



FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS MENCIÓN  
BIOLOGÍA O QUÍMICA

“PERIODO DE EFECTO RESIDUAL DE PLAGUICIDAS  
SOBRE EL DEPREDADOR DE PLAGAS *Rhyzobius*  
*lophantae* (Blaisdell, 1892) (COLEOPTERA:  
COCCINELIDAE), EN CONDICIONES DE LABORATORIO”

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN II PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADA EN CIENCIAS MENCIÓN BIOLOGÍA**

**VALERIA DANAE PALMA ONETTO**

DIRECTOR  
**Doris Oliva Ekelund**

Valparaíso, Chile  
2013

**UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**PERIODO DE EFECTO RESIDUAL DE PLAGUICIDAS SOBRE  
EL DEPREDADOR DE PLAGAS *Rhyzobius lophantae*  
(Blaisdell, 1892) (COLEOPTERA: COCCINELIDAE), EN  
CONDICIONES DE LABORATORIO**

Memoria para optar al grado  
de Licenciada en Ciencias  
Mención Biología

**VALERIA DANAE PALMA ONETTO**

Profesor Guía:

Calificaciones

Doris P. Oliva Ekelund

Comisión:

Maritza Sepúlveda Martínez

Marilyn Paz Araos

**VALPARAÍSO-CHILE**

**2013**

## *Dedicatoria*

La presente tesis se la dedico a mi familia, con cuyo apoyo pude realizar y concluir mi carrera.

A mis padres por brindarme los recursos necesarios, los consejos y el apoyo que fueron fundamentales para llevar a una tímida niña de 17 años a dejar su casa para conseguir su sueño.

A mi hermana Daniela por su compañía, y apoyo en este camino.

A mi hermana Carolina por la ayuda económica y los consejos que hicieron de mi una mejor persona.

A mi novio Boris, que ha tenido que aguantar mis enojos y mi estrés en estos días. Quien me recibía con un plato de comida cuando llegaba muerta de la Universidad, y quien ha sido uno de mis grandes pilares en estos dos años más difíciles de mi carrera.

Dedico esta memoria y agradezco a la profesora Doris Oliva, quién se preocupó de buscar una tesis que abordase mis gustos, aun cuando esto dificultase su trabajo. Y por sobre todo, quien tuvo que aguantar gran parte de mis berrinches, y ganas de dejar todo esto tirado.

En especial me gustaría agradecer a todos esos amigos cuya presencia cambio mi vida, al Erick, la Caty, la Pamela, la Romi y el Victor. Esas personas que me hicieron dejar las murallas que me resguardaban, que me enseñaron a formar lazos, a valorar la familia que tengo, a preocuparte por alguien desde lo más profundo de tu ser, pero por sobre todo les agradezco por ser unos ridículos que me ayudaron a ser un poco menos formal, fría y racional, y aprender de su locura.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. HIPÓTESIS.....	11
1.2. OBJETIVOS.....	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1. Determinar la mortalidad producida por insecticidas comerciales sobre adultos de <i>Rhyzobius lophantae</i> .....	18
2.2. Evaluar la persistencia de cada plaguicida sobre <i>R. lophantae</i> .....	21
2.3. Evaluar el daño oxidativo producido por el contacto con plaguicidas comerciales, sobre estadios adultos de <i>R. lophantae</i> . .....	22
2.4. Categorizar los plaguicidas evaluados de acuerdo al grado de toxicidad y residualidad, y sugerir un método eficiente de aplicación de control químico y biológico para un manejo integrado de plagas.....	23
2.5. Análisis estadístico.....	24
3. RESULTADOS .....	25
3.1. Mortalidad producida por insecticidas comerciales sobre adultos de <i>Rhyzobius lophantae</i> .....	25
3.2. Persistencia de cada plaguicida sobre <i>R. lophantae</i> .....	27

3.3. Estrés oxidativo producido, por el contacto con plaguicidas, sobre estadios adultos de <i>R. lophantae</i> .....	30
3.4 Categorizar los plaguicidas evaluados de acuerdo al grado de toxicidad y residualidad, y sugerir un método eficiente de aplicación de control químico y biológico para un manejo integrado de plagas.....	32
4. DISCUSIÓN.....	37
5. CONCLUSIONES .....	42
6. AGRADECIMIENTOS.....	43
7. LITERATURA CITADA.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estadio adulto de <i>Rhyzobius lophantae</i> de entre 1 y 2 días de edad, utilizados como insectos de prueba. ....	13
<b>Figura 2:</b> Montaje del experimento, en la fotografía se observan 5 de los 16 tratamientos, cada bandeja contiene las 4 réplicas de cada tratamiento. ....	18
<b>Figura 3:</b> Vista frontal de Torre de Potter, en donde se dispersaron 2 mL de cada plaguicida sobre las respectivas placas Petri. ....	18
<b>Figura 4:</b> Capsula de Petri, rotulada, con insectos en su interior y cubierta con un tul para su ventilación. ....	19
<b>Figura 5:</b> Mortalidad de <i>R. lophantae</i> producida por el efecto residual de plaguicidas de tipo orgánico y sintético, representada en porcentajes. ....	29
<b>Figura 6:</b> Cantidad de MDA (nmol MDA/mL), registrada en <i>R. lophantae</i> , para cada uno de los plaguicidas que resultaron inocuos al primer día de aplicación. ....	30
<b>Figura 7:</b> Número de plaguicidas sintéticos y orgánicos analizados que pertenecen a cada una de las categorías establecidas por la OILB. ....	34

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Plaguicidas sintéticos comerciales utilizados en los experimentos de residualidad; y dosis máximas recomendadas por el fabricante.....	15
<b>Tabla 2:</b> Plaguicidas orgánicos comerciales evaluados en experimentos de residualidad; y dosis máximas recomendadas por el fabricante.....	17
<b>Tabla 3:</b> Categorías de toxicidad de plaguicidas según la OILB. ....	23
<b>Tabla 4:</b> Mortalidad media producida por plaguicidas sintéticos y orgánicos, sobre el estadio adulto de <i>R. lophantae</i> a las 24 horas después de la aplicación de los plaguicidas.....	25
<b>Tabla 5:</b> Mortalidad media de estados adultos de <i>R.lophantae</i> a las 24 horas y cada 7 días a partir de la aplicación de los plaguicidas. ....	28
<b>Tabla 6:</b> Categorización de los plaguicidas según la escala establecida por la OILB para bioensayos en laboratorio, en el tiempo.....	33
<b>Tabla 7:</b> Días necesarios para colocar el control biológico, posterior a la aplicación de un plaguicida. ....	36

## RESUMEN

El uso de plaguicidas es actualmente el método más utilizado en la agricultura para el control de plagas. Sin embargo, este tipo de control genera daño ambiental, y toxicidad sobre los controladores naturales de las plagas. Esta situación ha llevado a que algunos agricultores opten por el control biológico, como una opción más sustentable para el control de especies fitófagas.

A pesar de que el uso de controladores biológicos ha ido en aumento, es escasa la información local acerca de la toxicidad de los plaguicidas sobre los insectos benéficos y especialmente acerca del efecto residual de estos.

*Rhyzobius lophantae* es un eficiente depredador de escamas blancas en laboratorio y campo, lo que ha significado que empresas que comercializan enemigos naturales lo produzcan en forma masiva.

En la presente memoria se evaluaron los plaguicidas más utilizados en agricultura convencional y producción orgánica para el control de plagas agrícolas, con el objetivo de determinar el efecto residual de estos ingredientes activos sobre este depredador tanto a nivel directo (muerte) como indirecto (estrés oxidativo), en condiciones de laboratorio. La mortalidad de *R.lophantae* fue analizada mediante observación directa, mientras que el estrés oxidativo se determinó mediante la técnica TBARS (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrica) utilizando malondialdehído como factor de medición, siendo esta última una metodología nunca antes probada en coleópteros adultos.

En total se evaluarán 15 ingredientes activos, los que fueron aplicados mediante una torre Potter, para posteriormente exponer a los residuos a adultos de *Rhyzobius lophantae*. Las evaluaciones de mortalidad se realizarán a las primeras 24 horas y cada siete días desde su aplicación. Los datos se analizaran empleando el Probit de la proporción y las medidas serán sometidas a test t de Student al 0.05% de significancia.

Los resultados pusieron de manifiesto cuatro niveles de toxicidad. En el primero, se incluirían *Bacillus thuringiensis var kurstaki*, jabón potásico, azufre floable, azufre en polvo y spinosad, como inocuos desde las 24 horas posteriores a la aplicación del plaguicida. Clorpirifos, spirotetramato y aceite mineral generaron mortalidades que los

encuadran dentro de la categoría de levemente nocivos e inocuos, a uno y 7 días desde la aplicación del plaguicida respectivamente. Abamectina tuvo un efecto moderadamente nocivo a las 24 horas desde la aplicación del plaguicida sobre los adultos de *R.lophantae*, efecto que desapareció a los 7 días considerándose inocuo. Por último, tanto methidation, como metomilo, imidacloprid, thiamethoxam y acetamiprid, presentaron un efecto nocivo desde el inicio del experimento hasta por 48 días posteriores a la aplicación del plaguicida.

Palabras clave: *Rhyzobius lophantae*, residualidad, control biológico, plaguicidas

## ABSTRACT

At present, the use of pesticides is the method most used in agriculture to control pests. However, this type of control generates environmental damage, and toxicity on natural pest controllers. This has led some farmers opt for biological control as a sustainable option for the control of phytophagous species.

Although the use of biological control agents has been increasing, there is little local information about the toxicity of pesticides on beneficial insects and especially their residual effect.

*Rhyzobius lophantae*, is an efficient predator of white scales in the laboratory and field, which has caused his massive sale, in the companies engaged in the sale of natural enemies.

Therefore, we selected pesticides most used in conventional agriculture and organic for the agricultural pest control, with the aim of determining the residual effect of these active ingredients on this predator both direct (death) and indirect (oxidative stress) effect, in laboratory conditions. Mortality of *R. lophantae* was analyzed by direct observation, while oxidative stress is determined using the TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substances) using malondialdehyde as factor measurement, being the latter methodology never before tested in adult beetles.

Was evaluated a total of 15 active ingredients which were applied using a Potter tower, to subsequently expose to waste *Rhyzobius* adults of.

Mortality was evaluated at the first 24 hours and every seven days after pesticide application. Data were analyzed using the Probit of proportion and the measures were subjected to Student's t test at a 0.05% level.

The results showed four levels of toxicity. The first would include *Bacillus thuringiensis var kurstaki*, potassium soap, flowable sulfur, sulfur powder and spinosad as harmless from 24 hours after application of the pesticide. Chlorpyrifos, mineral oil and spirotetramato, generated mortalities that fall within the category of slightly harmful and safe to the one and 7 days after application of the pesticide respectively. Abamectin had moderate harmful effect at 24 hours after application of the pesticide

on *R.lophantae* adults, an effect that disappeared after 7 days, being considered harmless. Finally, methidation, methomyl, imidacloprid, acetamiprid and thiamethoxam, had a deleterious effect from the start of the experiment up to 48 days after the application of the pesticide.

Keywords: *Rhyzobius lophantae*, residual, biological control, pesticides

# 1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día el método de control de plagas más usado en la agricultura a nivel mundial es el uso de plaguicidas, método invasivo que genera tanto o más daño en los insectos benéficos que en aquellos a los que se desea exterminar (Croft, 1990; Stark *et al.*, 1992; Boyd & Boethel, 1998; Ripa & Larral, 2008). Por lo que una premisa previa e imprescindible es estudiar los efectos secundarios que causan los plaguicidas (Medina *et al.*, 2008).

Los plaguicidas pueden ser naturales o sintéticos, y son aplicados a las especies objetivos en numerosas formulaciones y sistemas de aplicación (Ware & Whitacre, 2004). Dependiendo de su constitución química, los plaguicidas sintéticos pueden clasificarse en varios grupos, tales como: arsenicales, carbamatos, derivados de cumarina, derivados de urea, dinitrocompuestos, espinosinas, nicotinoides, organoclorados, organofosforados, organometálicos, piretroides, tiocarbamatos, y triazinas (Ware & Whitacre, *op cit*).

Según Van Driesche *et al.* (2006) y Desneux *et al.* (2007), los plaguicidas actúan ya sea de forma directa tanto por contaminación con residuos sobre la planta, contacto con gotas durante el tratamiento, ingestión de líquidos o sustancias azucaradas contaminadas o de forma indirecta, a través de la ingestión de presas contaminadas por depredadores, parasitismo sobre un huésped contaminado con parasitoides, o porque reducen las poblaciones del huésped plaga, imposibilitando la captura de las presas por parte del depredador. El riesgo de un plaguicida para el organismo al cual controla depende de dos factores: la peligrosidad que supone para éste (función de la toxicidad intrínseca del producto), que le puede provocar efectos letales y subletales, y la exposición a la cual está sometida la comunidad. Los efectos subletales pueden ser fisiológicos y pueden tener un efecto en la bioquímica y neurofisiología, desarrollo, longevidad, inmunología, proporción sexual, fecundidad o fertilidad del enemigo natural, o afectar su comportamiento, modificar la movilidad, orientación, comportamiento alimentario de puesta y aprendizaje, por lo que su papel beneficioso queda seriamente comprometido (Desneux *et al.*, *op cit*). También, dentro de los

efectos subletales, los plaguicidas pueden generar estrés oxidativo (Hazarika et al., 2003; .Abdollahi et al., 2004) definido por Agrawal y Sharma (2010) como el desbalance del estado redox de la célula, es decir, cuando esta se encuentra expuesta a un ambiente prooxidante (Especies reactiva de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN)) y los mecanismos de defensa antioxidante son sobrepasados de forma que afectan el balance redox. Las EROs tienen la capacidad de causar peroxidación de los lípidos insaturados, que constituyen la membrana de las células, y el agotamiento de las reservas celulares de la reducción de elementos (tanto enzimáticos y no enzimáticos), que el cuerpo produce de forma endógena. Estudios demuestran que durante las últimas dos décadas el estrés oxidativo inducido por plaguicidas ha sido considerado como un posible mecanismo de toxicidad y por lo tanto ha sido un foco de la investigación toxicológica (Agrawal & Sharma, 2010).

