to enhance beneficial arthropods in agricultural landscapes. *Weed Science* 53:902-908

- Landis DA, Wratten SD, Gurr GM (2000) Habitat Management to Conserve Natural Enemies of Arthropod Pests in Agriculture. *Annual Review of Entomology* 45(1):175-201
- Larrain, P (1987) Plagas del tomate. I parte: descripción, fluctuación poblacional, daño, plantas hospederas, enemigos naturales de las plagas principales. *IPA La Platina* 39:30-35
- Loomans AJM (2006) Exploration for hymenopterous parasitoids of thrips. *Bulletin of Insectology* 59(2):69-83
- Lordan J, Alegre S, Gatiús F, Sarasúa MJ, Alins G (2014) Woolly apple aphid *Eriosoma lanigerum* Hausmann ecology and its relationship with climatic variables and natural enemies in Mediterranean areas. *Bulletin of Entomological Research* 105: 60-69
- Lundgren J. (2009) The Sugar Feeders. In: Relationships of Natural Enemies and Non-Prey Foods. *Progress in Biological Control*, vol 7. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9235-0_2
- Lykouressis D, Perdakis D, Charalampous P (2014) Plant food effects on prey consumption by the omnivorous predator *Macrolophus pygmaeus*. *Phytoparasitica* 42:303-309
- Magurran AE (2004) *Measuring biological diversity*. Blackwell, Oxford, United Kingdom, 256 p.
- Mansour R, Brévault T, Chailleux A, Cherif A, Grissa-Lebdi K, Haddi K, Mohamed SA, Nofemela RS, Oke A, Sylla S, Tonnang HEZ, Zappalà L, Kenis M, Desneux N, Biondi A (2018) Occurrence, biology, natural enemies and management of *Tuta absoluta* in Africa. *Entomologia Generalis* 38(2):83-112

- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). (2020) Available at <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticasagrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/> (accessed on 21 March 2020).
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). (2021) Available at <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/produccioneco/default.aspx> (accessed on 02 May 2021).
- Marsh PM (1975) A new species of *Apanteles* from South America being introduced into California. *The Pan-Pacific Entomologist* 51:143-146
- Miñarro M, Hemptinne JL, Dapena E (2005) Colonization of apple orchards by predators of *Dysaphis plantaginea*: sequential arrival, response to prey abundance and consequences for biological control. *BioControl* 50:403-414
- Mirchev P, Georgiev G, Tsankov G (2001) Studies on the parasitoids of *Gelechia senticetella* (Stgr.) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Bulgaria. *Journal of Pest Science* 74:94-96
- Mitsunaga T, Yano E (2004) The effect of multiple parasitism by an endoparasitoid on several life history traits of leafminer ectoparasitoides. *Applied Entomology and Zoology* 39(2): 315-320
- Moonen AC, Bàrberi P (2008) Functional biodiversity: An agroecosystem approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 127:7-21
- Morales J, Rodríguez D, Cantor F (2013) Estandarización de la cría masiva de *Apanteles gelechiidivoris* Marsh (Hymenoptera: Braconidae) para el control de *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 9:20-37

- Naranjo SE (2008) Sampling arthropods. In: Capinera J.L. (eds) Encyclopedia of Entomology. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6_4014
- Naselli M, Biondi A, Tropea Garzia G, Desneux N, Russo A, Siscaro G & Zappalà L (2017) Insights into food webs associated with the South American tomato pinworm. *Pest Management Science* 73:1352-1357
- Nave A, Gonçalves F, Crespí AL, Campos M, Torres L (2016) Evaluation of native plant flower characteristics for conservation biological control of *Prays oleae*. *Bulletin of Entomological Research* 106:249-257
- Oliveira L, Duraõ AC, Fontes J, Roja IS, Tavares J (2017) Potential of *Trichogramma achaeae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Biological Control of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Azorean Greenhouse Tomato Crops. *Journal of Economic Entomology* 1-6 doi: 10.1093/jee/tox197
- Pandey S, Rahman A, Gurr GM (2018) Australian native flowering plants enhance the longevity of three parasitoids of brassica pests. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 166:265-276
- Papp N (2004) Nectar and nectary studies on seven *Euphorbia* species. *Acta Botanica Hungarica* 46(1-2):225-234
- Patt JM, Hamilton GC, Lashomb JH (1997) Foraging success of parasitoids wasps on flowers: interplay of insect morphology, floral architecture and searching behaviour. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83(1):21-30
- Penvern S, Bellon S, Fauriel J, Sauphanor B (2010) Peach orchard protection strategies and aphid communities: Towards an integrated agroecosystem approach. *Crop Protection* 29(10):1148-1156

