



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

Rafael Moreno Ripoll

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

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

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



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL

FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Programa de doctorado de Biología Animal
Bienio 2005-2007

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

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

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

Directoras

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

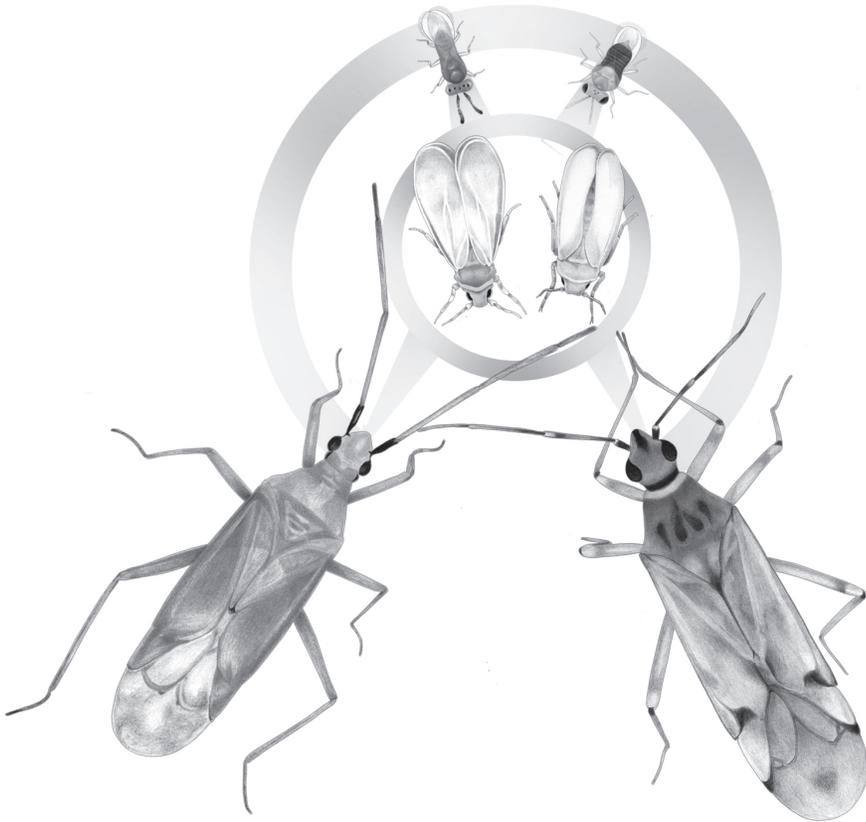
Dra. Núria Agustí Abella
Investigadora de Entomología
IRTA – Centro de Cabrils

Tutora

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

Capítulo 1

Análisis molecular de la depredación de *Macrolophus pygmaeus* y *Nesidiocoris tenuis* sobre las moscas blancas y sus parasitoides en el cultivo de tomate



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

1. Introducción

El control biológico (CB) en los cultivos hortícolas intensivos está normalmente basado en la inoculación y/o conservación de depredadores y parasitoides (Albajes y Alomar, 1999). En los cultivos de tomate del área mediterránea dos moscas blancas, *Bemisia tabaci* Gennadius y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae), son dos de las principales plagas. Éstas pueden causar una reducción significativa en la producción del cultivo, bien por su alimentación directa de la planta o mediante producción de melazas sobre las cuales se desarrollan hongos saprófitos. Estos hongos impiden la fotosíntesis y la respiración de la planta y hacen que los frutos no sean aptos para su comercialización. Estas dos moscas blancas también son transmisoras de virus que afectan a los cultivos hortícolas de invernadero por todo el mundo. En concreto *B. tabaci* transmite la enfermedad del rizado amarillo del tomate, causante de grandes pérdidas en los cultivos de tomate (Gabarra y Besri, 1999; Avilla *et al.*, 2004).

Para controlar estas dos plagas se utilizan dos depredadores polípagos, *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) y *Nesidiocoris tenuis* Reuter (Heteroptera: Miridae), lo cuales han demostrado su eficacia reduciendo las poblaciones de moscas blancas en invernadero (Albajes *et al.*, 2003; Calvo *et al.*, 2009). Hasta hace poco los *M. pygmaeus* encontrados en el cultivo de tomate han sido identificados como *M. caliginosus* Wagner (= *M. melanotoma* (Costa)) y aún es denominado de este modo por los productores que lo comercializan (Martínez-Cascales *et al.*, 2006). Debido a esta errónea identificación, consideramos que mucha de la literatura previa referida a *M. caliginosus* en tomate se refiere a *M. pygmaeus*.

Macrolophus pygmaeus y *N. tenuis* colonizan espontáneamente los cultivos de tomate de la cuenca mediterránea cuando se reduce la aplicación de insecticidas y cuando se aplican programas de control integrado (CIP) (Castañé *et al.*, 2004). Otros enemigos naturales utilizados para el control de las moscas blancas son los parasitoides. En cultivos de tomate bajo CIP del noreste de España aparecen abundantes poblaciones de los parasitoides *Eretmocerus mundus* (Mercet) y *Encarsia pergandiella* Howard (Hymenoptera: Aphelinidae) (Gabarra *et al.*, 1999; Arnó *et al.*, 2005). *Eretmocerus*

mundus es un parasitoide específico de *B. tabaci*, mientras que *E. pergandiella* es un parasitoide tanto de *B. tabaci* como de *T. vaporariorum*. Por lo tanto, en los cultivos de tomate de esta zona es fácil encontrar las dos especies de mosca blanca, las dos de parasitoides y las dos de depredadores. Estos enemigos naturales pueden interactuar entre ellos y su uso conjunto podría tener un efecto aditivo, sinérgico positivo o negativo en el control de estas especies plaga. Por esta razón el estudio de las redes tróficas es esencial. Así pues, un mejor conocimiento de las relaciones tróficas y de la capacidad de control de estos enemigos naturales podría ayudar a mejorar las estrategias de control de las moscas blancas.