Una de las técnicas utilizadas para evaluar el daño en membrana es el TBARS (Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), este se basa en la producción de malondialdehído (MDA) un producto que se origina a partir de la peroxidación lipídica y la biosíntesis de prostaglandina, que es mutagénico y carcinogénico (Marnett, 1999) y puede ser un mecanismo interesante para estudiar efecto indirecto de daño en organismos que sobreviven a situaciones de estrés (Marnett, *op cit*).

Por todo lo anteriormente mencionado, la tendencia mundial actual en la producción agrícola, está encaminada a la adaptación de los “Sistemas Productivos Tradicionales” a los de “Agricultura Sostenible”, que tiene por objetivo producir alimentos y fibras de calidad y en cantidades suficientes, de manera rentable, socialmente aceptable, y sin dañar el ambiente (Wijnands & Kroonen-Backbier, 1993). En estos modernos sistemas productivos, uno de los elementos esenciales es la protección de los cultivos, y aquí el control de plagas se hace siempre desde la perspectiva del Manejo Integrado de Plagas (MIP) que es la combinación de todas las técnicas de control a nuestro alcance, incluida la no intervención, minimizando el uso del control químico, con la finalidad de eliminar la porción de la población plaga que genera daños económicos (Viñuela, 2005). Entre los mecanismos que se proponen para un manejo integrado de plagas, se busca reducir el impacto negativo de los plaguicidas usando plaguicidas selectivos ya sea a través de productos que intrínsecamente respeten a los insectos benéficos o evitando que coincidan en tiempo y/o espacio con estos (Viñuela, *op cit*).

Uno de los programas más completos para identificar los plaguicidas selectivos, dar apoyo al MIP, y probar los efectos secundarios de los plaguicidas sobre los

organismos beneficiosos fue creado por la IOBC-WPRS (conocida también como OILB, "Organización Internacional para la Lucha Biológica). Esta organización ha desarrollado un protocolo estándar para el análisis del impacto de plaguicidas en organismos "no objetivos" (Hassan, 1989). La evaluación de los pesticidas se basa en la secuencia de tres pasos: en laboratorio, en condiciones de semi-campo y en el campo (Hassan, 1998; Barret, 1998). Con estas pruebas, la OILB ha clasificado a los plaguicidas en cuatro categorías, dependiendo del grado de daño que causan al organismo benéfico en condiciones de laboratorio: Inocuos (mortalidad menor al 30%), levemente nocivos (mortalidad entre 30% y 79%), moderadamente nocivos (entre un 80% y 99% de mortalidad), y nocivos (100% de mortalidad) (Boller *et al.*, 2005). En caso de caer en la categoría de inocuo no son necesarias más pruebas, pero en caso de presentarse cualquiera de las otras categorías es necesario realizar más pruebas antes de permitir la utilización del plaguicida en cuestión (Boller *et al.*, *op cit*).

Debido a que se ha demostrado que posterior a la aplicación del plaguicida suele ocurrir que tras su efecto surja un brote de la plaga, producto de la ausencia de su regulador natural (el cual fue dañado por el plaguicida) (Ripa *et al.*, 2008), se ha comenzado a optar por cambiar el uso de controladores químicos por el de controladores biológicos. El control biológico es definido como el uso de enemigos naturales para reducir poblaciones de plagas a densidades menores, ya sea temporal o permanentemente (Van Driessche *et al.*, 2007; Gerding, [sin año]). Un programa exitoso de control biológico es cuando el enemigo natural reduce la plaga a un nivel que no causa daño, pero no la elimina por completo, dejando una población mínima para su supervivencia, pero a su vez ejerce un control permanente de dicha plaga. Este tratamiento difiere del control químico el que requiere una aplicación constante, la que se debe realizar cada vez que la plaga alcanza niveles que generen daño, lo que conlleva al desarrollo de resistencia en los insectos que se desean eliminar (Nicholls-Estrada, 2008).

En Chile el control biológico, se ha ido implementado progresivamente durante décadas en la citricultura y en la producción de paltas (Rojas, 2005). Este tipo de control ofrece una excelente condición fitosanitaria para el país y requiere ser preservada y explotada en beneficio del prestigio de los productos exportados, la protección del ambiente, la salud humana y la mantención la rentabilidad del cultivo (Ripa *et al.*, 2008).

Entre los agentes de control biológico de insectos y ácaros plaga se distinguen parasitoides, depredadores y entomopatógenos. Los parasitoides, son insectos que viven a expensas de otro insecto al que depredan progresivamente hasta causarle la muerte, durante ese tiempo completan su propio desarrollo larval. Los insectos depredadores son aquellos que causan la muerte de las plagas por succión de la sangre o por depredación. Por último, los patógenos son microorganismos que causan enfermedades o epizootias entre las plagas. (Van Driesche *et al.*, 2006; Ripa *et al.*, 2008).

Los coccinélidos son uno de los depredadores naturales más conocidos y eficaces de insectos y ácaros que ocasionan plagas en plantas de interés agrícola, forestal, ornamental y medicinal, tanto en su estado adulto como larvario (Núñez *et al.*, 1992; Vargas & Rodríguez, 2008; Weber & Lundgren, 2009). Estos destacan por depredar mosquitas blancas, áfidos, chanchitos blancos, escamas, arañitas (Biddinger 2009, Obrycki *et al.*, 2009; Hagen *et al.* 1999; Khan *et al.*, 2006), cochinillas (Hodek & Honek, 2009), ácaros (Biddinger *et al.*, 2009), huevos y larvas de Lepidópteros y Coleópteros (Evans, 2009).

La familia está compuesta por 6000 especies descritas en todo el mundo (Nedvěd & Kovář, 2012) de las cuales se han registrado 4000 especies de coccinélidos depredadores (Fleming, 2000). Los coccinélidos se caracterizan por su polimorfismo cromático, lo que representa un desafío para aquellos que desean determinar o caracterizar la especie (González & Vandenberg, 2006).

En Chile se han registrado 113 especies de coccinélidos, las que se encuentran distribuidas en cuatro subfamilias: Scymninae, Sticholotidinae, Coccidulinae, Coccinellinae (González, 2013). Aun así, el número de especies descritas podría aumentar, debido a que existe una gran cantidad de material que resta aun por analizar (González, 2006).

*Rhyzobius lophantae* (Blaisdell, 1892) es un conocido coccinélido depredador, presente en plantaciones de cítricos, bastante abundante en todo Chile. Es nativo de Australia, fue introducido en California en 1898 para el control de cochinillas, y de ahí se ha ido extendiendo progresivamente a otros estados de Estados Unidos (Honda & Luck, 1995; citado en Gómez Vives 2002). Desde 1908, ha sido importado o se ha extendido de forma natural a muchos otros países del mundo, donde se ha utilizado para el control biológico de diversas cochinillas (Gómez Vives, 2002). *R. lophantae*

fue exitosamente introducido en Chile entre 1931 y 1944, y actualmente se distribuye en Sudamérica (Argentina, y gran parte de Chile; incluyendo Isla de Pascua y el Archipiélago Juan Fernández), Asia, África, Europa, Norteamérica, Oceanía (Gordon, 1994; González, 2012).

Según González (2008), el género *Rhyzobius* (Stephens, 1829) fue descrito para albergar una especie europea, *Rhyzobius litura*. Actualmente incluye dos especies de ese continente y una serie de especies australianas, entre las cuales se incluye *Rhyzobius lophantae*. Las especies australianas fueron incluidas en un género diferente *Lindorus* Casey, pero posteriormente fue sinonimizado por Pope. Brèthes describió en 1925 el género *Nothorhyzobius*, basándose en un ejemplar de *Rhyzobius lophantae*, género que se considera un sinónimo. En cuanto a esta especie, ha llevado los nombres específicos *lophantae* (Blaisdell, 1892), *toowonbae* (Blackburn, 1892), *unguicularis* (Weise, 1922) y *ruficollis* (Brèthes, 1925).

El ciclo de *R. lophantae* presenta los estadios de desarrollo de huevo, larva, pupa, y adulto. El período larval comprende cuatro estadios (Marín, 1983). El adulto es pequeño, ovalado, y convexo, de entre 1.5 a 3 mm de largo y en su mayoría de color marrón oscuro un tanto rojizo o negro, entre sus características más conspicuas esta la pilosidad elitral de dos tipos: pelos blanquiceros cortos, tupidos y decumbentes, entremezclados con unos pocos pelos erectos, largos y negruzcos (González, 2008). Su pronoto es de color marrón-rojizo más claro que el cuerpo, al igual que su tórax. Y sus élitros son negros con brillos verdosos o cobrizos. (Statewide IPM Project; Partland *et al.*, 2000; Gordon, 1994).

De acuerdo a diferentes estudios se ha determinado que las características que permiten a *R. lophantae* ser considerado un buen agente de control biológico son su alta fecundidad y longevidad de la especie, la capacidad de las larvas de desarrollarse en todas las estaciones, inclusive en invierno, ausencia de diapausa, la corta duración de su ciclo de vida, el elevado número de generaciones (6-7), su polifagia y capacidad de adaptación al medio (Sthatas, 2000; Celada, 1997; Smirnov, 1950; Thompson, 1951; citados en Gómez Vives, 2002).

En Chile se ha indicado que *R. lophantae* depreda sobre conchuelas, cochinilla roja, algunos himenópteros y un gran número de escamas, insectos plaga que generan gran daño en la agricultura del país (Matta, 1967; Prado 1991; Ripa & Larral, 2008; Videla, 2007). Sin embargo, continua siendo una especie poco estudiada en Chile, y

en el extranjero son escasos los estudios acerca de la toxicidad que presentan los plaguicidas frente a este enemigo natural. Uno de los tópicos escasamente estudiados y que resulta necesario para incrementar el uso de *R. lophantae* como controlador de plagas son las investigaciones concretas acerca de persistencia, es decir, cual es el tiempo apropiado que se debe esperar para utilizar el control biológico que ejerce este insecto tras la aplicación de plaguicidas.

Dentro de los plaguicidas más utilizados en paltos y cítricos en Chile, destacan: metomilo, imidacloprid, methidation, acetamiprid, thiamethoxam, spirotetramato, spinosad, clorpirifos, abamectina, jabón potásico, aceite mineral, azufre en polvo, azufre floable, y *Bacillus thuringiensis var kurstaki*.

El metomilo es un carbamato inhibidor de la acetilcolinesterasa que actúa por contacto sistémico y es uno de los agroquímicos de mayor uso como insecticida-acaricida para el control de un amplio rango de plagas agrícola (Devine et al, 2008; Iannacone & Alvaríño, 2008). Es altamente utilizado a nivel mundial, en Chile se aplica entre 12 y 40 veces por temporada, ejerciendo una fuerte presión de selección sobre las poblaciones de mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*), por ende es probable que esta haya disminuido su susceptibilidad o ya sea resistente a metomilo (Vargas & Alvear, 2000).

Arysta LifeScience Chile (2005) establece que metomilo se degrada rápidamente en el medio ambiente, es altamente tóxico para aves y abejas, es moderadamente a altamente tóxico a los peces, y altamente tóxico a invertebrados acuáticos. La mayoría de sus productos comerciales están clasificados por la USEPA (Agencia de Protección Ambiental de la Estados Unidos) y la EPA como clase I. El metomilo en Chile es clasificado como producto muy peligroso Grupo Ib (ANASAC).

Imidacloprid es un insecticida sistémico del grupo de los neonicotinoides (Devine et al, 2008). Imidacloprid es un efector del sitio nicotínico del receptor de la acetilcolina (Elbert et al, 1991; Osorio et al, 2000). Su uso es extendido a una gran variedad de ambientes y a una amplia diversidad de insectos.

Imidacloprid está catalogado actualmente como "moderadamente tóxico" por la Organización Mundial de la Salud y la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (clase II o III), y una potencialidad de ser contaminante de aguas subterráneas. Está catalogado como "probable" carcinógeno por la EPA (grupo E), y

no es catalogado como un producto químico con problemas especiales con alguna especie. No está prohibido, restringido o es ilegal su importación en ningún país. Sin embargo ha sido prohibido su uso como pesticida en Francia desde 1999 (EPA, 2010). En Francia, su uso es polémico por su posible efecto sobre la apicultura. En el mismo sentido en Alemania ha prohibido en mayo de 2008 el tratamiento de semillas con neonicotinoides, debido al efecto negativo sobre las poblaciones de abejas (UK Guardian, 2008; Devine et al, 2008). Whitehorn et al (2012) relacionan la disminución del tamaño de las colonias y la producción de reinas en colonias del abejorro *Bombus terrestris* al efecto por ingesta producido por imidacloprid. El 24 de mayo de 2013 la Comisión Europea ha aprobado el Reglamento de Ejecución (UE) n. 485/2013, que establece la restricción del uso de imidacloprid en España y 12 países de la Unión Europea, a partir del 1 de Diciembre de 2013.