- Perdikis D, Lykouressis D (2000) Effects of various items, host plants, and temperatures on the development and survival of *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hemiptera: Miridae). *Biological Control* 17:55-60
- Péricart J (1972) Hémiptères, Anthocoridae, Cimicidae et Microphsidae de l'ouest-paléartique. Paris, Masson Et C^{ie}; Editeurs
- Pfiffner L, Cahenzli F, Steinemann B, Jamar L, Bjørn MC, Porcel M, Tasin M, Telfser J, Kelderer M, Lisek J, Sigsgaard L (2019) Design, implementation and management of perennial flower strips to promote functional agrobiodiversity in organic apple orchards: A pan-European study. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 278:61-71
- Picó FX, Retana J (2001) The flowering pattern of the perennial herb *Lobularia maritima*: an unusual case in the Mediterranean basin. *Acta Oecologica* 22:209-217
- Pinheiro LA, Torres L, Raimundo J, Santos SAP (2013) Effect of floral resources on longevity and nutrient levels of *Episyrphus balteatus* (Diptera: Syrphidae). *Biological Control* 67:178-185
- Pizzol J, Reynaud P, Bresch C, Rabasse J, Biondi A, Desneux N, Parolin P, Poncet C (2017) Diversity of Thysanoptera species and associated host plants in Southern France. *Journal of Mediterranean Ecology* 15:13-27
- Polis GA, Myers CA, Holt RD (1989) The ecology and evolution of intraguild predation: Potential competitors that eat each other. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 20:297-330
- Portillo N, Alomar O, Wäckers F (2012) Nectarivory by the plant-tissue feeding predator *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Heteroptera: Miridae): Nutritional redundancy or nutritional benefit?. *Journal of Insect Physiology* 58(3):397-401

- Pumariño L, Alomar O (2012) The role of omnivory in the conservation of predators: *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae) on sweet alyssum. *Biological Control* 62:24-28
- Riudavets J, Castañé C (1994) Abundance and host plant preferences for oviposition of *Orius* spp. (Heteroptera: Anthocoridae) along the Mediterranean coast of Spain. *IOBC/WPRS Bulletin* 17(5):230-236
- Rodríguez-Gasol N, Avilla J, Aparicio Y, Arnó J, Gabarra R, Riudavets J, Alegre S, Lordan J, Alins G (2019) The contribution of surrounding margins in the promotion of natural enemies in Mediterranean apple orchards. *Insects* 10(5), 148.
- Roland J, Taylor PD (1997) Insect parasitoid species respond to forest structure at different spatial scales. *Nature* 386(6626):710-713
- Rosenheim JA, Kaya HK, Ehler LE, Marois JJ, Jaffee BA (1995) Intraguild predation among biological-control agents: Theory and evidence. *Biological Control* 5:303-335
- Roy H, Lawson Handley LJ, Schonrogge K, Poland R, Purse B. (2011) Can the enemy release hypothesis explain the success of invasive alien predators and parasitoids? *BioControl* 56:451-468
- Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, Eliceiri KW (2017) ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18:529
- Russell Lenth (2020) emmeans: estimated marginal means, aka least-squares means. R package version 1.5.1. <https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/index.html>.

- Sakaltaş E, Tüzün A (2014) Contribution to the knowledge of the *Aprostocetus* Westwood, 1833 (Hymenoptera: Tetrastichinae) from Kırıkkale and Çankırı (Turkey) with some new records. *Türk Entomol Derg* 38:415-426
- Salas Gervassio NG, Aquino D, Vallina C, Biondi A, Luna MG (2019) A re-examination of *Tuta absoluta* parasitoids in South America for optimized biological control. *J Pest Sci* 92:1343–1357. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-01078-1>
- Shanker C, Mohan M, Sampathkumar M, Lydia Ch, Katti G (2013) Selection of flowering forbs for conserving natural enemies in rice fields. *Biocontrol Science and Technology* 23(4):480-484
- Tarusikirwa VL, Machekano H, Mutamiswa R, Chidawanyika F, Nyamukondiwa C (2020) *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) on the “Offensive” in Africa: Prospects for Integrated Management Initiatives. *Insects* 11:764
- Teulon DAJ, Davidson MM, Nielsen M, Butler R, Bosch D, Riudavets J, Castañé C (2018) Efficacy of a non-pheromone semiochemical for trapping of western flower thrips in the presence of competing plant volatiles in a nectarine orchard. *Spanish Journal of Agricultural Research* 16(3), e10SC01
- Thomson LJ, Sharley DJ, Hoffmann AA (2007) Beneficial organisms as bioindicators for environmental sustainability in the grape industry in Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 47:404–411
- Thomson LJ & Hoffmann AA (2006) Field validation of laboratory derived IOBC toxicity ratings for natural enemies in commercial vineyards. *Biological Control* 39:507-515
- Tompkins JML, Wratten SD, Wäckers FL (2010) Nectar to improve parasitoid fitness in biological control: Does the sucrose:hexose ratio matter? *Basic and Applied Ecology* 11:264-271