En condiciones de campo la elección de las presas por parte de un depredador es de difícil cuantificación mediante observación directa, y es aún más difícil cuando intervienen especies crípticas. Aparte de la observación directa, la depredación sobre las moscas blancas se ha basado normalmente en el recuento de las pupas depredadas (Castañé *et al.*, 2004), pero este recuento evalúa la depredación acumulada en el tiempo. Mediante esta metodología, cuando hay más de un depredador en el cultivo es imposible determinar cuál de ellos ha consumido la presa. Un método alternativo es el examen microscópico del contenido estomacal para identificar los restos de presa dentro del depredador, pero esto es posible sólo si en el digestivo hay restos sólidos reconocibles. Algunos depredadores artrópodos, como los míridos, poseen un aparato vocal chupador, lo cual imposibilita el reconocimiento de las presas ingeridas. Por otra parte, la depredación sobre las ninfas de mosca blanca parasitadas es aún más difícil de detectar, incluso mediante disección, debido a la dificultad de observar restos de los estadios jóvenes del parasitoide. Por estas razones, en los últimos años se han desarrollado diversas técnicas moleculares para estudiar los restos de presa dentro del digestivo de los depredadores, las cuales se han basado en la identificación de proteínas específicas o de secuencias de ADN de la presa (Symondson, 2002). Hoy día, la técnica más utilizada para analizar restos de presas es la utilización de marcadores moleculares específicos de éstas, con los cuales se puede determinar qué depredador las ha ingerido (King *et al.*, 2008). Esta técnica se ha utilizado exitosamente también para detectar ADN de los parasitoides dentro de los huéspedes (Agustí *et al.*, 2005; Traugott y Symondson, 2008). El estudio de la depredación y del parasitismo mediante

la detección molecular, es actualmente una técnica cada vez más utilizada en estudios de campo (Agustí *et al.*, 2003; Harper *et al.*, 2005; Harwood *et al.*, 2007; Juen y Traugott, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Kuusk *et al.*, 2008). Sin embargo, sólo uno de estos estudios ha abordado la depredación sobre especies plaga y sus parasitoides (Traugott y Symondson, 2008) y ninguno de ellos ha sido realizado bajo condiciones de campo.

Por ello, el objetivo de este capítulo es realizar un estudio molecular en condiciones de campo de las interacciones existentes entre las diferentes especies del ecosistema y proporcionar de este modo información también aplicable a otras redes tróficas. Nuestra hipótesis es la de que los depredadores y los parasitoides pueden interactuar negativamente y pueden reducir el impacto de estos enemigos naturales sobre la especie plaga.

2. Material y métodos

2.1. Insectos

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

2.2. Diseño de cebadores y extracción y amplificación de ADN

Se diseñaron dos pares de marcadores específicos para *B. tabaci* y *T. vaporariorum* (Bt2F/Bt3R y Tv1F/Tv1R respectivamente) a partir de la región mitocondrial de la citocromo oxidasa I (COI). Para el diseño de los marcadores específicos de *B. tabaci* se

utilizaron las siguientes secuencias obtenidas de la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov): AM691052 (*B. tabaci*), AF418672 y AF110708 (*T. vaporariorum*), AY842502 (*Aphis gossypii*) y DQ059302 (*Helicoverpa armigera*). Para diseñar los marcadores de *T. vaporariorum* se utilizaron las secuencias AY521259 (*B. tabaci*), AY521265 (*T. vaporariorum*), AY227082 (*Aphis gossypii*) y AY437834 (*Helicoverpa armigera*). Se diseñaron otros dos pares de marcadores específicos para *E. mundus* y *E. pergandiella* (Em2F/Em1R y Ep1F/Ep1R, respectivamente) a partir de la región no codificante 1 (ITS-1) utilizando las siguientes secuencias: AY854061 (*B. tabaci*), AY854055 (*T. vaporariorum*), AF273635 (*E. mundus*) y AY615778 (*E. pergandiella*). Las secuencias se alinearon utilizando el programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Para diseñar los marcadores de *B. tabaci* se utilizó el programa AMPLICON (Jarman, 2004). El resto de marcadores fueron diseñados tal como se describe en Agustí *et al.* (2003).

El ADN se extrajo a partir insectos individualmente mediante el *DNeasy Tissue Kit* de QIAGEN (protocolo para tejidos animales). El ADN total se diluyó en 100 µl de tampón AE y fue conservado a -20°C. Se utilizaron controles negativos en cada extracción de ADN. Las muestras se amplificaron en un termociclador 2720 (Applied Biosystems). Los volúmenes utilizados en cada reacción (25 µl) contenían 4µl de ADN resuspendido. Todos los cebadores se amplificaron utilizando 0,65 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen), 0,25 mM de dNTPs (Promega), 0,4 µM de cada cebador y 1,5 mM (Em2F/Em1R), 3 mM (Bt2F/Bt3R y Tv1F/Tv1R) o 6 mM (Ep1F/Ep1R) de MgCl₂ en tampón 10×. Las muestras se amplificaron en 35 ciclos (excepto para Ep1F/Ep1R, 40 ciclos) a 94°C durante 30 s; a 63°C (Tv1F/Tv1R), 62°C (Em2F/Em1R) o 58°C (Bt2F/Bt3R y Ep1F/Ep1R) durante 30 s; y 72°C durante 40 s. También hubo un primer ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 min, y otro de extensión final a 72°C durante 5 min. En todas la reacciones se utilizó ADN de la especie diana como control positivo y agua como control negativo. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz ultravioleta.

2.3. Especificidad y periodos de detección

Al menos 10 individuos de cada especie diana fueron utilizados para comprobar la especificidad de los marcadores moleculares. En el caso de *B. tabaci* se analizaron 10 individuos de cada biotipo B y Q, que son los más comunes en la zona de estudio (Moya *et al.*, 2001). Para comprobar la especificidad de las cuatro parejas de cebadores, éstos se probaron utilizando ADN de 10 individuos de cada especie de presa, parasitoide y depredador potencialmente presentes en diversos cultivos hortícolas de la zona de estudio (tabla 1.1). También se comprobó la ausencia de amplificación del ADN de *E. kuehniella*, que fue utilizada como presa en la cría de los depredadores.

Tabla 1.1. Especies de presa, depredador y parasitoide analizadas para comprobar la especificidad de los cebadores descritos en la tabla 2.

Grupo	Orden	Familia	Especie
Presa	Acari	Tetranychidae	<i>Tetranychus urticae</i> Koch
	Diptera	Agromyzidae	<i>Liriomyza trifolii</i> (Burgess)
	Homoptera	Aleyrodidae	<i>Aleyrodes proletella</i> (Linnaeus)
			<i>Bemisia tabaci</i> Gennadius
			<i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Westwood)
			<i>Aphis gossypii</i> Glover
			<i>Nasonovia ribisnigri</i> (Mosley)
	Lepidoptera	Noctuidae	<i>Chrysodeixis chalcites</i> (Esper)
			<i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner)
			<i>Autographa gamma</i> Linnaeus
Thysanoptera	Pyralidae	<i>Ephestia kuehniella</i> Zeller	
	Thripidae	<i>Frankliniella occidentalis</i> (Pergande)	
Depredador	Diptera	Cecidomyiidae	<i>Aphidoletes aphidimyza</i> (Rondani)
	Hemiptera	Anthocoridae	<i>Orius laevigatus</i> (Fieber)
			<i>Orius majusculus</i> (Reuter)
			<i>Dicyphus tamaninii</i> Wagner
	Heteroptera	Miridae	<i>Macrolophus pygmaeus</i> (Rambur)
			<i>Nesidiocoris tenuis</i> Reuter
Parasitoide	Hymenoptera	Aphelinidae	<i>Encarsia formosa</i> Gahan
			<i>Encarsia pergandiella</i> Howard
			<i>Eretmocerus eremicus</i> Rose y Zolnerowich
			<i>Eretmocerus mundus</i> (Mercet)
		Braconidae	<i>Aphidius colemani</i> Viereck
			<i>Habrobracon hebetor</i> (Say)
			<i>Diglyphus isaea</i> (Walker)
Trichogrammatidae	<i>Trichogramma evanescens</i> Westwood		