Methidation es un plaguicida organofosforado, que actúa por contacto, ingestión y penetración translaminar, capaz de llegar hasta insectos o larvas que estén en el interior de los tejidos o protegidos por hojas enrolladas (BRAVOAG, s.a.). Su uso está prohibido en la comunidad europea (Pan-Europe, 2008). Se le considera extremadamente tóxico para peces y daphnias, y muy tóxico para algas y aves (Anasac, 2008).

Acetamiprid pertenece a la familia de los neonicotinoides, y actúa como antagonista del receptor nicotínico de la acetilcolina (Devine et al, 2008). Genera vulnerabilidad sobre las abejas (*Apis mellifera*) a dosis subletales (Hassani et al, 2008). La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, 2013) no considera que sea persistente en el ambiente, sin embargo lo considera tóxico para abejas, aves, peces e invertebrados acuáticos.

Thiamethoxam al igual que acetamiprid e imidacloprid, pertenece a la familia de los neonicotinoides, actuando como un agonista del receptor nicotínico de la acetilcolina (Devine et al, 2008). Al igual que otros insecticidas, a thiamethoxam se le ha relacionado con el problema del colapso de colonias de abejas melíferas, este producto puede migrar hacia el polen y el néctar de las plantas y por tanto afectar a los insectos polinizadores. Ha mostrado una fuerte toxicidad en *Apis mellifera*, relacionándose la presencia de este plaguicida en la alimentación de las abejas con la dificultad para que encuentren el camino de regreso a la colmena, provocándose su despoblamiento (Henry et al, 2012). El 24 de mayo de 2013 la Comisión Europea ha aprobado el Reglamento de Ejecución (UE) n. 485/2013, en donde se establece la

restricción del uso de thiamethoxam en España y 12 países de la Unión Europea, a partir del 1 de Diciembre de 2013.

Spirotetramato es un insecticida perteneciente al nuevo grupo de cetoenoles, el cual se destaca por su amplio espectro de acción contra insectos chupadores, como los pulgones, moscas blancas, trips, entre otros, y particularmente afecta los estados juveniles (Bayer CropScience, 2008), actuando como un inhibidor de la biosíntesis de los lípidos (Nauen *et al.*, 2008). En cuanto a su efecto frente a los controladores biológicos, los estudios han mostrado a spirotetramato como poco viable, pero no se le considera nocivo (Elizondo & Murguido, 2010).

Spinosad es un plaguicida del tipo spinocin, que imita la acción del neurotransmisor acetilcolina bloqueando los receptores e interrumpiendo la transmisión de impulsos entre las células nerviosas (Devine *et al.*, 2008). Spinosad se ha mostrado inocuo para todos los organismos no objetivos, excepto las abejas melíferas, aunque no presenta ningún tipo de nocividad en éstas cuando los residuos del plaguicida ya se encuentran secos (Brunner, 1998). En otros estudios spinosad ha mostrado una leve nocividad para himenópteros (Scott-Dupree *et al.*, 2009).

Clorpirifos es un organofosforado que actúa inhibiendo la acetilcolinesterasa, es decir, bloquea la acción de ésta interrumpiendo la transmisión de impulsos entre las células nerviosas (Devine *et al.*, 2008). Este plaguicida se ha usado ampliamente en viviendas y en agricultura. En el hogar, se usa para controlar cucarachas, pulgas, y termitas; también se usa en ciertos collares de animales domésticos para controlar pulgas y garrapatas. En ganadería, se usa para controlar garrapatas y en agricultura para el control de plagas de cosechas (cochinillas, moscas blancas, trips de la platanera, numerosas orugas defoliadoras y minadoras, algunos escarabajos y otros insectos) (ANASAC; EPA, 2006).

Clorpirifos es clasificado por la EPA como clase II (moderadamente tóxico). Se ha encontrado que la exposición a este plaguicida puede generar daño en niños (Whyatt *et al.*, 2004) y adultos (Thrasher *et al.*, 2002), es altamente tóxico para los anfibios, y un estudio de la Encuesta Geológica de Estados Unidos encontró que su principal producto de degradación en el medio ambiente, clorpirifos Oxon, es aún más tóxico para los animales (Sparling & Fellers, 2007). También se le considera tóxico para peces y abejas, provocando daño inmediato y estrés oxidativo (Information Ventures Inc; Shafiq-ur-Rehman *et al.*, 2012).

Abamectina es un avermectin, que actúa activando el canal de cloruro, se adhiere y activa los canales de cloruro en la membrana nerviosa interrumpiendo la transferencia de iones y la transmisión de impulsos entre las células nerviosas (Devine *et al*, 2008). Es tóxico para abejas, peces y microcrustáceos acuáticos; y se le categoriza en Chile como Clase 3 (ANASAC, 2008).

El jabón potásico es un jabón suave a base de sales potásicas de aceites vegetales con alto contenido de materia orgánica, no genera ningún tipo de problemas medioambientales debido a inocuidad y a su carácter biodegradable (ANASAC).

Aceite mineral es un subproducto derivado del petróleo, que se caracteriza por su alta refinación y pureza, con acción insecticida - acaricida de contacto, recomendado para el control de diversas plagas en frutales. En Chile se le categoriza en la clase IV de toxicidad, lo que representa que generalmente no ofrece ningún peligro (ANASAC).

Azufre en polvo está indicado para el control de las plagas, sus pequeñas partículas permiten distribución uniforme y una óptima adherencia sobre la superficie de las hojas, sarmientos y frutos. Se considera no peligroso para las abejas, es prácticamente no tóxico para aves, mamíferos y peces (Azufre Landia<sup>R</sup>350 EXTRA).

Azufre floable (suspensión concentrada, en base acuosa) es un fungicida inorgánico que actúa principalmente en forma preventiva contra oídio en parronales, viñas, frutales y cultivos. Posee alta adherencia al follaje, mayor superficie de contacto, rápida acción y buena persistencia por su formulación y tamaño de partículas (ANASAC).

*Bacillus thuringiensis var kurstaki* es una bacteria Gram positiva que habita en el suelo, y que se utiliza comúnmente como una alternativa biológica al pesticida. También se le puede extraer la toxina Cry y utilizarla como plaguicida (Madigan & Martinko, 2005). Esta bacteria también aparece de manera natural en el intestino de las orugas de diferentes tipos de polillas y de mariposas, así como en las superficies poco iluminadas de las plantas (Madigan & Martinko, *op cit*).

Durante la esporulación, muchas cepas de *B. thuringiensis var kurstaki* producen cristales proteínicos, que poseen propiedades insecticidas. Por esta razón esta bacteria ha sido utilizada como insecticida y, más recientemente, para producir organismos genéticamente modificados (Roh *et al*, 2007).

Considerando los antecedentes anteriores, se ha propuesto en este trabajo, valorar en laboratorio el efecto residual, sobre *R.lophantae*, producido por 9 productos sintéticos (imidacloprid, acetamiprid, spirotetramato, methidation, metomilo, spinosad, clorpirifos, abamectina, tiametoxam) y 6 productos naturales (jabón potásico, azufre en polvo, azufre floable, bacillus var thuringensis, aceite mineral) empleados habitualmente en los cultivos de cítricos para el control biológico de plagas en Chile.

## 1.1. HIPÓTESIS

- A mayor grado de toxicidad mostrado por los plaguicidas comerciales, mayor será el periodo requerido para la supervivencia de al menos un 30% de la muestra de *Rhizobius lophantae* luego de la aplicación del plaguicida.
- Aun cuando los plaguicidas no causen mortalidad en ejemplares de *R. lophantae*, si generarán daño sub-letal.
- A mayor mortalidad provocada por los plaguicidas, mayor será el daño oxidativo en las células de los organismos sobrevivientes.

## 1.2. OBJETIVOS

### **Objetivo General:**

Evaluar el periodo de efecto residual de pesticidas comerciales, sobre el depredador de plagas *Rhyzobius lophanthae* en condiciones de laboratorio.

### **Objetivos Específicos:**

- Determinar la mortalidad, provocada por insecticidas comerciales, sobre adultos de *R. lophanthae*.
- Evaluar la persistencia de cada pesticida sobre adultos de *R. Lophanthae*.
- Evaluar el daño oxidativo producido por el contacto con plaguicidas comerciales, sobre estadios adultos de *R. lophanthae*
- Categorizar los plaguicidas evaluados de acuerdo al grado de toxicidad y residualidad, y sugerir un método eficiente de aplicación de control químico y biológico, para un manejo integrado de plagas

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se desarrollaron entre septiembre del 2012 y Junio del 2013 en el Laboratorio de Toxicología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA – La Cruz, en el Laboratorio de Investigación – Estrés Oxidativo, de la Facultad de kinesiología de la Universidad de Valparaíso, y en el Laboratorio de Microscopia y Toxicología del Departamento de Biología y Ciencias Ambientales de la Universidad de Valparaíso.

### **Insectos de prueba:**

Se evaluaron adultos, de ambos sexos, de *Rhyzobius lophantae* (Blaisdell) (Figura 1) obtenidos de la crianzas comerciales de la empresa Xilema S.A. y ControlBest. Estos enemigos naturales poseían entre 1 y 2 días de edad, y fueron criados usando calabaza (*Curcubita moschata*) como sustrato, inoculada con chanchito blanco (*Pseudococcus viburni*).

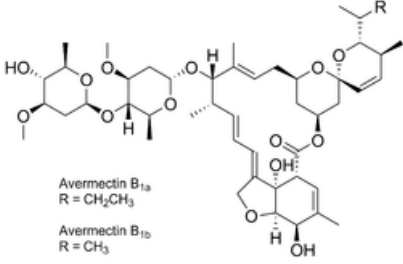
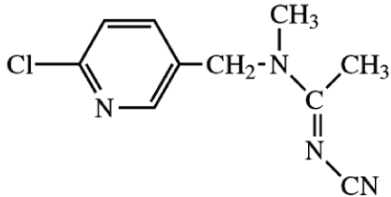
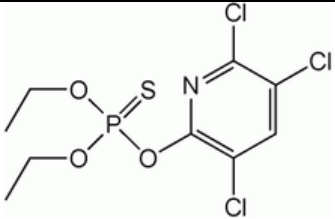
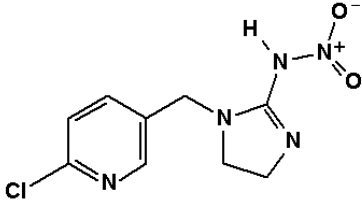
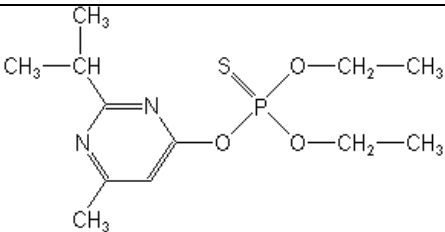


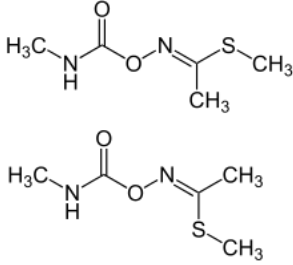
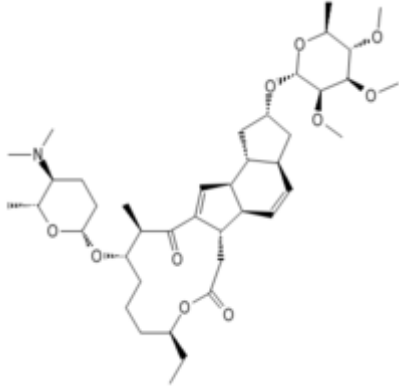
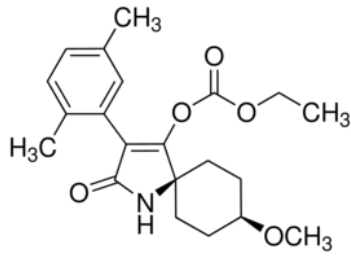
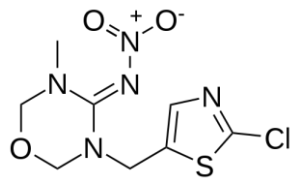
**Figura 1:** Estadio adulto de *Rhyzobius lophantae* de entre 1 y 2 días de edad, utilizados como insectos de prueba.

## **Plaguicidas:**

Se seleccionaron los plaguicidas más utilizados en agricultura convencional y producción orgánica (ver tabla 1 y 2) para el control de chanchito blanco (*Pseudococcus viburni*), escamas (Hemiptera: Diaspididae), polillas (*Cydia pomonella* y *Cydia molesta*), trips (Thysanoptera: Tripidae, *Thrips spp.*), mosquitas blancas (Homoptera: Aleyrodidae), arañitas rojas (Acariforme: Tetranychidae, *Tetranychus spp.*), falsa arañita de la vid (*Brevipalpus chilensis*), entre otros. Se utilizó la dosis más alta recomendada por el fabricante. Las dosis se prepararon para 1 litro de agua destilada. Los plaguicidas fueron obtenidos de la empresa Anasac, excepto el Azufre que fue obtenida de la empresa Azufres Landia y Success (DowAgroscience).

**Tabla 1:** Plaguicidas sintéticos comerciales utilizados en los experimentos de residualidad; y dosis máximas recomendadas por el fabricante

Plaguicidas	Nombre comercial	Fórmula Desarrollada	Dosis
Abamectina	Fast Plus	 <p>Avermectin B<sub>1a</sub> R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> Avermectin B<sub>1b</sub> R = CH<sub>3</sub></p>	80 cc/100 lt agua
Acetamiprid	Hurricane 70 WP		15 g/ hL
Clorpirifos	Troya 4 EC		120 cc/100 lt de agua
Imidacloprid	Punto 70 WP		30 grs/100 lt de agua
Metidathion	Polaris 40 WP		100 gr/100 lt

Metomilo	Greko 90 SP		2 kg/ha
Spinosad	Success 48 SC		12 cc/100 lt agua
Spirotetramato	Movento 100 SC		100 cc/hL
Thiamethoxam	Thiamethoxam 25 SC		400 gr/ ha

**Tabla 2:** Plaguicidas orgánicos comerciales evaluados en experimentos de residualidad; y dosis máximas recomendadas por el fabricante.

