

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**

**Máster Universitario Oficial en Técnicas Avanzadas para la  
Investigación y la Producción en Fruticultura**



**Multiparasitismo heteroespecífico de *Aphytis melinus* DeBach y *Aphytis chrysomphali* (Mercet) (Hymenoptera: Aphelinidae) sobre su hospedador *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae)**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

AUTOR:

Pablo Felipe Bru Martínez

DIRECTOR/ES:

Dr. D. Pedro Luis Guirao Moya

Dr. D. Alejandro Tena Barreda

Dña. Ruth Cebolla Sos

**Septiembre 2014**



## UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Se autoriza al alumno **D. Pablo Felipe Bru Martínez** a realizar el Trabajo Fin de Máster titulado: “Multiparasitismo heteroespecífico de *Aphytis melinus* DeBach y *Aphytis chrysomphali* (Mercet) (Hymenoptera: Aphelinidae) sobre su hospedador *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae)”, bajo la dirección de D. Pedro Luis Guirao Moya, D. Alejandro Tena Barreda y Dña. Ruth Cebolla Sos, debiendo cumplir las directrices marcadas para la redacción del mismo, que están a su disposición en la Normativa para la realización de Trabajos Fin de Máster que se halla en la página Web.

Orihuela, a 2 de septiembre de 2014

El Director del Máster Oficial en  
Técnicas Avanzadas para la Investigación y la Producción en Fruticultura

Fdo.: Juan José Martínez Nicolás

TRIBUNAL	
<b>FECHA:</b>	
<b>PRESIDENTE:</b>	<b>FIRMA:</b>
<b>SECRETARIO:</b>	<b>FIRMA</b>
<b>VOCAL:</b>	<b>FIRMA</b>

**Anexo I**  
**MÁSTER OFICIAL EN TÉCNICAS AVANZADAS PARA LA INVESTIGACIÓN Y**  
**LA PRODUCCIÓN EN FRUTICULTURA**

**INFORME Y VISTO BUENO DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER**

CURSO 2013/2014

Director/es del trabajo	Área/s de Conocimiento
Pedro Luis Guirao Moya Alejandro Tena Barreda Ruth Cebolla Sos	ENTOMOLOGÍA APLICADA PROTECCIÓN INTEGRADA DE CULTIVOS

Declara/n que el Trabajo Fin de Máster,

Título del Trabajo
<b>Multiparasitismo heteroespecífico de <i>Aphytis melinus</i> DeBach y <i>Aphytis chrysomphali</i> (Mercet) (Hymenoptera: Aphelinidae) sobre su hospedador <i>Aonidiella aurantii</i> (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae)</b>
Alumno/a
Pablo Felipe Bru Martínez

cumple los requisitos necesarios para poder ser defendido ante el tribunal correspondiente y emite/n el siguiente:

Informe
El TFM ha sido realizado en el IVIA. El contenido acorde a la temática y competencias del máster. La amplitud es adecuada al número de créditos ETCS que tiene asignado en el plan de estudios. Cumple con los objetivos previamente fijados. El diseño experimental, la elaboración e interpretación de los resultados y su discusión son correctos. Las conclusiones obtenidas son coherentes con los objetivos y se derivan de los resultados, y la memoria está bien redactada.

**Valoración del trabajo del estudiante (de 0 a 10):**

10

Orihuela, a 2 de Septiembre de 2014





Firma/s director/es trabajo

SR. D. JUAN JOSÉ MARTÍNEZ NICOLÁS, DIRECTOR DEL MÁSTER OFICIAL EN TÉCNICAS AVANZADAS PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PRODUCCIÓN

**Anexo V**  
**MÁSTER OFICIAL EN TÉCNICAS AVANZADAS PARA LA INVESTIGACIÓN Y**  
**LA**  
**PRODUCCIÓN EN FRUTICULTURA**

**REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Identificaciones:**

**Autor:** Pablo Felipe Bru Martínez

**Título:** Multiparasitismo heteroespecífico de *Aphytis melinus* DeBach y *Aphytis chrysomphali* (Mercet) (Hymenoptera: Aphelinidae) sobre su hospedador *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae)