Para conocer cuán eficientes eran los marcadores moleculares detectando el ADN dentro del depredador a lo largo del tiempo, se realizaron dos tipos de ensayos de depredación con *M. pygmaeus* y *N. tenuis*:

a) Ensayo de depredación corto (<2,5h). Se colocaron hembras individualmente en cajas transparentes de plástico de 2,5 cm de diámetro con un disco de hoja de tomate del mismo diámetro sobre una capa de agar (5‰) de 0,5 cm de grosor. Después de mantener a las hembras 24 horas en las cajas sin presa a 25°C, se introdujeron 4 pupas de mosca blanca (*B. tabaci* o *T. vaporariorum*) o 4 parasitoides adultos (*E. mundus* o *E. pergandiella*). Se permitió que los depredadores consumieran las presas durante un máximo de 2,5h a temperatura ambiente. Aquellos que consumieron entre 3-4 presas fueron congelados inmediatamente (t=0h) o mantenidos individualmente sin presa a 25 °C durante 4 h (t=4h) y congelados posteriormente a -20 °C hasta que se analizaron. En este caso (t=4h), estos ensayos de depredación se realizaron también con ninfas de 5° estadio.

b) Ensayo de depredación largo (24h). Con la intención de simular las condiciones de campo, se colocaron hembras ayunadas durante 24h a 25°C en cajas de plástico de 5 cm de diámetro con un disco de hoja de tomate del mismo diámetro sobre una capa de agar (5‰) de 0,5 cm de grosor. Posteriormente se introdujeron en las cajas 30 pupas de *B. tabaci* sin parasitar o parasitadas por pupas de *E. mundus* y se permitió que los depredadores las consumieran durante 24h a temperatura ambiente. Después de esto, se contaron las pupas depredadas. Únicamente se utilizaron las hembras que consumieron entre 5 y 25 presas, congelándolas inmediatamente (t=0) o manteniéndolas individualmente sin presas a 25°C durante 4h (t=4h) y congelándolas posteriormente a -20°C hasta el análisis.

Entre 7 y 10 individuos de cada especie de depredador se analizaron para cada periodo de tiempo. Cada depredador fue analizado tres veces y considerado positivo si el ADN de la presa era detectado en uno de los análisis.

2.4. Muestreo de campo y análisis de depredadores

Se muestrearon las poblaciones de míridos depredadores, moscas blancas y parasitoides en 8 invernaderos localizados cerca de Barcelona entre mayo y octubre. Para determinar su abundancia, el número de adultos de moscas blancas, así como las ninfas y adultos de cada especie de depredador, se muestrearon 10 foliolos por planta en 30 plantas en cada invernadero. Para conocer la abundancia de pupas de mosca blanca y de parasitoides, en cada invernadero se recogieron 30 foliolos de aquellas hojas en las que los adultos de mosca blanca estaban a punto de emerger. Las pupas fueron posteriormente examinadas bajo lupa binocular en el laboratorio y clasificadas como vivas, consumidas, o parasitadas. Las pupas consumidas son fácilmente diferenciables de la depredación parcial o de otras causas de mortalidad, debido al consumo completo del interior de la pupa producido por los depredadores chupadores, que dejan la cutícula vacía sin hueco de emergencia (Castañé *et al.*, 2004) y las pupas parasitadas se pueden diferenciar por su cambio de color, tornándose marrones las parasitadas por *E. mundus* y amarillas las parasitadas por *E. pergandiella* (Gabarra *et al.*, 1999; Malo, 2009) En cada invernadero (excepto en el A) se recolectaron *M. pygmaeus* y *N. tenuis* y se transfirieron inmediatamente a 4°C hasta la llegada al laboratorio donde fueron congelados a -20°C. Cada depredador fue analizado tres veces mediante PCR y considerado positivo si el ADN de la presa era detectado al menos en uno de estos análisis. Con estos resultados se calcularon los porcentajes de detección molecular de cada presa para ninfas, machos y hembras de cada especie de depredador en cada invernadero, así como el porcentaje de cada depredador que resultó positivo para las distintas combinaciones de presas.

La detección molecular de las moscas blancas obtenida para cada depredador en cada invernadero se comparó con la cantidad de pupas y adultos de mosca blanca en dichos invernaderos. Para ello, se sumaron las abundancias de pupas de moscas blancas parasitadas y no parasitadas, debido a que el ADN de las moscas blancas también puede ser detectado en las pupas parasitadas dependiendo del estadio de desarrollo del parasitoide (ver capítulo 2). Por otra parte, la detección molecular de los parasitoides en *M. pygmaeus* se comparó con la abundancia de pupas parasitadas en cada invernadero. También la detección de moscas blancas en los depredadores se comparó

con la cantidad pupas de moscas blancas depredadas en cada invernadero. Debido a que no es posible determinar cuál de las dos especies depredadoras ha depredado las pupas de mosca blanca cuando ambos depredadores están presentes, para hacer esta comparación se sumó el número de depredadores positivos de ambas especies.

Para evaluar la relación entre la detección molecular y el número de pupas y adultos de mosca blanca disponible, así como con el número de pupas parasitadas y depredadas, se realizaron análisis de regresión. Los datos fueron transformados logarítmicamente. Se utilizó el paquete SAS (SAS Enterprise Guide 4.1).

Para determinar si la detección molecular de la presa dependía del estadio o del sexo del depredador, se compararon los porcentajes de detección de las presas entre machos y hembras, así como entre adultos y ninfas en cada especie de depredador. Los porcentajes de depredadores positivos para cada presa se calcularon considerando únicamente a aquellos depredadores recolectados en los invernaderos donde la presa diana estaba presente. También se compararon los porcentajes de depredadores positivos de ambas especies recolectados en el invernadero H, donde ambos depredadores y las dos especies de mosca blanca estaban presentes. Para realizar estas comparaciones se hizo un test de Fisher utilizando el paquete SAS (SAS Enterprise Guide 4.1).