<b>Plaguicidas</b>	<b>Nombre comercial</b>	<b>Dosis</b>
Aceite Mineral	Ultraspray	1,5 L/hL
Azufre en polvo	Azufre Landia 350 EXTRA (93 % S)	20 kg/ha
Azufre floable	Azufre Floable AN 600	8 L/ ha
<i>Bacillus thuringensis</i> var kurstaki	Dipel WG	1000gr/ha (1000 lt de agua/ha)
Jabón potásico	AquaTalus	5%

## 2.1. Determinar la mortalidad producida por insecticidas comerciales sobre adultos de *Rhyzobius lophantae*

Se probaron 16 tratamientos (9 plaguicidas sintéticos, 6 plaguicidas orgánicos, y control), los que se dispusieron al azar y se replicaron 4 veces (Figura 2).



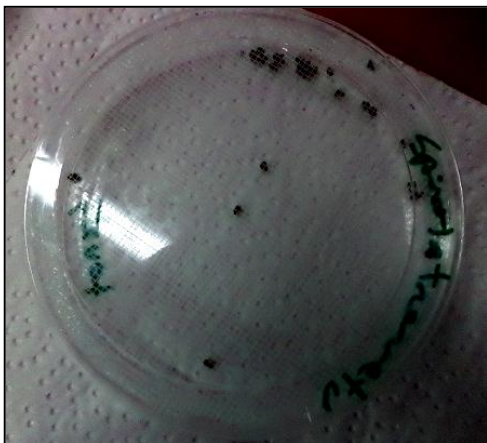
**Figura 2:** Montaje del experimento, en la fotografía se observan 5 de los 16 tratamientos, cada bandeja contiene las 4 réplicas de cada tratamiento.

Los plaguicidas y el control, se aplicaron a través de una torre Potter (Potter 1952), (Figura 3) asperjando 2 mL de mezcla insecticida (a 10 psi) sobre cada set de placas Petri (5 placas por tratamiento) de 9,5 cm de diámetro y 15 mm de grosor, a la mayor concentración recomendada por el fabricante (ver tablas 1 y 2). El tiempo de evaluación para cada plaguicida fue a partir de las 24 h desde su aplicación, y posteriormente se evaluó cada 7 días.



**Figura 3:** Vista frontal de Torre de Potter, en donde se dispersaron 2 mL de cada plaguicida sobre las respectivas placas Petri.

Para el control se usaron placas Petri a las que sólo se agregó agua destilada. En las tapas de las placas Petri se hizo un agujero de aproximadamente 8 cm de diámetro, que se cubrió con tul para ventilación, para evitar un efecto de cámara letal (Figura 4).



**Figura 4:** Capsula de Petri, rotulada, con insectos en su interior y cubierta con un tul para su ventilación.

Los 16 tratamientos se depositaron en bandejas plásticas con papel absorbente donde permanecieron por 24 horas en un invernadero para su secado a temperatura promedio de  $25^{\circ}\text{C} \pm 7$  con humedad relativa entre 70 y 80%.

Para evitar contaminación cruzada, previo a su uso el material fue lavado con acetona para eliminar posibles residuos. Además, todos los procedimientos se iniciaban siempre con el grupo de control con agua destilada y cada tratamiento contaba con todos los materiales individuales.

Una vez seco el plaguicida, se capturaron los adultos de *Rhyzobius lophantae* con un aspirador bucal con una puntilla con el diámetro suficiente para introducir los adultos evitando la sobre manipulación. Previamente estos eran anestesiados con frío durante un tiempo inferior a 3 minutos para facilitar su manipulación. Una vez en la puntilla los insectos eran rápidamente introducidos, con suaves golpes, a cada una de las placas. En cada placa Petri se introdujeron 20 insectos, lo que hacía un total de 100 individuos por cada plaguicida.

Una vez incorporados los adultos de *R. lophantae* a todos los tratamientos y sus respectivas replicas, el set se instaló en una unidad con control de temperatura, humedad, y fotoperiodo ( $24^{\circ}\text{C} \pm 3$ , 65 - 70%, 10:14 (L:O) respectivamente) y a las 24 horas después se procedió a registrar la mortalidad en cada uno de los tratamientos. Para evitar la contaminación en los tratamientos los insectos no fueron alimentados mientras eran sometidos al bioensayo. Así también, como una forma de prevenir

errores en la manipulación, o conservación del insecto se realizaron varias pruebas previas al ensayo.

## **2.2. Evaluar la persistencia de cada plaguicida sobre *R. lophantae***

La variable respuesta considerada en la evaluación de los plaguicidas es la mortalidad de los coccinélidos en cada una de las réplicas por tratamiento. Esta se evaluó a las 24 h de aplicado, 7 días después, 14 días después y posteriormente cada 7 días, cada vez con una cohorte nueva de insectos, hasta registrar un porcentaje menor o igual al 30% de mortalidad, porcentaje que de acuerdo a la categoría de toxicidad de la OILB (IOBCwprs Working group "Pesticides and beneficial organisms" and IOBCwprs Commission "IP Guidelines and Endorsement") para bioensayos de laboratorios, los plaguicidas son considerados como inocuos. Partiendo de la base que los insectos están obligados a moverse en una superficie con plaguicidas en un contenedor es normal que la mortalidad en este tipo de ensayos sea sobreestimada, por lo tanto mortalidades de un 30% son considerados inocuas. Se consideraron también como muertos todos aquellos individuos que se mostrasen claramente afectados o moribundos.

### **2.3. Evaluar el daño oxidativo producido por el contacto con plaguicidas comerciales, sobre estadios adultos de *R. lophantae*.**

El nivel de peroxidación lipídica (LPX) se evaluó por la producción de malondialdehído (MDA) producto final de oxidación de la membrana plasmática, este se estima a través de su reacción con ácido tiobarbiturico (TBA) (Health & Packer, 1968).

Los cuatro plaguicidas que resultaron ser inocuos desde el día uno, tras la aplicación del plaguicida, se compararon midiendo el efecto subletal en los insectos, a través de la medición de la peroxidación lipídica, utilizando MDA (malondialdehído) como factor de medición, agua destilada como control. También se utilizó un control negativo de tal forma de comprobar que los resultados obtenidos correspondían a un orden de toxicidad, en este caso se optó por el aceite mineral que presentó una leve mortalidad el día uno de experimentación.

Los insectos sobrevivientes a la acción de los plaguicidas fueron congelados con nitrógeno líquido, macerados y guardados rápidamente en tubos *Eppendorf* (uno para cada plaguicida en cuestión), los que se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se masaron 50 mg de muestra, a la cual se agregaron 2 mL de Buffer fosfato (pH=7) y se volvió a macerar. 2mL de este macerado se introdujeron en un tubo *Eppendorf*, al que se añadieron 2 mL de ácido tricloro acético (TCA) al 10% (P/V). La mezcla se homogeneizó siendo sometida a 15 minutos de centrifugación a 3000 rpm.

Luego, 1.5 mL del sobrenadante se mezclaron con 1 mL de una disolución 0,67% de TBA. La mezcla se incubó a temperatura de ebullición (baño de agua) durante 20 minutos; se dejó enfriar a temperatura ambiente.

La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro Ray Leigh UV-2601 entre 400 a 600 nanómetros de longitud de onda. El pick de malondialdehído es detectado a aproximadamente 535 nm.

La curva obtenida fue analizada con el software *ORIGIN 8*, y su resultado se registró en nmol/mL de suero.

**2.4. Categorizar los plaguicidas evaluados de acuerdo al grado de toxicidad y residualidad, y sugerir un método eficiente de aplicación de control químico y biológico para un manejo integrado de plagas.**

Los plaguicidas utilizados se clasificaron de acuerdo a la categoría de toxicidad de la OILB para bioensayos de laboratorio, la cual se resume en la siguiente tabla:

**Tabla 3:** Categorías de toxicidad de plaguicidas según la OILB.

<b>Plaguicidas</b>	<b>Toxicidad</b>	<b>Mortalidad (%)</b>
<b>Inocuos</b>	1	<30
<b>Levemente nocivo</b>	2	30–79
<b>Moderadamente nocivo</b>	3	80–99
<b>Nocivo</b>	4	>99

Boller *et al.*, 2005 Working Document on Selectivity of Pesticides.

Sobre la base de la toxicidad, periodo residual, y daño oxidativo presentados por los insectos hacia los plaguicidas, se sugirió el plaguicida que menos daño provoca en la fauna benéfica, en este caso *Rhizobius lophantae*, y el tiempo a esperar luego de la aplicación del plaguicida para introducir el control biológico.

## 2.5. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados en base al Modelo Lineal Generalizado (MLG), se sometieron a un análisis de la varianza utilizando el programa informático SPSS v15.0. Previamente se realizó una comprobación de igualdad entre las medias de las cuatro repeticiones mediante el test t de Student, para lo cual se utilizó el mismo programa informático. Se considera que no existen diferencias significativas entre las medias de fechas, con un nivel de significación del 95%, cuando el intervalo de confianza para la diferencia entre medias incluye el valor cero.

Una vez probado que efectivamente existía igualdad de medias, se tuvieron en cuenta los resultados conjuntos de las cuatro repeticiones, de esta forma el análisis de la varianza fue para un solo factor: tratamiento. Los datos fueron transformados empleando el Probit de la proporción.

Para comparar el efecto residual de los plaguicida sobre *R. lophantae*, el análisis estadístico fue considerado un Modelo Lineal Generalizado con parcelas divididas. Esta diferencia con el caso anterior, se debe a que se evalúan dos variables: días y tratamientos (residualidad). Las parcelas de tratamiento se arreglaron en un diseño de bloques totalmente aleatorizado con 4 réplicas. El programa utilizado para el análisis estadístico fue SPSS v15.0, y las diferencias significativas fueron declaradas a un nivel del 5% de probabilidad.

También se realizó una comparación entre los plaguicidas orgánicos y sintéticos probados, pertenecientes a cada categoría establecida por la OILB. Los datos fueron sometidos a la prueba de la t de Student, con un nivel de significación del 95%.

La evaluación del estrés oxidativo producido por el contacto con plaguicidas comerciales, sobre estadios adultos de *R. lophantae*, presenta una variable continua. Por ende los datos se sometieron a un análisis de varianza utilizando el programa informático SPSS v15.0. Los resultados fueron expresados como promedio  $\pm$  error estándar. Para determinar la significación estadística se utilizó la prueba HSD de Tukey, con un nivel de significación del 95%.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Mortalidad producida por insecticidas comerciales sobre adultos de *Rhyzobius lophantae*

No se registraron diferencias significativas entre las réplicas de los tratamientos.

A las 24 horas de aplicado el plaguicida sobre *R. lophantae* se establecieron seis grupos diferenciados (Tabla 4). En el primero, se encuentran dos plaguicidas orgánicos: jabón potásico, y *Bacillus thuringiensis var kurstaki*; ambos plaguicidas se encuentran en la misma categoría que el control, destacando por su baja nocividad (mortalidad menor al 7%).

En el segundo grupo se encuentra el azufre en polvo, azufre floable. Ambos plaguicidas mostraron porcentajes de mortalidad bajos (cercaos al 10%) (Tabla 4), pero que se encontraban levemente por sobre el primer grupo.

A partir del tercer grupo de categorización en base a los análisis estadísticos, se comienza a obtener una mortalidad superior o igual al 30% de los insectos, y por lo tanto continúan en observación por su efecto residual a los siguientes 7 días.

Aceite mineral y spirotetramato forman parte de la tercera categoría, mostraron porcentajes bajos de mortalidad pero considerablemente mayores que los del grupo anterior (Tabla 4). Spirotetramato genero una mortalidad menor al 30% pero bastante cercano a este, y considerando que el estado de los insectos vivos no era el más propicio, se optó por continuar con su experimentación a los 7 días posteriores a la aplicación del plaguicida.

Clorpirifos conforma la cuarta categoría, la mortalidad provocada por este plaguicida a las 24 horas de la aplicación del mismo, es significativamente mayor que la del tercer grupo nombrado llegando aproximadamente a duplicar el valor (Tabla 4).

En la penúltima categoría se encuentra abamectina, plaguicida que mostró una nocividad muy alta, pero que sin embargo no llega a alcanzar el 100% (Tabla 4). En la última categoría se encuentran los plaguicidas methidation, metomilo, imidacloprid, thiamethoxam, y acetamiprid, los que tuvieron un efecto nocivo provocando la mortalidad total de los insectos evaluados. Los datos sobre mortalidad según el tiempo

transcurrido desde que el plaguicida fue aplicado (tiempo residual) se expresan en porcentaje (Tabla 4), y se comparan entre los distintos plaguicidas (Figura 5).

**Tabla 4:** Mortalidad media producida por plaguicidas sintéticos y orgánicos, sobre el estadio adulto de *R. lophantae* a las 24 horas después de la aplicación de los plaguicidas.

Tipo de Plaguicida	Plaguicida	Mortalidad media a las 24 horas (%)
Control	Control	4 ± 3.3 a
Sintéticos	Acetamiprid	100 f
	Abamectina	83 ± 3.3 e
	Clorpirifos	63 ± 11.3 d
	Imidacloprid	100 f
	Methidation	100 f
	Metomilo	100 f
	Spinosad	12 ± 6.5 b
	Spirotetramato	27 ± 3.8 c
	Thiamethoxam	100 f
Orgánicos	Aceite Mineral	36 ± 5.7 c
	Azufre en polvo	12 ± 6.5 b
	Azufre floable	11 ± 6 b
	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>var kurstaki</i>	7 ± 6.8 a
	Jabón Potásico	7 ± 3.8 a

En una misma columna, los datos seguidos por la misma letra no difieren significativamente entre sí ( $p \geq 0.05$ ).