**Title:** Heterospecific multiparasitism of *Aphytis melinus* DeBach and *Aphytis chrysomphali* (Mercet) (Hymenoptera: Aphelinidae) on its host *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae)

**Director/es del TFM:** Dr. D. Pedro Luis Guirao Moya, Dr. D. Alejandro Tena Barreda y Dña. Ruth Cebolla Sos

**Año:** 2014

**Titulación:** Máster Oficial

**Tipo de Trabajo:** Investigación

**Palabras claves:** multiparasitismo, discriminación del hospedador, *A. melinus*, *A. chrysomphali*, ovidio heteroespecífico, competencia intrínseca interespecífica, piojo rojo de California

**Keywords:** multiparasitism, Host-discrimination, *A. melinus*, *A. chrysomphali*, heterospecific ovicide, Intrinsic competition, California red scale

**Nº citas bibliográficas:** 167

**Nº de planos:** 0

**Nº de tablas:** 0

**Nº de figuras:** 22

**Nº de anexos:** 0

## RESUMEN

*Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae) es una de las plagas más importante de los cítricos de la cuenca Mediterránea donde afecta a todas las variedades cultivadas. Actualmente su gestión está basada en el control químico aunque existen varios métodos alternativos. En muchas regiones cítricas del mundo, las poblaciones de *A. aurantii* se encuentran bajo control biológico por el parasitoide *Aphytis melinus* DeBach (Hymenoptera: Aphelinidae), sin embargo en España las especies del género *Aphytis* todavía no ejercen un control satisfactorio sobre *A. aurantii*. En los cultivos cítricos españoles coexisten el parasitoide autóctono *Aphytis chrysomphali* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) y el mencionado *A. melinus* que fue introducido en los años 80. Desde su introducción, *A. melinus* ha desplazado a *A. chrysomphali* de algunas zonas mientras que coexisten en otras. La coexistencia de ambas especies y la utilización del mismo hospedador provocan la aparición de mecanismos de competencia interespecífica, especialmente en otoño cuando las poblaciones del diaspídido son bajas y las de los parasitoides altas. En este trabajo se ha estudiado la competencia intrínseca entre los estados inmaduros de *A. melinus* y *A. chrysomphali* para determinar los aspectos biológicos que expliquen la coexistencia o desplazamiento de uno de ellos. Para ello, primero se describió y comparó el comportamiento de las hembras de ambas especies cuando encontraron escudos de *A. aurantii* no parasitados y parasitados por la especie competidora. Los resultados mostraron que ambos parasitoides fueron capaces de discriminar entre hospedadores sanos y parasitados. Sin embargo, el comportamiento de ambas especies difirió cuando encontraron hospedadores parasitados por la otra especie. Mientras *A. chrysomphali* disminuyó la aceptación del escudo y el tamaño de la puesta (comparado con los hospedadores sanos), *A. melinus* no alteró ninguno de estos dos comportamientos pero practicó ovicidio. Las hembras de *A. melinus* buscaron, encontraron y picaron los huevos de *A. chrysomphali* con el ovipositor antes de poner sus propios huevos. Como consecuencia de esto e independientemente del orden en el que las dos especies fueron introducidas, *A. melinus* fue la que emergió en mayor porcentaje de los escudos multiparasitados y, por tanto, el competidor superior. Estos resultados muestran algunas de las posibles causas biológicas que subyacen en el desplazamiento de *A. chrysomphali* por *A. melinus* en nuestros cítricos. Finalmente, en la discusión se explican brevemente algunas de las implicaciones que nuestros resultados pueden tener el control biológico de *A. aurantii* dentro de un programa de gestión integrada de plagas.