3. Resultados

3.1. Especificidad y periodos de detección

Los marcadores moleculares que se diseñaron para *B. tabaci*, *T. vaporariorum*, *E. mundus* y *E. pergandiella* (tabla 1.2) amplificaron el ADN de estas presas diana en todos los casos (fig. 1.1). En el caso de los marcadores de *B. tabaci*, éstos amplificaron individuos de ambos biotipos B y Q. Cuando se comprobó la especificidad de los marcadores moleculares utilizando otras presas potenciales (26 especies pertenecientes a 14 familias, ver tabla 1.1), únicamente se detectó el ADN de la presa diana, demostrando su alta especificidad.

Tabla 1.2. Secuencia (5'-3') de los cebadores específicos de las moscas blancas y de los parasitoides, tamaño del fragmento que amplifican y región utilizada para su diseño.

Especie diana	Cebador	Secuencia	Tamaño (pb)	Región
<i>B. tabaci</i>	Bt2 F	TTGGTGTCTCAATTTTATATC	158	COI
	Bt3R	ATACTCAAAATCCTTCCCGC		
<i>T. vaporariorum</i>	Tv1 F	TCTCACAGGGGTGATTTTG	187	COI
	Tv1R	CTGGGAAAGAAGAAGGTAAAA		
<i>E. mundus</i>	Em2 F	C G T A T G C G G A T A A C A A C G C	345	ITS-1
	Em1 R	GAACTCGCAAGAGCTCGAAC		
<i>E. pergandiella</i>	Ep1 F	ACGCAAGTCGTACCGATGAG	314	ITS-1
	Ep1R	AAACGTAAC TTTGACGACGC		

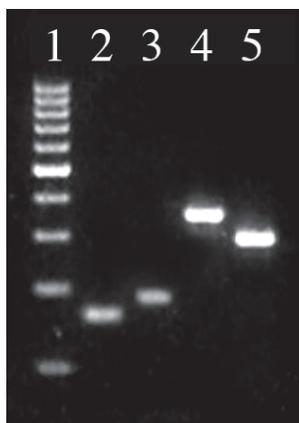


Fig. 1.1. Productos de PCR obtenidos con los cebadores específicos de las cuatro presas diana. Carril 2, *Bemisia tabaci* (158 pb); 3, *Trialeurodes vaporariorum* (187 pb); 4, *Eretmocerus mundus* (345 pb); 5, *Encarsia pergandiella* (314 pb). Carril 1, marcador de 100 pb.

Cuando estos cebadores se utilizaron para detectar la presa ingerida por los depredadores en laboratorio (3-4 presas ingeridas en 2,5h), todas las hembras resultaron positivas para las cuatro presas ensayadas a t=0h (justo después de ser ingeridas). La detección después de cuatro horas a 25°C fue variable pero nunca menor del 80 % (tabla 1.3). Cuando se hicieron las pruebas de depredación en condiciones más similares a las de campo (12 ± 0,6 presas ingeridas en 24h), la detección molecular de *B. tabaci* y *E. mundus* fue menor que en el caso anterior para ambos depredadores, lo que era de esperar debido a la mayor duración de la prueba (24h). Los porcentajes de

detección de *B. tabaci* y *E. mundus* fueron similares (siempre ligeramente superiores para *B. tabaci*), y siempre mayores para *M. pygmaeus* que para *N. tenuis*, tanto a t=0 como a t=4h. El porcentaje de detección disminuyó cerca de un 20 % entre t=0h y t=4h en ambos depredadores, lo cual fue mucho más acusado que cuando se les alimentó únicamente durante 2,5h (tabla 1.3).

Tabla 1.3. Porcentajes de detección de las presas en las hembras y ninfas de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* a t=0h y t=4h, (a) 1-4 individuos ingeridos en 2,5h; (b) 12 ± 06 individuos ingeridos durante 24h.

Presa	(a) 2,5h						(b) 24h			
	<i>M. pygmaeus</i>			<i>N. tenuis</i>			<i>M. pygmaeus</i>		<i>N. tenuis</i>	
	Hembras		Ninfas	Hembras		Ninfas	Hembras		Hembras	
	0h	4h	4h	0h	4h	4h	0h	4h	0h	4h
<i>B. tabaci</i>	100	80	80	100	100	90	70	50	40	20
<i>T. vaporariorum</i>	100	100	80	100	90	90	-	-	-	-
<i>E. mundus</i>	100	100	90	100	100	90	63	44	38	14
<i>E. pergandiella</i>	100	100	100	100	80	90	-	-	-	-

3.2. Análisis de depredadores

3.2.1. Abundancia de depredadores y presas y detección molecular de presas

La abundancia de depredadores y de presas en los 8 invernaderos muestreados se muestra en la tabla 1.4. *Macrolophus pygmaeus* se encontró en todos los invernaderos muestreados (el invernadero A no sé evaluó la abundancia, aunque se recogieron depredadores para el análisis molecular), mientras que *N. tenuis* se encontró sólo en 4 invernaderos. Las ninfas de los depredadores fueron siempre más numerosas que los adultos, excepto en el invernadero G para *N. tenuis*. Respecto a las moscas blancas, los adultos de *T. vaporariorum* fueron más abundantes que los de *B. tabaci* en 4 de los invernaderos, mientras que la abundancia de pupas de *T. vaporariorum* fue mayor en 6 de ellos. La abundancia de pupas parasitadas por *E. mundus* y *E. pergandiella* fue baja, excepto en el invernadero A, donde la presencia de *E. pergandiella* alcanzó una densidad de $34,6 \pm 8,81$ pupas por foliolo.

Los porcentajes de detección de presa obtenidos mediante PCR en los 8 invernaderos muestreados se encuentran en la tabla 1.5. Se recolectaron depredadores en cada invernadero, pero se analizaron mediante PCR únicamente los depredadores de aquellos invernaderos en los que se recolectaron más de catorce individuos. Por ello, aunque se observaron *M. pygmaeus* y *N. tenuis* en los invernaderos E y F respectivamente, no se realizó el análisis molecular. Todas las especies de presa fueron detectadas molecularmente en ambas especies de depredador. Se detectó presa en el 39 % (n = 142) de los *M. pygmaeus* y en el 46 % (n = 61) de los *N. tenuis* analizados. La detección molecular de *B. tabaci* y *T. vaporariorum* se obtuvo en todos los invernaderos en los que estas especies estaban presentes, excepto en dos casos: no se detectó *B. tabaci* en el invernadero C (donde sólo se observaron pupas de esta especie); y no se detectó *T. vaporariorum* en el invernadero E (donde sólo se observaron adultos y con la menor abundancia) (tabla 1.4). Sin embargo, bajo lupa binocular sólo se observaron pupas depredadas de *B. tabaci* en 2 de los 7 invernaderos en los que estaba presente. Por lo tanto, en este caso la detección molecular fue más sensible que la observación bajo lupa ya que mostró depredación de *M. pygmaeus* sobre *B. tabaci* en 4 invernaderos en los que no fue posible observarla bajo lupa. En aquellos invernaderos en los que *M. pygmaeus* y *N. tenuis* estaban presentes y fueron recolectados en suficiente número (más de 14 individuos) (G y H), el análisis molecular permitió conocer qué especie de mosca blanca había sido consumida por cada especie de depredador. Por otra parte, la depredación sobre *E. mundus* fue detectada molecularmente en todos los invernaderos en los que este parasitoide estaba presente (F y H) (tablas 1.4 y 1.5), mientras que la depredación sobre *E. pergandiella* fue detectada sólo en 3 de los 5 invernaderos en los que estaba presente. Aparte, en 2 invernaderos se detectó molecularmente al parasitoide incluso cuando éste no fue observado bajo lupa (*E. pergandiella* en el invernadero G y *E. mundus* en el D).