### 3.2. Persistencia de cada plaguicida sobre *R. lophantae*

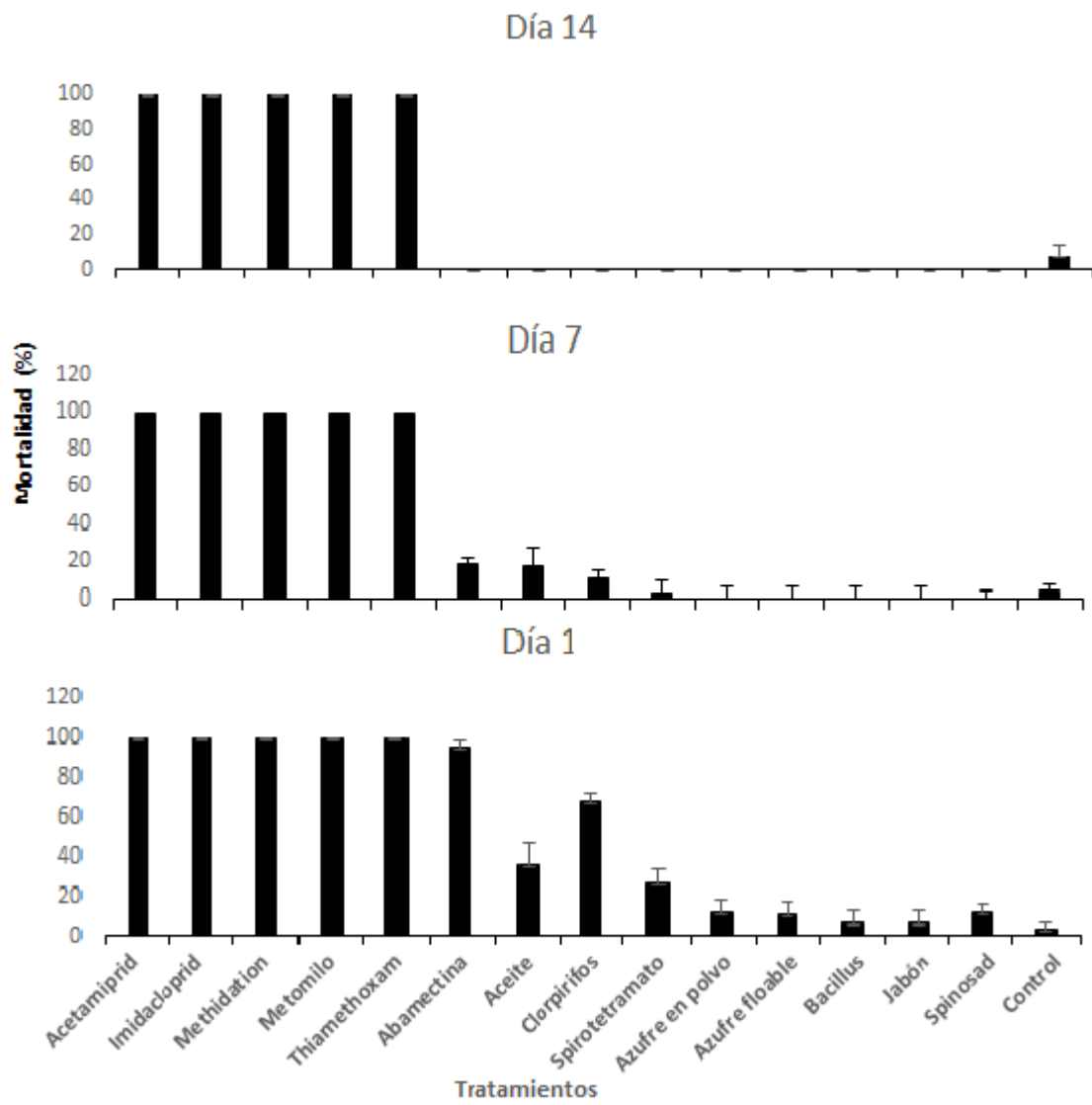
En la Tabla 5 se resume la mortalidad en el tiempo que generaron los tratamientos sobre *Rhizobius lophantae*. Al comenzar el experimento (día 1 Tabla 5) se evaluaron 14 plaguicidas y 6 resultaron inocuos. Prosiguiendo con el protocolo, a los siete días de aplicado el plaguicida, los productos evaluados se redujeron a 9, ya que se eliminaron todos aquellos que resultaron inocuos menos el spirotetramato el cual se sometió a prueba para corroborar su inocuidad, de esta forma resultaron 4 de estos inocuos. Luego a partir del día 14, se observó una constante caracterizada por la presencia de acetamiprid, imidacloprid, methidation, metomilo, y thiamethoxam, 5 plaguicidas que continúan hasta el día 48 de experimentación registrando un 100% de mortalidad.

La Figura 5 ilustra el porcentaje de mortalidad generado por los tratamientos, sobre *R. lophantae* tras el primer, séptimo, y catorceavo día tras la aplicación de los plaguicidas. Se puede observar que al día uno de la aplicación, la mortalidad en 5 de los plaguicidas (jabón potásico, *Bacillus thuringensis* var *kurstaki*, spinosad, azufre floable, azufre en polvo) se encuentra bajo el 20%. Aceite mineral y spirotetramato presentan una mortalidad baja cercana al 30%, en clorpirifos la mortalidad es cercana al 70%, abamectina posee un efecto más potente presentando una mortalidad cercana al 100%, mientras que metomilo, methidation, imidacloprid, acetamiprid, y thiomethoxam presentan un 100% de mortalidad. A los 7 días de aplicado el plaguicida, abamectina y clorpirifos disminuyen su tasa mortalidad bajo a menos del 20%, mientras que aquellos plaguicidas que generaban un 100% de mortalidad continúan haciéndolo. Por último, tras 14 días de la aplicación del plaguicida, se pudo observar que el efecto nocivo de los cinco plaguicidas que generaban un 100% de mortalidad, continúa.

**Tabla 5** Mortalidad media de estados adultos de *R.lophantae* a las 24 horas y cada 7 días a partir de la aplicación de los plaguicidas.

<b>Mortalidad de <i>Rhyzobius lophantae</i> (%)</b>								
	<b>1 día</b>	<b>7 días</b>	<b>14 días</b>	<b>21 días</b>	<b>28 días</b>	<b>35 días</b>	<b>42 días</b>	<b>48 días</b>
Control	4 ± 3.3 a	5 ± 3.3 a	5 a	8 a	6 a	8 a	8 a	7 a
Acetamiprid	100 f	100 c	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b
Abamectina	83 ± 3.3 e	19 ± 6.8 b	-	-	-	-	-	-
Clorpirifos	63 ± 11.3 d	11 ± 3.8 a	-	-	-	-	-	-
Imidacloprid	100 f	100 c	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b
Methidation	100 f	100 c	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b
Metomilo	100 f	100 c	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b
Spinosad	12 ± 6.5 b	-	-	-	-	-	-	-
Spirotetramato	27 ± 3.8 c	3 ± 2 a	-	-	-	-	-	-
Thiamethoxam	100 f	100 c	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b
Aceite Mineral	36 ± 5.7 c	17 ± 2 b	-	-	-	-	-	-
Azufre en polvo	12 ± 6.5 b	-	-	-	-	-	-	-
Azufre floable	12 ± 6 b	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus thuringensis var kurstaki	7 ± 6.8 a	-	-	-	-	-	-	-
Jabón Potásico	7 a	-	-	-	-	-	-	-

En una misma columna, los datos seguidos por la misma letra no difieren significativamente entre sí ( $p \geq 0.05$ ).

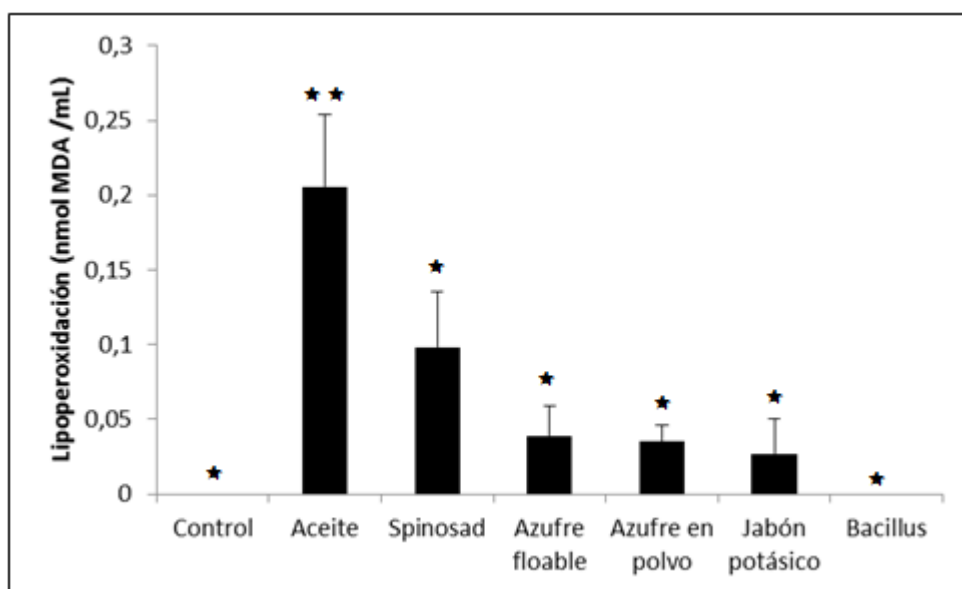


**Figura 5:** Mortalidad de *R. lophantae* producida por el efecto residual de plaguicidas de tipo orgánico y sintético, representada en porcentajes.

### 3.3. Estrés oxidativo producido, por el contacto con plaguicidas, sobre estadios adultos de *R. lophantae*.

Los resultados ilustrados en la figura 6 muestran que los niveles de MDA encontrados en *Rhyzobius lophantae* mantenidos en las placas Petri con el control, y con la bacteria utilizada como plaguicida, *Bacillus thuringensis* var *kurstaki*, son aproximadamente cero. El azufre en polvo, el azufre floable y el jabón potásico, muestran cantidades similares de MDA el cual se encuentra bajo los 0,05 nmolMDA/mL. Los insectos mantenidos en spinosad, muestran una peroxidación cercana a los 0,1 nmolMDA/mL. Y por último, aquellos insectos que presentaron mayor estrés oxidativo, fueron quienes estuvieron mantenidos en aceite mineral, registrando cerca de 0,2 nmolMDA/mL.

Aun cuando se presentan diferencias entre los valores de MDA encontrados para cada plaguicida evaluado, el test a posteriori de Tukey ( $F=15.798$ ,  $gl=6$ ,  $p<5$ ) estableció que el único valor significativamente diferente era el valor mostrado por el aceite mineral (Figura 6).



**Figura 6:** Cantidad de MDA (nmol MDA/mL), registrada en *R. lophantae*, para cada uno de los plaguicidas que resultaron inocuos al primer día de aplicación. Los distintos números de asteriscos sobre las barras representan diferencias estadísticamente significativas entre estas (test Tukey,  $p < 0.05$ ).

Es importante mencionar que en el análisis de estrés oxidativo no se consideró a spirotetramato, ya que aun cuando era inocuo desde el primer día posterior a su aplicación, la cantidad de insectos sobrevivientes era insuficiente para realizar el ensayo.

### **3.4 Categorizar los plaguicidas evaluados de acuerdo al grado de toxicidad y residualidad, y sugerir un método eficiente de aplicación de control químico y biológico para un manejo integrado de plagas.**

La Tabla 6 muestra las mortalidades producidas por los plaguicidas hacia adultos de *R. lophantae* al primer día de experimentación. Seis plaguicidas se encuentran en la categoría de inocuos (mortalidad < 30%), 2 levemente nocivos (mortalidad entre 30% y 79%), 2 moderadamente nocivos (mortalidad entre 80% y 99%), y 5 nocivos (Mortalidad del 100%) según las categorías establecidas por la OILB para estados del insecto menos susceptibles. A los 7 días de aplicados los tratamientos, se observó el efecto inocuo de 3 plaguicidas, y la mantención de la nocividad en 5 de los plaguicidas evaluados. Desde los 14 días de aplicados los tratamientos hasta el último día de experimentación (día 48), se observó la nocividad de los mismos 5 plaguicidas.