## ABSTRACT

*Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae) is one of the most important and widespread citrus pests in the Mediterranean basin, where affects all cultivated citrus plants. Nowadays, the management of this citrus key pest is chemically based despite there are other available techniques. In many citrus regions around the world, the populations of *A. aurantii* are under biological control because of the effectiveness of the parasitoid *Aphytis melinus* DeBach (Hymenoptera: Aphelinidae). In Spain, however, *A. aurantii* has not been successfully controlled by *Aphytis* species yet. In Spanish citrus groves, the native parasitoid *Aphytis chrysomphali* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae) seem to coexist with *A. melinus* which was introduced early in the 80's. Since then, *A. melinus* has displaced *A. chrysomphali* from some areas whereas they may coexist in others. Both coexistence and sharing same host resources could easily lead to the appearance of heterospecific competition, especially in autumn when the scale populations are scarce but those of parasitoids high. In this work, intrinsic competition between *A. melinus* and *A. chrysomphali* immature stages has been studied in order to determine which are the biological issues involved in the coexistence or displacement of one of them. First of all, we described and compared the female behaviour of both species when they found parasitized and non parasitized scales. Our results showed that both parasitoids were able to discriminate between healthy and parasitized hosts. Nonetheless, both species behaved differently when they found scales parasitized by the competitor species. Whereas *A. chrysomphali* reduced host acceptance and clutch size (compared with healthy hosts), *A. melinus* did not alter any of its behaviours but the female committed heterospecific ovicide instead. *A. melinus* foraged, found and probed the eggs laid by *A. chrysomphali* and replaced them with some of her own. As a consequence of that, *A. melinus* has been considered the superior competitor because it was found more frequently in multiparasitized hosts than *A. chrysomphali* in all cases. These results may possibly explain some of the biological reasons for *A. chrysomphali* displacement in our citrus crops. Finally, some of the implications of our results regarding to *A. aurantii* biological control and integrated pest management are also briefly exposed.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Alberto Urbaneja las facilidades que me ha ofrecido para la realización de este Trabajo Fin de Máster en las instalaciones del Departamento de Entomología del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) en Moncada (Valencia) dentro de la línea de investigación relacionada con la mejora del control biológico del piojo rojo de California *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae). También me gustaría darle las gracias por el permiso para la utilización de los insectos empleados en este ensayo que proceden de las crías de *A. aurantii* y sus parasitoides del IVIA. Personalmente, me ha apoyado en la realización de este Máster para poder compatibilizarlo con mi trabajo en el Centro. Me gustaría reconocer el gran trabajo de mis directores experimentales Alejandro Tena y Ruth Cebolla por diseñar del experimento, supervisar, corregir y revisar el documento escrito. A mi director académico Pedro Guirao Moya por su comprensión, diligencia y disposición en los asuntos de la Universidad.



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>1.1 <i>Aonidiella aurantii</i> como plaga clave de los cítricos</b> .....	10
1.1.1 Clasificación taxonómica .....	10
1.1.2 Origen y distribución geográfica .....	10
1.1.3 Importancia agronómica .....	11
1.1.4 Descripción morfológica y desarrollo.....	12
1.1.5 Biología y ecología .....	16
1.1.6 Daños.....	18
<b>1.2 Métodos de control de <i>A. aurantii</i></b> .....	19
1.2.1 Control químico .....	19
1.2.2 Control biológico por depredadores .....	20
1.2.3 Control biológico por parasitoides himenópteros .....	21
1.2.3.1. Endoparasitoides: géneros <i>Comperiella</i> y <i>Encarsia</i> .....	22
1.2.3.2. Ectoparasitoides: género <i>Aphytis</i> .....	22
<b>1.3 Interacciones competitivas entre parasitoides</b> .....	28
1.3.1 Competencia interespecífica entre parasitoides del género <i>Aphytis</i> ....	29
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	31
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	33
<b>3.1 Sistemas de cría de laboratorio</b> .....	34
3.1.1 Cría del piojo rojo de California.....	34
3.1.2 Cría de los parasitoides.....	35
<b>3.2 Arena</b> .....	36
<b>3.3 Observaciones del comportamiento de los insectos en el laboratorio</b> .....	37
<b>3.4 Descendencia</b> .....	40
<b>3.5 Análisis de datos</b> .....	40
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	41
<b>4.1 Aceptación del escudo</b> .....	42
<b>4.2 Tamaño de la puesta</b> .....	43
<b>4.3 Ovicidio/Larvicidio</b> .....	45
4.3.1 Duración de las picaduras .....	45
4.3.2 Lugar de las picaduras .....	47
4.3.3 Supervivencia de los huevos picados por la hembra competidora (posible ovicidio).....	47
4.3.4 Influencia del multiparasitismo en la descendencia .....	49
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	51
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	53

# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1. *Aonidiella aurantii* como plaga clave de los cítricos

### 1.1.1. Clasificación taxonómica

La especie *Aonidiella aurantii* (Maskell, 1879) pertenece al orden Hemiptera, superfamilia Coccoidea y a la familia Diaspididae, cuyos miembros son conocidos como cóccidos diaspididos. Su clasificación taxonómica según Ben-Dov (2003) es la siguiente:

**Clase** Insecta

**Orden** Hemiptera

**Suborden** Sternorrhyncha

**Superfamilia** Coccoidea

**Familia** Diaspididae

**Subfamilia** Diaspidinae

**Tribu** Aspidiotini

**Género** *Aonidiella*

**Especie** *aurantii*

*Aonidiella aurantii* es conocida con el nombre común de “piojo rojo de California” en castellano, “poll roig de California” en valenciano, “cochenille jaune” en francés, “escama roja” en países sudamericanos y “California red scale” en países anglófonos. El apelativo rojo se debe a que por transparencia se observa el color rojizo anaranjado del cuerpo del insecto (Gómez-Menor, 1937; De Andrés-Cantero, 1975; Llorens-Climent, 1990).

### 1.1.2. Origen y distribución geográfica

El género *Aonidiella* podría tener su centro de origen en algún lugar comprendido entre el sureste de Asia continental y el sur del Trópico de Cáncer, en un área entre la India y el sureste de China (Bodenheimer, 1951; DeBach, 1969). Aunque *Aonidiella aurantii* fue originariamente descrita como *Aspidiotus aurantii* por W. W. Maskell en 1878 en Nueva Zelanda, fue introducida accidentalmente en esta región y probablemente también en Australia (Quayle, 1911).

Además su presencia en América, la cuenca Mediterránea y las islas de los mares del sur, sería el resultado de su posterior introducción accidental (McKenzie, 1938). Actualmente, este fitófago presenta una distribución cosmopolita y se encuentra en todas las regiones tropicales y subtropicales habiéndose distribuido geográficamente y siendo citado en todas las regiones cítrícolas del planeta (University of California (UC) 1991; Smith *et al.*, 1997; Bedford 1998; Urbaneja *et al.*, 2014).

El piojo rojo de California fue citado por primera vez en la Península Ibérica, en Valencia en el año 1910 por García Mercet. Su presencia en España tuvo probablemente su origen en la importación de algún cítrico infestado con el diaspídido. A pesar de su presencia en España, no fue hasta 1985 cuando se detectaron focos de gran virulencia que alcanzaron el carácter de plaga en Alzira (Valencia) en la comarca de la Ribera (Rodrigo y Garcia-Marí, 1990 y 1992; Alfaro *et al.*, 1993 y 1999). En 1986 se detectaron focos importantes de *A. aurantii* en Andalucía (Alfaro *et al.*, 1993; Moner, 1994). A partir de entonces, se fue extendiendo por Andalucía y toda la Comunidad Valenciana (Moner, 1994; Llorens-Climent, 1998; Alfaro *et al.*, 1999) donde los daños son mayores en las provincias de Alicante y Valencia que en la de Castellón (Sorribas *et al.*, 2010). Actualmente *A. aurantii* no solo es la plaga más importante de los cítricos de la cuenca Mediterránea donde se ha extendido hasta cubrir una amplia extensión de cítricos (Tena y Garcia-Marí, 2011), sino que también se encuentra en todas las regiones cítrícolas españolas en menor o mayor intensidad afectando a todas las variedades de cítricos cultivadas.