Tabla 1.4. Abundancia de los depredadores y las presas (media \pm SE) en los 8 invernaderos estudiados. Bt = *B. tabaci*, Tv = *T. vaporariorum*, Em = *B. tabaci* parasitada por *E. mundus*, Ep = *T. vaporariorum* parasitada por *E. pergandiella*.

Invernadero	Abundancia de depredador				Abundancia de presa					
	<i>M. pygmaeus</i> / planta		<i>N. tenuis</i> / planta		Adultos / planta		Pupas / foliolo			
	Adultos	Ninfas	Adultos	Ninfas	Bt	Tv	Em	Tv	Ep	
A	-	-	-	-	-	-	0	7,5 \pm 1,63	34,6 \pm 8,81	
B	0,2 \pm 0,12	1,2 \pm 0,26	0	0	0	3,8 \pm 0,93	0,3 \pm 0,17	0	4,3 \pm 1,00	0,7 \pm 0,25
C	0,8 \pm 0,21	2,8 \pm 0,39	0	0	0	5,9 \pm 1,06	0,6 \pm 0,39	0	1,7 \pm 0,33	0,4 \pm 0,15
D	0,1 \pm 0,06	0,5 \pm 0,15	0	0	1,0 \pm 0,23	3,3 \pm 0,66	0,6 \pm 0,24	0	3,4 \pm 0,80	0,1 \pm 0,13
E	0,2 \pm 0,09	1,2 \pm 0,18	0	0,1 \pm 0,08	0,1 \pm 0,06	0,3 \pm 0,09	0,1 \pm 0,07	0	0	0
F	0,1 \pm 0,06	0,5 \pm 0,18	0,2 \pm 0,11	0,3 \pm 0,10	5,3 \pm 0,78	1,1 \pm 0,29	3,9 \pm 0,97	1,0 \pm 0,05	0,5 \pm 0,22	0
G	0,1 \pm 0,05	0,5 \pm 0,18	1,4 \pm 0,23	1,1 \pm 0,25	1,3 \pm 0,27	0,3 \pm 0,15	0	0	0,1 \pm 0,08	0
H	0,1 \pm 0,05	0,4 \pm 0,13	0,2 \pm 0,11	0,4 \pm 0,13	3,9 \pm 0,82	1,6 \pm 0,30	1,8 \pm 0,92	0,1 \pm 0,08	2,9 \pm 1,04	1,1 \pm 0,54

Tabla 1.5. Pupas de mosca blanca depredadas (media \pm SE) y porcentajes de detección de las diferentes presas por PCR en los *M. pygmaeus* y *N. tenuis* analizados en los 8 invernaderos de tomate. Bt = *B. tabaci*, Tv = *T. vaporariorum*, Em = *B. tabaci* parasitada por *E. mundus*, Ep = *T. vaporariorum* parasitada por *E. pergandiella*, n = número de depreadores analizados.

Invernadero	Pupas de mosca blanca consumidas por foliolo			Detección molecular									
	Bt	Tv		<i>M. pygmaeus</i> (%)			<i>N. tenuis</i> (%)						
	Bt	Tv		Bt	Em	Tv	Ep	n	Bt	Em	Tv	Ep	n
A	-	6,0 \pm 1,13		-	-	43,5	30,4	23	-	-	-	-	-
B	0	2,9 \pm 0,92		18,8	-	37,5	6,3	16	-	-	-	-	-
C	0	2,4 \pm 0,52		0,0	-	41,7	0,0	24	-	-	-	-	-
D	0	1,0 \pm 0,31		22,2	5,6	44,4	0,0	18	-	-	-	-	-
E	0	2,6 \pm 0,63		4,2	-	0,0	-	24	-	-	-	-	-
F	1,4 \pm 0,46	0,5 \pm 0,24		-	-	-	-	-	72,2	44,4	27,8	-	18
G	0	4,9 \pm 1,01		35,7	-	21,4	14,3	14	4,2	-	0,0	0,0	24
H	0,6 \pm 0,32	2,0 \pm 0,51		20,0	5,0	15,0	0,0	20	37,5	0,0	50,0	18,8	16

3.2.2. Relación entre la abundancia de presas y su detección molecular

Cuando se compararon los porcentajes de detección molecular de las moscas blancas en los depredadores con la abundancia de pupas de mosca blanca en los invernaderos (ambas especies juntas), se observó una relación positiva significativa para *N. tenuis* ($r^2 = 0,88$; $p = 0,005$; fig. 1.2b) pero no para *M. pygmaeus* ($r^2 = 0,28$; $p = 0,079$; fig. 1.2a). Sin embargo al compararla con la abundancia de adultos de mosca blanca, hubo una relación positiva significativa para ambas especies de depredador ($r^2 = 0,55$; $p = 0,009$ para *M. pygmaeus* y $r^2 = 0,67$; $p = 0,045$ para *N. tenuis*; fig. 1.2c y 1.2d, respectivamente). Por otro lado, no se encontró una relación significativa entre la abundancia de pupas parasitadas (ambas especies juntas) y los porcentajes de detección molecular de los parasitoides en *M. pygmaeus* ($r^2 = 0,21$; $p = 0,304$). Tampoco se encontró relación entre los porcentajes de detección molecular de moscas blancas en los depredadores y la abundancia de pupas de mosca blanca depredadas (observadas bajo lupa binocular) ($r^2 = 0,02$; $p = 0,679$). Esto era de esperar, ya que el número de pupas depredadas en los folíolos representa el número acumulado de moscas blancas depredadas por ambos depredadores a lo largo del tiempo, mientras que la detección molecular muestra la depredación más reciente.