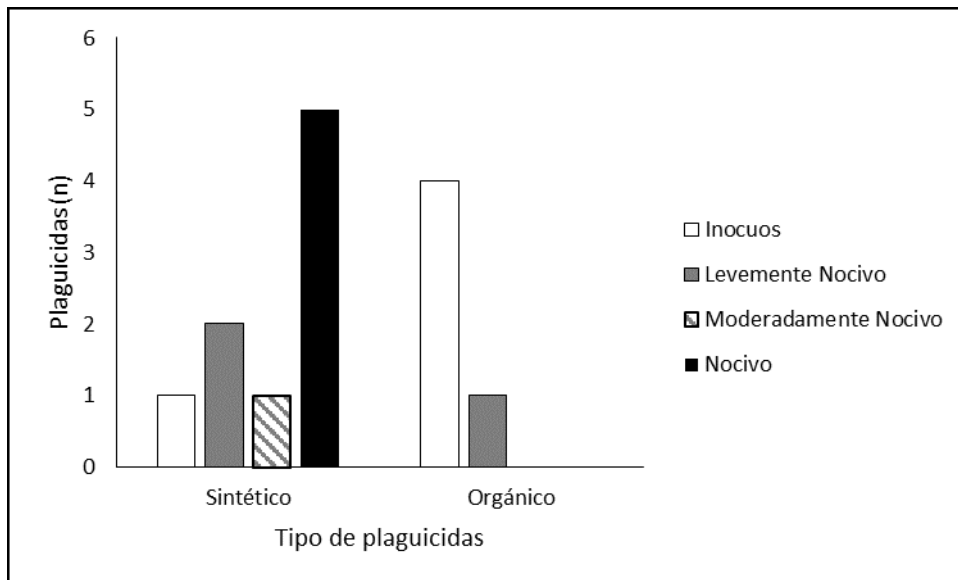
Aquellos plaguicidas que fueron nocivos hasta los 48 días posteriores a la aplicación del plaguicida son: acetamiprid, methidation, metomilo, imidacloprid, y thiamethoxam (Tabla 6). Mientras que los plaguicidas que se mostraron inocuos desde el primer día fueron: *Bacillus thuringiensis var kurstaki*, jabón potásico, azufre en polvo, azufre floable, spinosad y spirotetramato (Tabla 6).

Al incorporar estos resultados a los obtenidos para estrés oxidativo se obtuvo un orden de nocividad el que comienza con *Bacillus thuringiensis var kurstaki* como aquel que generó mayor inocuidad sobre *Rhyzobius lophantae*; seguido en orden ascendente de toxicidad por jabón potásico, azufre en polvo, azufre floable, spinosad y spirotetramato. Generando una nocividad levemente mayor se encontró el aceite mineral, abamectina y clorpirifos. Y como plaguicidas totalmente nocivos se consideraron metomilo, methidation, thiamethoxam, imidacloprid y acetamiprid.

**Tabla 6:** Categorización de los plaguicidas según la escala establecida por la OILB para bioensayos en laboratorio, en el tiempo.

	1 día	7 días	14 días	21 días	28 días	35 días	42 días	48 días
Control	Inocuo	Inocuo	Inocuo	Inocuo	Inocuo	Inocuo	Inocuo	Inocuo
Acetamiprid	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo
Abamectina	Moderadamente Nocivo	Inocuo	-	-	-	-	-	-
Clorpirifos	Levemente Nocivo	Inocuo	-	-	-	-	-	-
Imidacloprid	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo
Methidation	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo
Metomilo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo
Spinosad	Inocuo	-	-	-	-	-	-	-
Spirotetramato	Inocuo	-	-	-	-	-	-	-
Thiamethoxam	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo	Nocivo
Aceite Mineral	Levemente Nocivo	Inocuo	-	-	-	-	-	-
Azufre en polvo	Inocuo	-	-	-	-	-	-	-
Azufre floable	Inocuo	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus thuringensis var kurstaki	Inocuo	-	-	-	-	-	-	-
Jabón Potásico	Inocuo	-	-	-	-	-	-	-

A modo de realizar una comparación entre los plaguicidas orgánicos y sintéticos, se recopilaron los resultados ilustrados en la segunda columna de la Tabla 6. Se pudo observar que en el caso de los plaguicidas orgánicos ninguno se encuentra en la categoría de nocivo, mientras que cuando se trata de plaguicidas sintéticos cinco de ellos estuvieron en dicha categoría. Los datos fueron significativamente diferentes para sintéticos y orgánicos en todas las categorías ( $t=2.071$ ,  $gl=7$ ,  $p<005$ ), exceptuando en levemente nocivo donde los valores fueron idénticos. En otras palabras, los resultados expuestos muestran una tasa de mortalidad mayor para plaguicidas de tipo sintético, en comparación con aquellos de tipo orgánico (Fig.7.).



**Figura 7:** Número de plaguicidas sintéticos y orgánicos analizados que pertenecen a cada una de las categorías establecidas por la OILB.

La Tabla 7 muestra los días necesarios para poder introducir el controlador biológico *R. lophantae*, en un territorio que previamente conto con la presencia de plaguicidas. Estos días fueron determinados en base al momento en que los plaguicidas comenzaron a ser inocuos para adultos de *R. lophantae*.

Aquellos plaguicidas que hasta el día 48 de experimentación mostraron nocividad, no obtuvieron un día recomendado para el ingreso del controlador biológico, colocándose en la Tabla 7 como “No determinado”.

**Tabla 7:** Días necesarios para colocar el control biológico, posterior a la aplicación de un plaguicida.

<b>Plaguicida</b>	<b>Días</b>
Acetamiprid	No determinado (>48)
Abamectina	7
Clorpirifos	7
Imidacloprid	No determinado (>48)
Methidation	No determinado (>48)
Metomilo	No determinado (>48)
Spinosad	1
Spirotetramato	1
Thiamethoxam	No determinado (>48)
Aceite Mineral	7
Azufre en polvo	1
Azufre floable	1
Bacillus thuringensis var kurstaki	1
Jabón Potásico	1

## 4. DISCUSIÓN

Pese a que el efecto producido por el contacto de plaguicidas sobre fauna auxiliar está ampliamente documentado en sus diferentes aspectos, tales como: mortalidad, reducción de la sobrevivencia y/o reproducción, etc. (Croft, 1990), para las principios activos de los plaguicidas aquí estudiados y en el caso de coccinélidos adultos, son escasos los ensayos tanto de laboratorio como de campo realizados.

Nuestros resultados son consistentes con la literatura. Ripa y Larral (2008) encontraron un efecto inocuo del jabón potásico sobre *R. lophantae* a las 24 horas tras la aplicación del plaguicida, y 24 horas de exposición de *Rhyzobius lophantae*, en ensayos realizados en laboratorio, en Chile. El azufre ha mostrado efectos de inocuidad en ácaros y sus depredadores (Prischmann *et al*, 2005), y en el coccinélido *Cycloneda sanguínea* (Del Pozo, 1988). *Bacillus thuringensis var kurstaki* se ha mostrado inocuo en nuestros resultados, lo que es acorde con los resultados encontrados por Pilcher *et al* (1997) y Mohammad *et al* (2001). Planes *et al* (2012) clasificaron a spirotetramato como inocuo para *Cryptolaemus montrouzieri*, coccinélido con grandes semejanzas a *Rhyzobius lophantae*.

El único plaguicida que resultó inocuo a 24 horas de la aplicación del tratamiento y que posee mayores diferencias con la literatura es spinosad. Boyero *et al* (2005) lo clasifican como inocuo para *R. lophantae*. Sin embargo, Budia *et al* (2000) y Viñuela *et al* (2001) encontraron una elevada mortalidad sobre hemípteros depredadores a partir de las 24 horas, mientras que para *Chrysoperla carnea* (Stephens), un crisópido, la mortalidad sólo se produjo a dosis muy elevadas (Viñuela *et al.*, *op cit*). Ruiz *et al* (2004) y Medina *et al* (2002) encontraron una baja mortalidad en sus ensayos con otros insectos tratados con spinosad. Los resultados pueden diferir, dado que spinosad se ha mostrado especialmente tóxico por ingestión de presas, no así por contacto residual (Boyero *et al*, *op cit*; Viñuela *et al*, 1998) que corresponde a nuestro caso. Ensayos en el campo, donde los insectos se alimentan sobre las presas podrían mostrar una mayor toxicidad de este producto.

El aceite mineral mostró en nuestros ensayos una leve nocividad, lo que coincide con los resultados encontrados por Ripa y Larral (2008), quienes lo consideraron levemente tóxico a las 24 horas de exponer el adulto de *R. lophantae* ante residuos del plaguicida.

En lo que respecta a clorpirifos los ensayos de campo muestran una baja (Bellows & Morse, 1988) o nula toxicidad (Luna *et al.*, 1999) sobre adultos de *C. montrouzieri*. En el laboratorio en tanto, se ha observado un efecto ligeramente tóxico (30 a 70% de mortalidad) sobre el coccinélido antes nombrado (Ripollés, 1986). Boyero *et al* (2005) encontraron un 100% de mortalidad en sus ensayos con *Rhizobius lophantae*, e inocuidad por parte del mismo plaguicida al aplicarlo sobre *C. montrouzieri*. Por otra parte, Prischmann *et al* (2005) documentaron inocuidad de clorpirifos sobre depredadores de ácaros.

En estudios en campo methidation ha mostrado una toxicidad de baja a moderada sobre *C.montrouzieri* (Gravena *et al.*, 1993), mientras que en ensayos en laboratorio con pupas de esta misma especie, la mortalidad fue del 60% (Ripollés & Palau, 1993). Las diferencias con nuestros resultados pueden deberse a que las dosis utilizadas en los estudios nombrados fueron menores a las utilizadas en nuestros ensayos, así como al hecho de que *C.montrouzieri* es un coccinélido que mide aproximadamente el doble que *R.lophantae*, lo que le podría otorgar mayor resistencia a los plaguicidas. Por otra parte, en estudios de Boyero *et al* (2005) y Ripa y Larral (2008), methidation generó un 100% de mortalidad a las 24 hrs de su aplicación sobre *R. lophantae*. En esta misma línea están los resultados obtenidos en nuestros ensayos, donde a las 24 horas se alcanza una mortalidad del 100%.

Metomilo e imidacloprid presentaron una gran toxicidad, categorizándose como nocivos, tanto en nuestros ensayos como en los realizados previamente por Ripa y Larral (2008).

Videla (2007) consideró a thiomethoxam como un plaguicida levemente tóxico para *R. lophantae*. De la misma forma fue considerado por Rahmani *et al* (2013) en sus estudios sobre el coccinélido *Hippodamia variegata*. Pero por otra parte, nuestro trabajo así como el de Torres *et al* (2003) lo clasifican como nocivo para *R. lophantae* y el coccinélido *Delphastus pusillus*, respectivamente. Las diferencias específicamente con Videla (2007) quien analizó el mismo plaguicida sobre el mismo insecto, se pueden deber a que en dicho ensayo se utilizó la dosis mínima recomendada por el fabricante (0.2g/1L), mientras que en este estudio se utilizó la dosis máxima recomendada por el fabricante (5.67g/1L).

Cloyd y Dickinson (2006) en los ensayos efectuados sobre adultos de *C. montrouzieri*, encontraron un 100% de mortalidad al aplicar acetamiprid. Por otra parte Fuentes-

Contreras *et al* (2007) encontraron mortalidad muy altas para el mismo plaguicida sobre el hemíptero *Myzus persicae nicotianae*. Ambos concuerdan con los resultados obtenidos en nuestros ensayos, en donde acetamiprid causó un 100% de mortalidad en adultos de *R.lophantae*.

Respecto a la mortalidad medida a través del tiempo, clorpirifos causó mortalidades muy bajas al séptimo día tras la aplicación del plaguicida, categorizándolo como inocuo. Este resultado no coincide con los ensayos realizados por Boyero *et al* (2005), quienes para un periodo de 48 y 72 horas, lo situaron en las categorías de ligera y moderadamente tóxico respectivamente, según los criterios de la OILB para estados de desarrollo menos susceptibles.

En lo que respecta a methidation, metomilo e imidacloprid, en pruebas de laboratorio, se han mostrado altamente tóxicos (100% de mortalidad) para adultos del depredador *R. lophantae*. Esta toxicidad se mantiene por al menos 7 días después de aplicados los plaguicidas (Ripa & Larral, 2008). Fuentes-Contreras *et al* (2007) documentaron las altas mortalidades producidas por imidacloprid, sobre el hemíptero *Myzus persicae nicotianae*, incluso a 75 días desde su aplicación.

No se conoce información respecto al efecto residual de thiamethoxam sobre *R.lophantae*, pero los ensayos indican una fuerte nocividad por parte del plaguicida. Los que concuerdan con los resultados encontrados por Torres *et al* (2003) en otro coccinéido, quienes aunque no evaluaron el efecto residual, si utilizaron distintas dosis del plaguicida, encontrando altas mortalidad inclusive a dosis mucho más bajas que las evaluadas en este trabajo.

Se ha documentado la nocividad del plaguicida acetamiprid, en condiciones de laboratorio, sobre adultos de *C. montrouzieri* hasta después de 48 horas (Cloyd & Dickinson, 2006) y hasta 50 días desde su aplicación (Fuentes-Contreras *et al*, 2007).

A pesar de que la medición del daño oxidativo producido en membrana es un mecanismo que es bastante utilizado a nivel mundial, esta metodología no había sido empleada con anterioridad en coccinéidos adultos para la evaluación del efecto de plaguicidas. También es primera vez que se realizan ensayos en donde la cantidad de muestra requerida para estimar un daño oxidativo en el ser vivo, sea tan pequeña como la utilizada en el presente ensayo (50 mg, por plaguicida). De esta forma, los resultados obtenidos, abren una puerta a la investigación entomológica y ambiental,

permitiendo utilizar esta técnica en insectos los que pueden ser utilizados como biomarcadores de contaminación o toxicidad en los ecosistemas.

Es sabido que generalmente cuando un sistema biológico interactúa con plaguicidas que presentan toxicidad, reacciona y metaboliza los principios activos de dicho plaguicida, produciendo la formación de especies reactivas, las cuales aumentan a medida que es mayor la exposición, por tanto como uno de sus resultados se produce peroxidación lipídica afectando a nivel membranoso al sistema (Aslanturk *et al.*, 2011). En este estudio se encontró una diferencia significativa entre los valores de MDA como producto de daño oxidativo a membrana, generados por aceite mineral y el resto de los plaguicidas. Esta significancia puede deberse a que la cantidad de muestra era baja, pero de todas formas permite diferenciar la nocividad de los plaguicidas, ya que aceite mineral era el único de los plaguicidas sometidos a TBARS que había presentado una categoría de toxicidad diferente (levemente nocivo) a las 24 horas posteriores a la aplicación del plaguicida.