### **1.1.3. Importancia agronómica**

Desde el momento de su descripción, este fitófago polífago ha sido citado como una de las plagas más importantes en la mayor parte de los países del mundo donde se comercializan los cítricos (Quayle, 1932; Bodenheimer, 1951; Ebeling, 1959; Compere, 1961; Tashiro y Beavers, 1968; Praloran, 1971; Delucchi, 1975; Talhouk, 1975; Bedford, 1998). En muchas áreas cítrícolas del mundo el piojo rojo de California, está considerado como una plaga clave mal controlada debido a que sus oscilaciones poblacionales de forma natural superan todos los años el umbral económico de daño (Ripollés *et al.*, 1995; Vanaclocha *et al.*, 2009).

#### 1.1.4. Descripción morfológica y desarrollo

##### • Morfología

Los cóccidos diaspididos reciben este nombre debido a su aspecto externo, las hembras adultas están protegidas por un escudo formado por una o dos exuvias y un tejido de seda a su alrededor. Este escudo es una cubierta que representa el tipo más elaborado de estructura de protección encontrada entre las cochinillas y tiene la función de proteger al insecto frente a las agresiones físicas y químicas del medio ambiente (González-Regueral, 1932; Watson y Berger, 1932; Foldi, 1990a). El escudo constituye una barrera eficaz contra los productos tóxicos de contacto, de ahí la dificultad del control químico de esta especie (Dickson, 1951). En *A. aurantii*, el escudo del macho es más pequeño que el de la hembra y tiene una forma oval alargada, un poco convexa; sin embargo, la hembra es circular o casi circular (Leonardi, 1920).

##### • Desarrollo

Los estados de desarrollo en la familia Diaspididae difieren en los machos y en las hembras (figura 1.1). Los adultos presentan un marcado dimorfismo sexual, con el macho alado y móvil, mientras que la hembra es áptera y, tras fijarse al sustrato, sésil (Gullan y Kosztarab, 1997). La hembra inmadura de *A. aurantii* pasa por tres estadios ninfales mientras que el macho presenta dos estados inmaduros, uno de prepupa y otro de pupa antes de alcanzar el estado adulto (Foldi, 1990b; Koteja, 1990).

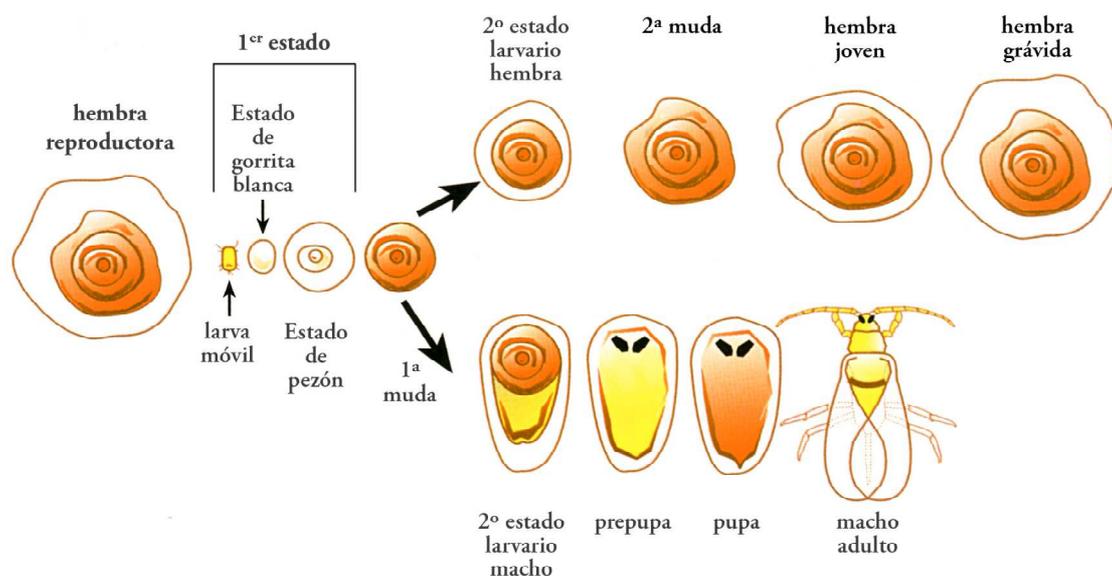


Figura 1.1 Ciclo completo de desarrollo de *A. aurantii* (Pina, 2007).