3.2.3. Detección molecular conjunta de presas

En algunos depredadores se detectaron hasta 3 especies de presas (tabla 1.6). De los 56 *M. pygmaeus* en los que se detectó presa, en el 77 % se detectó 1 especie, en el 21 % 2 y sólo en el 2 % se detectaron 3. En el caso de los 28 *N. tenuis* en los que se detectó presa, en el 46 % se detectó 1 especie, en otro 46 % se detectaron 2 y en el 7 % se detectaron 3, mostrando una mayor polifagia por parte de este depredador. En el 45 % de los depredadores en los que se detectó *E. mundus*, también se detectó *B. tabaci*. En el 92 % de los depredadores en los que se detectó *E. pergandiella* se detectó también *T. vaporariorum*. Esta detección conjunta de huésped y parasitoide sugiere una depredación sobre estadios tempranos del parasitoide.

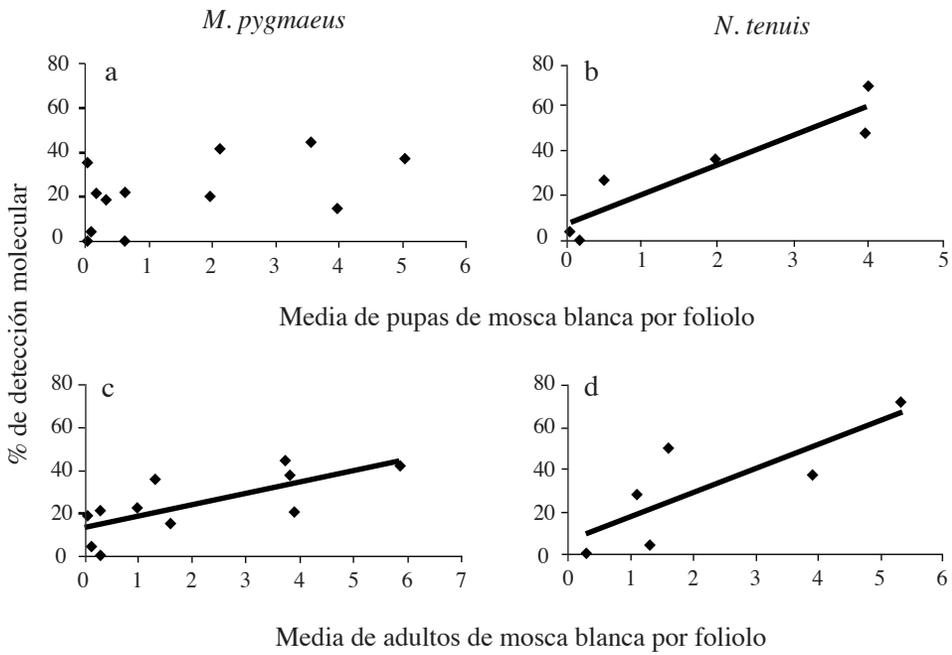


Fig. 1.2. Relación entre los porcentajes de detección de mosca blanca en ambos depredadores y la presencia de pupas (a y b) y de adultos de mosca blanca (c y d) en los invernaderos.

Tabla 1.6 Porcentajes de detección molecular de las distintas combinaciones de presa detectadas en *M. pygmaeus* y *N. tenuis*. Bt = *B. tabaci*, Tv = *T. vaporariorum*, Em = *E. mundus*, Ep = *E. pergandiella*.

Presa detectada		<i>M. pygmaeus</i> (%) (n=56)	<i>N. tenuis</i> (%) (n=28)
Plaga	Parasitoide		
Bt	-	21,4	25,0
Tv	-	48,2	10,7
Bt + Tv	-	7,1	25,0
-	Em	5,4	10,7
Bt	Em	0,0	14,3
Bt + Tv	Em	0,0	3,6
-	Ep	1,8	0,0
Tv	Ep	14,3	7,1
Bt + Tv	Ep	1,8	3,6

3.2.4. Detección molecular de presa dependiendo del sexo, estadio y especie de depredador

La detección molecular de presa fue generalmente más elevada en hembras que en machos (fig. 1.3a y 1.3b), excepto para la detección de *B. tabaci*, que nunca se detectó en las hembras de *M. pygmaeus*, y para la detección de *E. mundus*, que fue ligeramente mayor en los machos. La detección en adultos y en ninfas fue bastante similar, siendo mucho más variable en *M. pygmaeus* que en *N. tenuis* (fig. 1.3c y 1.3d).

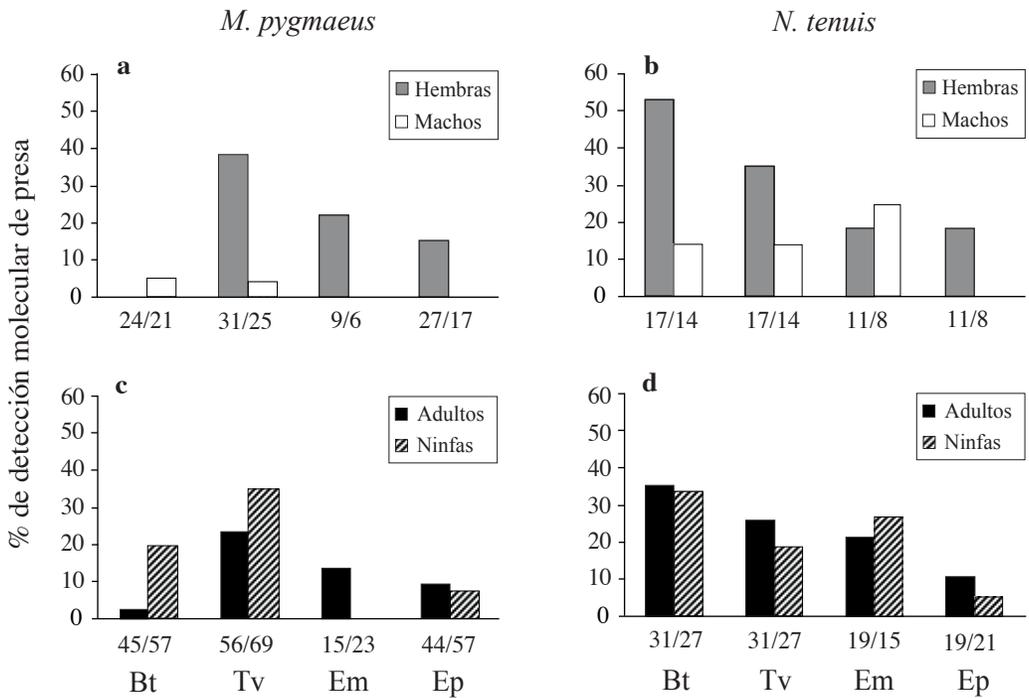


Fig. 1.3. Porcentajes de detección molecular en hembras y machos (a y b) y en adultos y ninfas (c y d) de *M. pygmaeus* y *N. tenuis*. Los números bajo las barras indican el número de hembras/machos y adultos/ninfas analizados. Bt = *B. tabaci*, Tv = *T. vaporariorum*, Em = *E. mundus*, Ep = *E. pergandiella*.