A pesar de no encontrarse diferencias significativas en los niveles de MDA presentes en los plaguicidas categorizados como inocuos tras las 24 horas de la aplicación del plaguicida, los resultados encontrados si indican un orden de la toxicidad sub-lethal de los plaguicidas que es acorde con los resultados encontrados para la toxicidad letal. En otras palabras, los plaguicidas que generaron un mayor porcentaje de mortalidad son aquellos que generan una mayor generación de MDA a nivel plasmático en los insectos sobrevivientes.

Sobre la base de que 6 plaguicidas (*Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*, azufre en polvo, azufre floable, jabón potásico, spirotetramato, y spinosad) resultaron inocuos el primer día, se recomiendan estos para un manejo integrado de plagas, a la vez que es posible introducir al controlador biológico *R. lophantae* en tan solo un día después de la aplicación del plaguicida. Sin embargo, se sugiere excluir a spinosad de dicha recomendación, dado que estudios previos han mostrado que su toxicidad es fundamentalmente a través de ingesta (Ruiz *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2002; Boyero *et al.*, 2005; Viñuela *et al.*, 1998). De esta forma, al dejar caer residuos frescos del plaguicida en el campo estos podrían ser ingeridos por el controlador biológico causando una mortalidad mayor a la observada en condiciones de laboratorio, análisis que no se realizó en este estudio.

En lo que respecta a aceite mineral, clorpirifos y acetamiprid, no se recomienda estos plaguicidas para un manejo integrado de plagas. En caso de que el agricultor o persona a cargo del control de plagas quiera realizar el cambio de control por plaguicidas a control biológico, y haya añadido previamente uno de estos plaguicidas, debiese realizar el cambio a partir de los 7 días posteriores a la aplicación de este.

Se recomienda el total desuso de los plaguicidas metomilo, thiamethoxam, methidation, imidacloprid, y acetamiprid, los cuales generaron un efecto de total nocividad hasta a lo menos 48 días después la aplicación del plaguicida. Aun cuando se conoce que la degradación de los plaguicidas en campo es mucho mayor que aquella provocada en laboratorio, este punto ya es considerado en la categorización otorgada por la OILB quienes estiman que un 30% o menos de mortalidad es un efecto inocuo en las pruebas realizadas en laboratorio sobre insectos. De esta forma Chile se sumaría a la decisión tomada por España y otros 12 países de la Unión Europea que establece la restricción del uso de imidacloprid y thiamethoxam, decisión que rige a partir del 1 de Diciembre de 2013.

En los resultados fue posible observar una diferencia entre la nocividad de los plaguicidas sintéticos con respecto a los orgánicos, siendo estos últimos menos dañinos para el depredador testeado. En base a esto, se sugiere el uso de plaguicidas orgánicos para un mejor manejo integrado de plagas.

## 5. CONCLUSIONES

*Rhyzobius lophantae*, es un controlador biológico, que sufre una gran nocividad por la mayoría de los plaguicidas utilizados frecuentemente en la agricultura.

Los plaguicidas sintéticos en general, son más nocivos para el depredador de plagas *R. lophantae*, que los plaguicidas orgánicos.

Ninguno de los plaguicidas orgánicos usados resulto nocivo a las 24 horas de la aplicación, para adultos de *R. lophantae*.

Spinosad y spirotetramato son los plaguicidas de tipo sintético que generan menos mortalidad sobre *R. lophantae* en ensayos de laboratorio por contacto, considerándose inocuos a las 24 horas del tratamiento.

Metomilo, methidation, imidacloprid, thiamethoxam y acetamiprid; mostraron una residualidad que generó la mortalidad del 100% de los insectos tratados por más de 48 días, en condiciones de laboratorio y se recomienda su prohibición.

Aun cuando no se genere mortalidad del organismo, estos si sufren de daño sub-letal, específicamente daño oxidativo, por la presencia de plaguicidas. Excepto *Bacillus thuringensis var kurstaki*, quien no presentó ninguna clase de nocividad.

El ensayo TBARS podría ser una alternativa para determinar daño oxidativo en coccinélidos, siendo posible utilizar a estos pequeños insectos como biomarcadores de contaminación y toxicidad.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA-La Cruz) por su colaboración con los espacios físicos y materiales necesarios para gran parte los ensayos.

A Carlos Jara y Marilyn Paz del Laboratorio de Investigación - Estrés Oxidativo, de la Universidad de Valparaíso, por su ayuda (tanto a nivel de materiales como ayuda teórica) con la medición del daño oxidativo en *R. lophantae* posterior a la exposición a los plaguicidas.

A XILEMA s.a. por otorgar los insectos de forma gratuita en gran parte de los ensayos.

Se agradece también a la profesora Doris Oliva del Departamento de Biología y Ciencias Ambientales de la Universidad de Valparaíso, por su apoyo y enseñanza en todo lo referente a esta tesis.

Se agradece también a Sebastián San Martín y Mario Párraga, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, por su disponibilidad y ayuda con la criogenización de los insectos para su posterior análisis de daño oxidativo.

Y por último, se agradece al CIGREN por su ayuda económica en gran parte de los ensayos realizados.

## 7. LITERATURA CITADA

- ABDOLLAHI M, S MOSTAFALOU, S POURNOURMOHAMMADI, S SHADNIA (2004) Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 1(137): 29–34, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2003.11.002> .
- AGRAWAL A & B SHARMA (2010) Pesticide induced oxidative stress in mammalian system. A review. *International Journal and Medical. Research*, 1(3): 90-104.
- ANASAC. Agrícola Nacional S.A.C. e I., Sociedad Nacional de Agricultura, <http://www.anasac.cl/> .
- ARYSTA LIFESCIENCE (Junio 2005). HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD Metomil 90%. Recuperado el 10-02-2013: <http://www.afipa.cl/afipa/arysta/METOMIL.pdf>.
- ASLANTURK A, S KALENDER, M UZUNHISARCIKLI, Y KALENDER (2011) Effects of methidathion on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in midgut tissues of *Lymantria dispar* (Lepidoptera) larvae. *Journal of the Entomological Research Society* 13(3): 27-38.
- BARRET K (1998) Can we achieve harmonization of regulatory requirements in Europe?. En: Haskell P, & P McEwen, *Ecotoxicology: pesticides and beneficial organisms* (pp. 6: 46-52). London: Chapman & Hall.
- BAYER CROPSCIENCE (2008) «Basta de jugar a las escondidas». *La Revista de Bayer CropScience para la Agricultura Moderna*, 2: 22-25.
- BELLOWS TS & JG MORSE (1988) Residual toxicity following dilute or low-volume applications of insecticides used for control of California red scale (Homoptera: Diaspididae) to four beneficial species in a citrus agroecosystem. *Journal of Economic Entomology* 81(3): 892-898.
- BIDDINGER DJ, DC WEBER, LA HULL (2009) Coccinellidae as predators of mites: Stethorini in biological control. *Biological Control*, 51: 268–283.

- BOLLER EF, H VOGT, P TERNES & C MALAVOLTA (2005) Working Document on Selectivity of Pesticides (2205).
- BOYD M & D BOETHEL (1998) Residual toxicity of selected insecticides to heteropteran predaceous species (Heteroptera: Lygaeidae, Nabidae, Pentatomidae) on soybean. *Environmental Entomology*, 27(1): 154-160.
- BOYERO J, N RODRÍGUEZ, R SURIA, R RUÍZ & F PASCUAL (2005) Efectos de varios plaguicidas sobre *Cryptolaemus montrouzieri*. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 31: 79-87.
- BRUNNER FJ (1998) Codling Moth and Leafroller Control with New Insecticide chemistry. Washington State University, Tree Fruit Research and Extension Center.
- BUDIA F, A ADÁN, P MEDINA & E VIÑUELA (2000) Efectos secundarios de tres modernos plaguicidas por contacto residual en laboratorio sobre adultos de *Podisus maculiventris* (Say) (Hemiptera: Pentatomidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, Vol. 26(4): 527-536.
- CELADA B (1997) Parasitoides i depredadors en el conreu del presseguer a Tarragona. *Quaderns agraris* 21:21-38.
- CLOYD RA & A DICKINSON (2006) Effect of insecticides on mealybug destroyer (Coleoptera : Coccinellidae) and parasitoid *leptomastixdactylopii* (Hymenoptera : Encyrtidae), natural enemies of citrus mealybug (Homoptera : Pseudococcidae). *Journal of Economic Entomology* 99: 1596-1604.
- CROFT B (1990) *Arthropod biological control agents and pesticides*. John Wiley & Sons, New York. pp 723.
- DEL POZO EM (1988) Efecto de siete plaguicidas sobre fases preimaginales de *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae) en laboratorio. *Revista de Protección Vegetal*. v. 3(2): 162-169.
- DESNEUX N, A DECOURTYE & JM DELPUECH (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*. 52: 81-106.

- DEVINE GJ, D EZA, E OGUSUKU & MJ FURLONG (2008) Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 25(1): 74-100. ISSN 1726-4634.
- ELBERT A, B BECKER, J HARTWIG & C ERDELEN (1991). Imidacloprid - a new systemic insecticide. *Pfla. Nachr. Bayer* 44: 113-136.
- ELIZONDO A & C MURGUIDO (2010). Spirotetramat, nuevo insecticida para el control de insectos chupadores en el cultivo de la papa. *Fitosanidad* 14(4): 229-234.
- EPA. Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos <http://www.epa.gov/> .
- EVANS EW (2009) Lady beetles as predators of insects other than Hemiptera. *Biological Control* 51: 255-267.
- FLEMING R (2000) Lady beetles. *Entomological Notes No.6 Fleming RC. Lady beetles. Entomological Notes No.6. Published as a service of Michigan Entomological Society.*
- FUENTES-CONTRERAS E, E BASOALTO, C SANDOVAL, *et al.* (2007) Evaluación de la eficacia, efecto residual y de volteo de aplicaciones en pretrasplante de insecticidas nicotinoides y mezclas de nicotinoide-piretroide para el control de *Myzus persicae nicotianae* (Hemiptera: Aphididae) en Tabaco. *Agricultura Técnica (Chile)* 67(1): 16-22.
- GERDING PARIS M ([sin año]). CONTROL BIOLÓGICO, una herramienta en la agricultura nacional. INIA Quilamapu, Chillán. Disponible en internet <http://www.faceaucentral.cl/pdf/ecoengen-02/eco-p04-05.pdf>. Fecha visita 04 de Junio del 2012.
- GÓMEZ VIVES S (2002) Cría masiva de *Rhyzobius lophanthae* Blaisdell (Coleoptera: Coccinellidae) depredador de la cochinilla roja de las palmeras (*Phoenicococcus marlatti* Cockerell). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 28:167-176.
- GONZÁLEZ ([sin año]) *Control biológico*. Recuperado el 05 de Junio de 2012, de Coccinellidae de Chile: <http://www.coccinellidae.cl/paginasWebChile/PaginasOriginal/controlbiologico.php>

- GONZÁLEZ G (2008) Lista y distribución geográfica de Coccinellidae (Insecta: Coleoptera) presentes en Chile. Boletín del Museo Nacional de Historia Natural 57:77-107.
- GONZÁLEZ (2013) Lista actualizada de Coccinellidae de Chile [online]. Disponible en World Wide Web: <http://www.coccinellidae.cl>.
- GONZÁLEZ G & N VANDENBERG (2006) Review of lady beetles in the *Cycloneda germainii* species complex (Coleoptera; Coccinellidae: Coccinellinae: Coccinellini) with descriptions of new and unusual species from Chile and surrounding countries. *Zootaxa*, 1311:13-50.
- GORDON R (1994) South American Coccinellidae (Coleoptera). Part IV: definition of Exoplectrinae Crotch, Azynae Mulsant, and Coccidulinae Crotch; a taxonomic revision of Coccidulini. *Revista Brasileira de Entomología*, 38:681-775.
- GRAVENA S, PEB PATVA & PT YAMAMOTO (1993) Impact of methidation on citrus entomofauna: I -perspective of ecological selectivity. *IOBC I WPRS, Bulletin* 16(7): 16-25
- HAGEN K, N MILLS, G GORDH & J MCMURTRY (1999) Terrestrial arthropod predators of insect and mite pests. *En* Bellows, T.S. y Fisher, T.W. (eds.) *Handbook of Biological Control*. Academic Press. San Diego, USA, p. 383-503.
- HASSAN S (1989) Testing methodology and concept of the International Organization of Biological Control/Working Group. *En* "Pesticides and Beneficial Organisms"/West Palearctic Regional Section. Jepson, P.C (ed.), p.1-18.
- HASSAN S (1998) Standard characteristics of test methods. *En* P. Haskell, & P. McEwen, *Ecotoxicology: pesticides and beneficial organisms*. (págs. 7:55-68). London: Chapman & Hall.
- HASSANI AK, M SACHER, V GARRY, M LAMBIN, M GAUTHIER & C ARMENGAUD (2008) Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 54(4):653–661.