- **Primer estadio ninfal ( $N_1$ )**

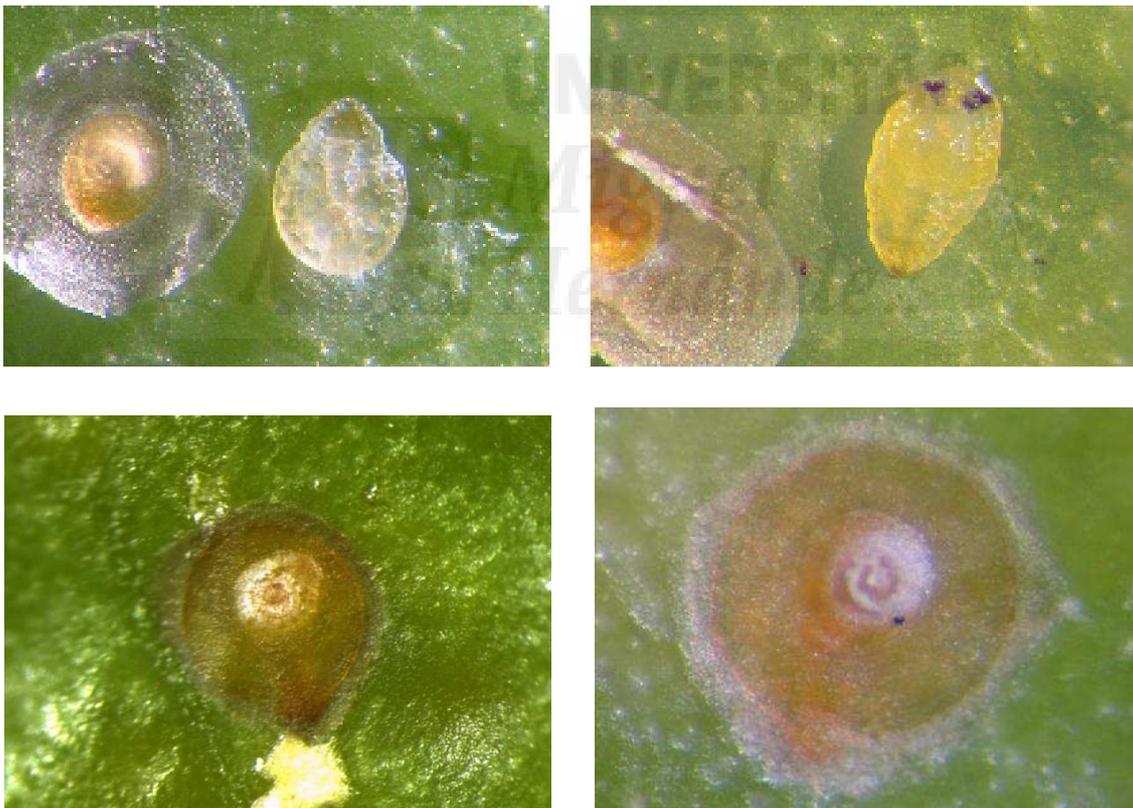
El ciclo biológico de *A. aurantii* se inicia con la ninfa móvil o “crawler”, que junto con el macho adulto son las dos únicas fases del desarrollo de los diaspídeos capaces de desplazarse. La ninfa móvil es de color amarillo claro, tiene ojos, antenas y patas, y tan pronto como abandona el escudo de la madre inicia la búsqueda de un lugar adecuado para fijarse entre el día de la emergencia y el día siguiente (Quayle, 1911; Willard, 1973) (figura 1.2). Una vez encontrado se fija y 24 horas después tiene el aspecto de una caperuza blanca algodonosa llamada “gorrita blanca” o “whitecap” (Dickson, 1951; Tashiro y Beavers, 1968) (figura 1.2). Después de 4 a 6 días, el aspecto algodonoso del escudo da paso a un escudo de color oscuro de forma circular y con una prominencia central que se denomina estado de pezón o “nipple” (figura 1.2). Una vez ha alcanzado un determinado tamaño, la larva cesa de alimentarse y sufre una serie de cambios morfogénéticos durante un período llamado primera muda en el que el cuerpo de la hembra permanece firmemente adherido al escudo (Dickson, 1951).