En el caso del invernadero H, donde estaban presentes las dos moscas blancas y los dos depredadores ($n = 20$ *M. pygmaeus* y $n = 16$ *N. tenuis*), la detección de moscas blancas fue mayor en *N. tenuis* que en *M. pygmaeus*, y de manera significativa en el caso de la detección de *T. vaporariorum* (test de Fisher, $P = 0,034$) (fig. 1.4).

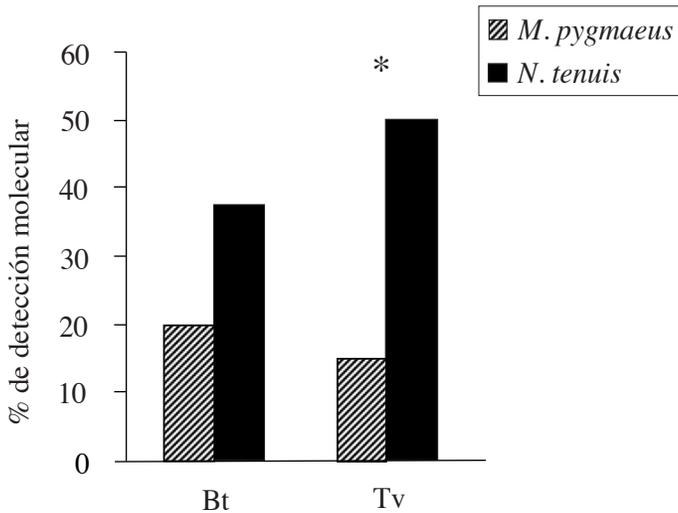


Fig. 1.4. Porcentaje de detección molecular de *B. tabaci* y *T. vaporariorum* obtenido en *M. pygmaeus* y *N. tenuis* en el invernadero H (donde estaban presentes las cuatro presas). (*) indica diferencias significativas entre *M. pygmaeus* y *N. tenuis*. Bt = *B. tabaci*, Tv = *T. vaporariorum*.

4. Discusión

Los cebadores que se han diseñado en este trabajo amplifican fragmentos de entre 158 y 345 pb, tamaño que permite una buena detección de la presa diana cuando ésta ha sido ingerida. Para el diseño de cebadores se recomiendan regiones multicopia del ADN (como las regiones COI e ITS) y fragmentos de ADN diana cortos (Agustí *et al.*, 1999; Zaidi *et al.*, 1999; King *et al.*, 2008; King *et al.*, 2011). No se observaron inespecificidades cuando estos cebadores se probaron con ADN de otras especies

frecuentemente encontradas en los cultivos de la zona de estudio, lo cual evita el riesgo de sobreestimar la depredación sobre las presas diana.

La presa diana se detectó con los cuatro pares de cebadores justo después de haber sido consumida en el 100 % de los casos, y la detección permaneció similar después de 4 horas. En Agustí *et al.* (1999, 2000), la detección que se obtuvo con el depredador *Dicyphus tamaninii* usando marcadores SCAR para *H. armigera* y *T. vaporariorum* a las 4 horas fue de 45 % y 60 % respectivamente. Como era de esperar, una región multicopia como es la COI utilizada en el presente estudio, aumenta la detección, llegando hasta el 100 %.

Para simular mejor las condiciones de campo de la zona de estudio, los depredadores se mantuvieron a 25 °C. Esta elevada temperatura es la temperatura media en los cultivos de primavera-verano en el NE español (Gabarra *et al.*, 2006). Aunque se sabe que la detección molecular de presa disminuye a elevadas temperaturas (Sopp y Sunderland, 1989; von Berg *et al.*, 2008), en las pruebas de depredación de 2,5h la detección fue elevada 4 horas después de la ingestión de la presa (80 %). Por ello se estudió la detección en condiciones más similares a las de campo, dejando a los depredadores alimentarse durante 24h. Como se esperaba, en este caso, aunque los depredadores consumieron una elevada cantidad de presa, la detección molecular fue menor. Esto podría deberse a que el periodo entre la ingestión y la recolección de los depredadores fue probablemente mayor de 4h. Aún siendo esta prueba de depredación menos precisa que la anterior (3-4 presas consumidas durante 2,5h), consideramos que ésta es más próxima a la depredación real en condiciones de campo, aportando una información más fidedigna para la interpretación de estas complejas redes tróficas.

La detección de presa ingerida mediante métodos moleculares permite la identificación de relaciones tróficas imposibles de identificar mediante otros métodos (Kuusk y Agustí, 2008). En este estudio se ha demostrado que en condiciones de campo *M. pygmaeus* y *N. tenuis* depredan ambas moscas blancas, así como ambos parasitoides. La detección molecular fue posible en invernaderos donde la abundancia de presa era muy baja e incluso en los que ésta ni siquiera se observó bajo lupa binocular. Esto sugiere que los depredadores también depredan huevos o estadios jóvenes, lo cual es muy difícil o imposible de observar bajo lupa o por disección. Por lo tanto esta técnica

molecular muestra el consumo cualitativo real en condiciones de campo sin subestimar la depredación. Otros estudios han señalado la imposibilidad de distinguir mediante métodos tradicionales qué especies de presa son consumidas por cada especie de depredador cuando éstos coexisten en el mismo invernadero (Castañé *et al.*, 2004; Arnó *et al.*, 2005). Utilizando este método molecular, esto ha sido posible.

Los métodos moleculares también han permitido identificar otras interacciones tróficas en los depredadores zoofitófagos. Pumariño *et al.* (2011) estudiaron los mismos individuos de *M. pygmaeus* analizados en este estudio usando cebadores específicos para detectar planta de tomate. Se detectó planta o presa en el 17 % y 26 % de los individuos, respectivamente, y el 14 % de los depredadores resulto positivo para ambas. A pesar de que esto podría ser debido a la presencia de ADN de tomate en las moscas blancas (depredación secundaria), creemos que se debe en realidad a la dieta zoofitófaga de los depredadores, ya que es conocido que las moscas blancas se alimentan a partir del floema (Pollard, 1955), donde el contenido de ADN es muy bajo.