- Torá R (2006) Resultados del control mediante la técnica de confusión sexual de plagas de frutales en Cataluña. *Phytoma* 183
- Trdan S, Andjus L, Raspudic E, Kac M (2005) Distribution of *Aeolothrips intermedius* Bagnall (Thysanoptera: Aeolothripidae) and its potential prey Thysanoptera species on different cultivated host plants. *Journal of Pest Science* 78:217-226
- Urbaneja A, González-Cabrera J, Arnó J, Gabarra R. (2012) Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. *Pest Management Science* 68:1215-1222
- Urbaneja A, Montón H, Mollá O (2009) Suitability of the tomato borer *Tuta absoluta* as prey for *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis*. *Journal of Applied Entomology* 133: 292-296
- Urbaneja A, Vercher R, Navarro V, García-Marí F, Porcuna JL (2007) La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. *Phytoma España* 194:16-23
- Urbaneja-Bernat P, Mollá O, Alonso M, Bolkcmans K, Urbaneja A, Tena A (2015) Sugars as complementary alternative food for the establishment of *Nesidiocoris tenuis* in greenhouse tomato. *Journal of Applied Entomology* 139:161-167
- Vallejo FA (1999) Mejoramiento genético y producción de tomate en Colombia. Universidad Nacional de Colombia. pp. 216
- Venables WN, Ripley BD (2002) *Modern applied statistics with S*. Springer, New York. Fourth Edition.
- Villa M, Santos SAP, Mexia A, Bento A, Pereira JA (2017) Wildflower resources and insect honey are potential food items for *Elasmus flabellatus*. *Agronomy for Sustainable Development* 37:15

- Villaverde JJ, Sevilla-Morán B, Sandín-España P, López-Goti C, Alonso-Prados J (2013) Biopesticides in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009. *Pest Management Science* 70:2-5
- Wäckers FL (2004) Assessing the suitability of flowering herbs as parasitoid food sources: flower attractiveness and nectar accessibility. *Biological Control* 29:307-314
- Wäckers FL (2005) Suitability of (extra-)floral nectar, pollen, and honeydew as insect food sources. pp. 17-74 in Wäckers FL, van Rijn PCJ, Bruin J (Eds) *Plant-provided food for carnivorous insects: a protective mutualism and its applications*. Cambridge, Cambridge University Press
- Wäckers FL, van Rijn PCJ (2012) “Pick and Mix: selecting flowering plants to meet the requirements of target biological control insects,” In: *Biodiversity and Insect Pests: Key issues for sustainable management*. eds Gurr GM, Wratten SD, Snyder WE, Read DMY (Chichester: Wiley), 139-165
- Wan NF, Ji XY, Gu XJ, Jiang JX, Wu JH, Li B (2014a) Ecological engineering of ground cover vegetation promotes biocontrol services in peach orchards. *Ecology Engineering* 64:62–65
- Wan NF, Ji XY, Gu XJ, Jiang JX (2014b) Testing the enemies hypothesis in peach orchards in two different geographic areas in Eastern China: The role of ground cover vegetation. *PLOS ONE* 9:6
- Westphal C, Vidal S, Horgan FG, Gurr GM, Escalada M, Chien HV, Tschardtke T, Heong KL, Settele J (2015) Promoting multiple ecosystem services with flower strips and participatory approaches in rice production landscapes. *Basic and Applied Ecology* 16:681-689

- Willer H, Lernoud J (2019) The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends. 20 Eds. Research Institute of Organic Agriculture FiBL and IFOAM Organics International, Frick and Bonn. Available at <https://shop.fibl.org/chde/2020-organic-world-2019.html>
- Wickham H (2016) ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer, New York
- Winkler K, Helsen H, Devkota BH (2007) Predatory bugs show higher abundance close to flower strips in pear orchards. Proceedings of Netherlands Entomology Society Meeting 18:31-36
- Winkler K, Wäckers FL, Kaufman LV, Larraz V, van Lenteren JC (2009) Nectar exploitation by herbivores and their parasitoids is a function of flower species and relative humidity. Biological Control 50:299-306
- Xiaoyi W, Zhongqi Y (2008) Behavioral mechanisms of parasitic wasps for searching concealed insect hosts. Acta Ecologica Sinica 28(3):1257-1269
- Zappalà L, Biondi A, Alma A, Al-Jboory IJ, Arnó J, Bayram A, Chailleux A, El-Arnaouty A, Gerling D, Guenaoui Y, Shaltiel-Harpaz L, Siscaro G, Stavrínides M, Tavella L, Vercher Aznar R, Urbaneja A, Desneux N (2013) Natural enemies of the South American moth, *Tuta absoluta*, in Europe, North Africa and Middle East, and their potential use in pest control strategies. Journal of Pest Science 86:635-647