- HAZARIKA A, SN SARKAR, S HAJARE, M KATARIA, & JK MALIK (2003).  
Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicology*, 185:1-8.
- HENRY M, M BEGUIN, F REQUIER, *et al* (2012) A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science* 336, 348–350.<http://dx.doi.org/10.1126/science.1215039>
- HODEK I & A HONEK (2009) Scale insects, mealybugs, whiteflies and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha) as prey of ladybirds. *Biological Control* 51: 232–243.
- HONDA J & R LUCK (1995) Scale Morphology effects on feeding behavior and biological control potential of *Rhyzobius lophanthae* (Coleoptera: Coccinellidae). *Annals of the entomological society of America*. 4(88): 441-450.
- IANNACONE J & L ALVARIÑO (2008) Efecto ecotoxicológico del metomilo en *Corydoras lacepede*, 1803 (SILURIFORMES: ALLICHTHYIDAE) y su caracterización leucocitaria. *Ecología Aplicada*, 7(1,2), ISSN 1726-2216.
- INFORMATION VENTURES, INC “Chlorpyrifos Pesticide Fact Sheet,” Prepared for the U.S. Department of Agriculture, Forest Service.
- KHAN I, S DIN, S KHALIL & M RAFI (2006) Survey of predatory Coccinellids (Coleoptera: Coccinellidae) in the Chitral District, Pakistan. 6pp. *Journal of Insect Science* 7:07.
- LUNA F, C SERRANO, C GIMENO & V AZNAR (1999) Compatibilidad del pyrinex con *Cryptolaemus montrouzieri* en la lucha contra el cotonet de los cítricos, *Planococcus citri*. *Levante Agrícola* I 2Do Trimestre 198-199.
- MADIGAN M & MARTINKO J (2005) *Brock biology of microorganisms*. 11th edn. Prentice Hall, USA. pp. 545-572.
- MARIN R (1983). *Biología y Capacidad de Predación de Lindorus lophanthae* (Blais) (Col.: Coccinellidae) predator de *Pinnaspis aspidistrae* (Sing.) (Hom.Diaspididae). *Revista Peruana de Entomología*. 26 (1): 63-66.
- MARNETT LJ (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 424(1–2):83–95.

- MATTA A (1967) Biología y control de la conchuela blanca del olivo en el valle de Azapa. Arica, Chile: Idesia 5: 231-242.
- MEDINA P, A ADÁN, P DEL ESTAL, F BUDIA & E VIÑUELA (2008) Integración del control biológico con otros métodos de control. En: Control biológico de plagas agrícolas. Jacas J. & Urbaneja A. (eds). 469-476. Phytoma España S.L. Valencia.
- MEDINA P, F BUDIA, G SMAGGHE, E VIÑUELA (2001) Activity of Spinosad, Tebufenozide and Azadirachtin on eggs and pupae of the predator *Chrysoperla carnea* (Stephens) under laboratory conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 11: 597-610.
- MEDINA P, F BUDIA, H VOGT, P DEL ESTAL & E VIÑUELA (2002) Influencia de la ingestión de presa contaminada con tres modernos insecticidas en *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas*, Vol. 28: 375-384.
- MOHAMMAD A, G WILDE & R HIGGINS (2001) No effect of *Bacillus thuringiensis* Corn and *Bacillus thuringiensis* on the Predator *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Environmental Entomology* 30 (3): 625-629, <http://dx.doi.org/10.1603/0046-225X-30.3.625> .
- NAUEN R, U RECKMANN, J THOMZIK, W THIELERT (2008) Biological Profile of Spirotetramat (Movento), a New Two-Way Systemic (Ambimobile) Insecticide Against Sucking Pest Species. *Bayer CropScience Journal* 61 (2): 245-278.
- NEDVĚD O & KOVÁR I (2012) Phylogeny and classification. Pp. 1-12. En: Hodek I., van Emden H. F., Honěk A. (eds): *Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae)*, Blackwell Publishing Ltd., Chichester, UK, 561 pp. ISBN 978-1-4051-8422-9..
- NICHOLLS ESTRADA. CI (2008) Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. *Ciencia y tecnología*, pp. 7 - 10.
- NÚÑEZ E, E TIZADO & J NIETO (1992) Coccinélidos (Col.: Coccinellidae) depredadores de pulgones (Horn.Aphididae) sobre plantas cultivadas de León. *Boletín Sanitario Vegetal.Plagas* 18: 765-775.

- OBRYCKI J, JD HARWOOD, TJ KRING & RJ O'NEIL (2009) Aphidophagy by Coccinellidae: application of biological control in agroecosystems. *Biological Control* 51:244-254.
- OSORIO M (2000) Degradación de residuos de los insecticidas Abamectina, Imidacloprid, Metoxyfenozide y Tebufenozide en Tomate (*Lycopersicon lycopersicum*). Memoria de Título Ing. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias de residuos de los insecticidas Abamectina, Memoria de Título Ing. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronomicas. 75p
- PARTLAND M, R CLARKE & D WATSON (2000) Hemp Diseases and Pests: Management and Biological Control. CABI.
- PILCHER C, J OBRYCKI, M RICE & L LEWIS (1997) Preimaginal development, survival, and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* Corn. *Environmental Entomology* 26 (2): 446-454.
- PLANES L, J CATALÁN, A TENA, JL PORCUNA, JA JACAS, J IZQUIERDO & A URBANEJA (2013) Lethal and sublethal effects of spirotetramat on the mealybug destroyer, *Cryptolaemus montrouzieri*. *Journal of Pest Science* 86 (2): 321-327, <http://dx.doi.org/10.1007/s10340-012-0440-3> .
- PRADO E (1991). Artrópodos y sus enemigos naturales asociados a plantas cultivadas en Chile. Santiago, Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Estación Experimental La Platina. p 207: Boletín Técnico N°169.
- PRISCHMANN D, D JAMES, L WRIGHT, R TENEYCK & W SNYDER (2005) Effects of chlorpyrifos and sulfur on spider mites (Acari: Tetranychidae) and their natural enemies. *Biological Control* 33 (3): 324-334, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.03.008> .
- RAHMANI S, A BANDANI & Q SABAHI (2013) Effects of thiamethoxam in sublethal concentrations, on life expectancy ( $e_x$ ) and some other biological characteristics of *Hippodamia variegata* (goeze) (Coleoptera: Coccinellidae). *International Research Journal of Applied and Basic Sciences* 4(3):556-560.
- RIPA R & P LARRAL (2008) Manejo de Plagas en Paltos y Cítricos. Colección Instituto de Investigaciones Agropecuarias N°23. Centro Regional de Investigación la

Cruz. Quillota, Chile. Disponible en:

[http://www.cdfa.ca.gov/phpps/ipc/biocontrol/pdf/insects/phm\\_parasite-production.pdf](http://www.cdfa.ca.gov/phpps/ipc/biocontrol/pdf/insects/phm_parasite-production.pdf).

- RIPOLLÉS JL (1986) La lucha biológica: utilización de entomófagos en la Citricultura española. Integrated Pest Management in Citrus. Parasitis 86. Genève, CH.
- RIPOLLÉS JL & M PALAU (1993) Problemas fitosanitarios de los cítricos y subtropicales. Comunicaciones XVIII Reunión del Grupo de Trabajo. Villarreal (Castellón).
- ROH JY, JOY CHOI, MS LI, BR JIN & YH JE (2007) «Bacillus thuringiensis as a specific, safe, and effective tool for insect pest control». Journal of microbiology and biotechnology. 4 17: pp. 547–559
- ROJAS S (2005) Control Biológico de Plagas en Chile. Historia y Avances. Colección Libros INIA No. 12.
- RUIZ M, C MADUEÑO & A MONTIEL (2004) Efectividad de tratamientos cebo terrestres con Spinosad e Imidacloprid contra la Mosca del Olivo (*Bactrocera oleae*, Gmel., Diptera: Tephritidae). Resultados preliminares. Boletín Sanitario Vegetal Plagas 30: 415-425.
- SCOTT-DUPREE CD, L CONROY & CR HARRIS (2009) Impact of Currently Used or Potentially Useful Insecticides for Canola Agroecosystems on *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae), *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae), and *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Megachilidae). Journal of Economic Entomology 102(1): 177-182.  
<http://dx.doi.org/10.1603/029.102.0125>
- SHAFIQ-UR-REHMAN, S REHMAN & MIS WALIULLAH (2012) Chlorpyrifos-induced neuro-oxidative damage in bee. Toxicology and Environmental Health Sciences 4(1): 30 – 36.
- SMIRNOFF, W., (1950) Sur la biologie au Maroc de *Rhizobius* (Lindorus) *lophantae* Blaisd. (Col. Coccinellidae). Revue de pathologie végétale et d'entomologie agricole de France 29(4): 190-194. En: Gómez Vives, S. Cría masiva de *Rhizobius lophantae* Blaisdell (Coleoptera: Coccinellidae) depredador de la cochinilla roja de las palmeras (*Phoenicococcus marlatti* Cockerell).

- SPARLING DW & G FELLERS (2007) Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylei*. Environmental Pollution 147:535–539.
- STARK J, T WONG, R VARGAS & R THALMAN (1992) Survival, and reproduction of tephritid fruit fly para-sitoids (Hymenoptera: Braconidae) reared from fruit exposed to azadirachtin. Journal of Economic Entomology, 85 (4): 1125-1129.
- STATEWIDE INTEGRATED PEST MANAGEMENT PROJECT. IPM for Citrus. Third Edition. (s.f.). University of California. Agriculture and Natural Resources. Publication 1303. Recuperado el 07 de 06 de 2012, de [http://books.google.cl/books?id=sxnpXB9owPYC&printsec=frontcover&dq=citrus+3rd+edition&hl=es&sa=X&ei=98vQT\\_v7lof28wTXq5C\\_AQ&ved=0CDgQ6AEwAA#v=onepage&q=lophanthae&f=false](http://books.google.cl/books?id=sxnpXB9owPYC&printsec=frontcover&dq=citrus+3rd+edition&hl=es&sa=X&ei=98vQT_v7lof28wTXq5C_AQ&ved=0CDgQ6AEwAA#v=onepage&q=lophanthae&f=false).
- STATHAS G (2000). The effect of temperature on the development of the predator *Rhyzobius lophanthae* and its phenology in Greece. BioControl, 45: 439-451.
- THOMPSON W (1951) The specificity of host relations in predacious insects. The Canadian Entomologist, 83: 262-269.
- THRASHER JD, HEUSER G & BROUGHTON A (2002) Immunological abnormalities in humans chronically exposed to chlorpyrifos. Arch Environ Health 57(3):181-7.
- TORRES J, C ARAUJO & J DE OLIVEIRA (2003) Toxicity of pymetrozine and thiamethoxam to *Aphelinus gossypii* and *Delphastus pusillus*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 38 (4), <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2003000400003> .
- UK GUARDIAN (2008) Pesticides: Germany bans chemicals linked to honeybee devastation. Recuperado el 10 de Febrero del 2013 : <http://www.guardian.co.uk/environment/2008/may/23/wildlife.endangeredspecies>
- VAN DRIESCHE RG, S LYON & C NUNN (2006) Compatibility of spinosad with predaceous mite (Acari: Phytoseiidae) used to control western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) in green house crops. Florida entomologist, 89 (3): 396-401.

- VAN DRIESSCHE N, H ALEXANDER, J MIN, A KUSPA, S ALEXANDER, G SHAULSKY (2007). Global transcriptional responses to cisplatin in *Dictyostelium discoideum* identify potential drug targets. *Proceeding of the National Academy of Sciences U.S.A.* 104:15406-15411.
- VARGAS R & A ALVEAR (2000) Determinación de la susceptibilidad en tres poblaciones de *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae) a Metomilo y Buprofezin. *Agricultura Técnica*, 60(4): 341-349.
- VARGAS R & S RODRÍGUEZ (2008) Control biológico de escamas. *INIA Tierra Adentro* 81:42-44.
- VIDELA V (2007). Estudio del comportamiento de escamas blancas en paltos y de *Rhizobius lophanthae* como control. Tesis de Licenciatura. Valparaíso: Escuela de Agronomía, PUCV.
- VIÑUELA (2005) La lucha biológica, pieza clave de la agricultura sostenible. En: El control biológico de plagas, enfermedades y malas hierbas y la sostenibilidad de la agricultura: 15-30. Jacas J., Caballero P. y Avilla J. (eds). UJI/Univ. Pública Navarra. Castellón de la Plana. España.
- VIÑUELA E, A ADÁN, M GONZÁLEZ, E BUDIA, G SMAGHE & P DEL ESTAL (1998) Spinosad y azadiractina: efectos de dos plaguicidas de origen natural en el chinche depredador *Podisus maculiventris* (Say) (Hemiptera: Pentatomidae). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*. 24: 57-66
- WARE G & D WHITACRE (2004) *An Introduction to Insecticides*. 4th edition. Extraído de: *The Pesticide Book*, 6th ed. MeisterPro Information Resources A division of Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio.
- WEBER DC & JG LUNDGREN (2009) Assessing the trophic ecology of the Coccinellidae: their roles as predators and as prey. *Biological Control* 51: 199-214.
- WIJNANDS & KROONEN-BACKBIER (1993) Management of farming systems to reduce pesticide inputs: the integrated approach. En: *Modern crop protection:*

developments and perspectives: 227-234. Zadoks (ed). Wageningen Press. Wageningen (Holanda).

WHITEHORN P, S O'CONNOR, FL WACKERS, D GOULSON & G ZOEBELEIN  
(2012) Long-term field studies about pesticide effects on ladybird beetles  
(Coleoptera: Coccinellidae). *Entomol.Gen.*, 13: 175-187,  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1215025>.

WHYATT RM, RAUH V, BARR DB, CAMANN DE, ANDREWS HF, GARFINKEL R,  
HOEPNER LA, DIAZ D, DIETRICH J, REYES A, TANG D, KINNEY PL,  
PERERA FP (2004) Prenatal insecticide exposures and birth weight and  
length among an urban minority cohort. *Environmental Health Perspectives*,  
112(10):1125-1132, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.6641>.