La detección molecular de las moscas blancas en ambos depredadores estuvo significativamente relacionada con la abundancia de adultos de moscas blancas en los invernaderos, mientras que se relacionó con la abundancia de pupas sólo en el caso de *N. tenuis*. Montserrat *et al.* (2000b) observaron una mayor eficiencia de *M. pygmaeus* depredando larvas de 2º estadio de *F. occidentalis* (pequeñas y móviles) que ninfas de 4º estadio de *T. vaporariorum* (mayores y sésiles). Esto sugiere que *M. pygmaeus* puede sentirse atraído por presas móviles, lo cual explicaría la relación significativa entre detección molecular de las moscas blancas en *M. pygmaeus* y la abundancia de adultos de éstas. Otra explicación podría estar relacionada con la distribución en la planta. Los adultos de moscas blancas, principalmente de *T. vaporariorum*, tienden a congregarse en las hojas superiores de la planta de tomate (Arnó *et al.*, 2006a), una zona en la que también hay elevada presencia de depredadores (Arnó *et al.*, 2010b).

Como se esperaba, no se encontró una relación significativa entre la detección molecular de moscas blancas en los depredadores y la depredación observada bajo lupa binocular. Las pupas depredadas reflejan la depredación acumulada en el tiempo y no es posible saber cuándo ni qué especie de depredador las consumió. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, con la detección molecular se obtiene una

información actual de la depredación, ocurrida en el periodo de tiempo cercano a la recolección de los depredadores. Tampoco se observó relación entre la detección molecular de los parasitoides y la abundancia de pupas parasitadas, lo que sugiere que mediante la observación bajo lupa se produce una subestimación del parasitismo debido a la dificultad de observar los restos de los estadios larvarios y huevos del parasitoide después de que la ninfa de mosca blanca haya sido depredada. Aunque estos depredadores han sido descritos depredando pupas, estadios inmaduros y adultos de *E. mundus* en estudios de laboratorio (Malo, 2009), mediante los marcadores moleculares específicos se pudo identificar la existencia de depredación sobre los parasitoides en el cultivo, lo que indicaría que son una buena herramienta para determinar las relaciones tróficas entre los depredadores y los parasitoides en condiciones de campo.

El análisis molecular de los depredadores recolectados en campo permitió la identificación de hasta 3 especies de presa ingerida en algunos depredadores. La depredación intragremial (DI) puede ser ventajosa cuando las presas son escasas (van Balen *et al.*, 2001) o contraproducente cuando los depredadores reducen la efectividad de los parasitoides al depredarlos (Rosenheim *et al.*, 1995). Por lo tanto, el análisis de la depredación sobre los parasitoides es importante a la hora de determinar la efectividad de depredadores y parasitoides cuando éstos coexisten (Hoelmer *et al.*, 1994). Este estudio muestra que ambos depredadores consumieron principalmente moscas blancas (76,7 % de los *M. pygmaeus* y 60,7 % de los *N. tenuis*), aunque también consumieron parasitoides (23,3 % y 39,3 %, respectivamente). Traugott y Symondson (2008) observaron una detección molecular conjunta del huésped y del parasitoide en varias especies de depredador cuando analizaron la depredación sobre *Aphis fabae* Scopoli parasitado por *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson). Aparte de este estudio de laboratorio, hasta el momento no ha habido ningún estudio de campo publicado que pudiera determinar mediante métodos moleculares si la interacción entre los diferentes enemigos naturales podía afectar a su CB. Algunos estudios indican que la presencia conjunta de los depredadores y los parasitoides utilizados en este estudio puede llegar a ser complementaria para controlar las dos especies de moscas blancas (Castañé *et al.*, 2004; Gabarra *et al.*, 2006). El presente estudio indica que la

depredación de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* sobre *E. mundus* y *E. pergandiella* en condiciones de campo es común, lo que podría afectar al CB de las moscas blancas. Aunque *E. pergandiella* ha sido descrita como parasitoide de *B. tabaci* (Liu y Stansly, 1996), en los depredadores no se encontró conjuntamente ADN de *B. tabaci* y *E. pergandiella*, lo que sugiere cierta preferencia de este parasitoide por *T. vaporariorum* cuando ambas moscas blancas están presentes en el cultivo. Arnó *et al.* (2005) tampoco encontraron *E. pergandiella* asociada a *B. tabaci* al estudiar el parasitismo de ambos parasitoides en las dos especies de moscas blancas tanto en cultivo de tomate como de pepino.

La detección molecular de presa fue en general mayor en hembras que en machos en ambas especies de depredador. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Urbaneja *et al.* (2009), que observaron una mayor depredación sobre los huevos del lepidóptero *Tuta absoluta* (Meyrick) en las hembras de *M. pygmaeus* y *N. tenuis* que en los machos. Harwood *et al.* (2004) observaron lo mismo en arañas linífidas. Como era de esperar, una mayor necesidad nutricional parece estar asociada a la reproducción. Cuando se analizó la detección molecular en función del estadio del depredador, ésta fue similar en adultos que en ninfas. Barnadas *et al.* (1998) también indican que la ninfas y los adultos de *M. caliginosus* tenían un consumo similar de ninfas de *B. tabaci* y de *T. vaporariorum*. Lo mismo observaron Bonato *et al.* (2006), estudiando la depredación de ninfas y adultos de *M. caliginosus* sobre *B. tabaci*. En el presente estudio, la detección molecular de la presa parece indicar que las ninfas de *M. pygmaeus* depredaron más activamente *B. tabaci* que los adultos, lo que podría ser positivo para el CB, dado que en las comunidades de depredadores la presencia de ninfas es normalmente más elevada que la de adultos.

La detección molecular de presa fue mayor en *N. tenuis* que en *M. pygmaeus*, lo que muestra una mayor voracidad de *N. tenuis*. Esto coincide con otros estudios publicados previamente como el de Arnó *et al.* (2009), donde se comparó la capacidad depredadora de ambas especies sobre huevos de *T. absoluta*, observando que las ninfas de *M. pygmaeus* depredaban menos que las de *N. tenuis*. Barnadas *et al.* (1998) también observaron que *M. caliginosus* depredaba menos pupas de mosca blanca que *D. tamaninii*, otro mírido depredador que se puede encontrar en cultivo de tomate. Por

otra parte Montserrat *et al.* (2000a) observaron una menor actividad buscando presa en *M. caliginosus* que en *D. tamaninii*.

Este estudio ha demostrado la eficiencia de los marcadores moleculares para estudiar la depredación en cultivos protegidos de tomate. El uso de estos marcadores ha permitido identificar las interacciones tróficas entre los depredadores polifagos *M. pygmaeus* y *N. tenuis*, las dos moscas blancas *B. tabaci* y *T. vaporariorum* y dos de sus parasitoides en condiciones de campo y en un momento determinado del cultivo. Esta información actualmente es imposible de obtener mediante otros métodos de análisis. La elevada depredación sobre los parasitoides hallada indica la existencia de una importante DI que podría afectar negativamente al CB de estas moscas blancas. Trabajos futuros podrían centrar su atención en cómo otros aspectos, tales como la presencia de presa alternativa o la existencia de DI, afectan al CB que estos enemigos naturales ejercen sobre las moscas blancas.