**Figura 1.2.** Arriba izquierda: ninfa móvil de *A. aurantii*. Arriba derecha: estado de gorrita blanca de *A. aurantii*. Abajo izquierda: estado de pezón de *A. aurantii*. Abajo derecha: primera muda de *A. aurantii* (Pina, 2007; Vanaclocha, 2012).

- Segundo estadio ninfal (N<sub>2</sub>)

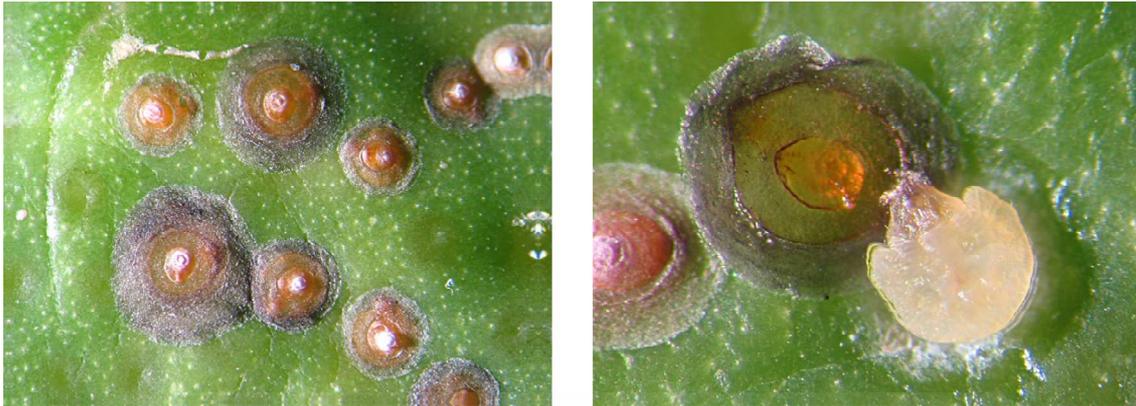
Tras la primera muda, la hembra incorpora la parte dorsal a la superficie interior del escudo en posición central y en este punto la cochinilla vuelve a alimentarse y continúa creciendo a medida que va añadiendo filamentos al extremo de la cubierta. Al final de este estadio ninfal es posible diferenciar los dos sexos (figura 1.3). El macho desarrolla ojos dorsales y ventrales y su escudo, que al principio es circular, se va alargando a medida que el cuerpo va creciendo en tamaño, alcanzando su forma definitiva y tamaño (Tashiro y Beavers, 1968; Koteja, 1990). En la hembra, el cuerpo del insecto crece hasta que prácticamente ocupa todo el espacio de la cubierta, se adhiere a ésta y muda por segunda vez (Dickson, 1951). Para la hembra ésta será la última muda, de modo que tras ella aparecerán los caracteres del adulto, mientras que el macho aún atravesará dos mudas más (Koteja, 1990).



**Figura 1.3.** Arriba izquierda: N<sub>2</sub> de la hembra de *A. aurantii*. Arriba derecha: N<sub>2</sub> del macho *A. aurantii*. Abajo izquierda: primera muda de *A. aurantii*. Abajo derecha: segunda muda de *A. aurantii* (Pina, 2007).

- **Tercer estadio ninfal (N<sub>3</sub>) o hembra joven**

Después de la segunda muda, la hembra joven sin fecundar de tercer estadio ninfal continúa alimentándose de los tejidos de la planta y secretando filamentos. El borde de la nueva cubierta cérica es muy delgado y fino y presenta un característico color grisáceo (figura 1.4). La hembra desde el momento en que se inicia la formación de este margen gris, se encuentra receptiva a los machos.



**Figura 1.4.** Izquierda: vista dorsal del escudo hembra joven de *A. aurantii*. Derecha: aspecto del cuerpo de la hembra joven *A. aurantii* (Pina, 2007).

- **Hembra adulta o grávida**

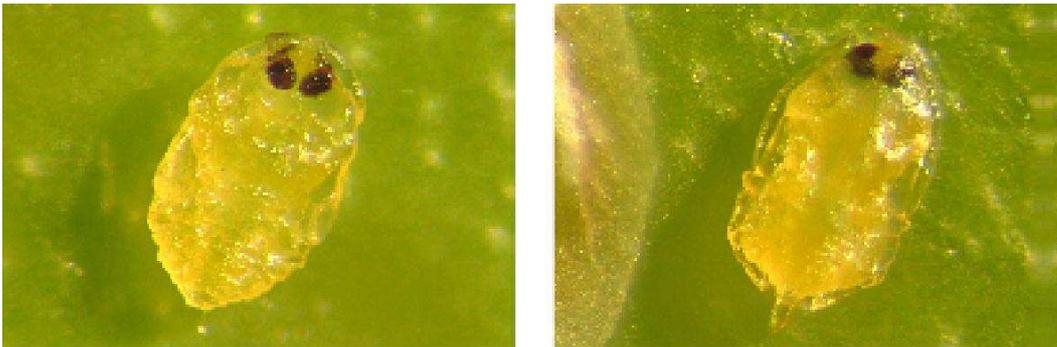
Después de la inseminación, el cuerpo de la hembra se vuelve a unir por tercera vez al escudo y el cuerpo pasa del color amarillento a un pardo rojizo e incluso a un rojo más o menos acentuado (figura 1.5). Esta hembra ya fecundada se denomina hembra grávida. Cuando comienza la producción de ninfas, las nuevas ninfas móviles pueden permanecer hasta un día o dos debajo de la cubierta de la hembra antes de iniciar la migración (Tashiro y Moffitt, 1968). Esta hembra con la presencia de ninfas bajo el escudo se denomina hembra reproductora o hembra con ninfas.



**Figura 1.5.** Vista dorsal de la hembra adulta grávida de *A. aurantii* en la que se puede observar por transparencia la forma arriñonada característica del cuerpo (Pina, 2007).

- **Desarrollo del macho**

Tras el estadio N<sub>2</sub> los machos pasan por los estados de prepupa y pupa (figura 1.6). Tras la cuarta muda, el macho adulto emerge con un cuerpo endeble, con las piezas bucales atrofiadas, pero con las patas, alas y antenas bien desarrolladas (figura 1.7) (Leonardi, 1920; Koteja, 1990).



**Figura 1.6.** Izquierda: estado de prepupa del macho de *A. aurantii*. Derecha: estado pupa del macho de *A. aurantii* (Pina, 2007).



**Figura 1.7.** Macho adulto alado de *A. aurantii* (Pina, 2007).

#### 1.1.5. Biología y ecología

La reproducción de *A. aurantii* es obligatoriamente sexual, siendo imprescindible la presencia del macho para la fecundación de la hembra (Nel, 1933). La fecundación tiene lugar en el estado de hembra joven y por ello, el crecimiento y desarrollo entre los dos sexos está correlacionado. Las hembras son ovovíparas. Los huevos, prácticamente desarrollados, eclosionan en su interior, emergiendo las ninfas móviles en el momento de la puesta (Tashiro y Moffitt, 1968).

Las distintas generaciones se distribuyen de manera diferente en el árbol. En la primera generación, las ninfas móviles de las ramas y hojas se instalan sobre los frutos recién cuajados. En la segunda generación, las ninfas ya convertidas en hembras adultas con ninfas producen nuevas ninfas móviles que se fijan directamente sobre el fruto, dando lugar a un importante aumento del número de escudos. Durante el otoño, si se produce una tercera generación, la infestación en fruto puede ser muy elevada (Alfaro *et al.*, 1999; Rodrigo *et al.*, 2004). Las poblaciones de *A. aurantii* pueden verse afectadas tanto por factores abióticos como por factores bióticos.

- **Factores abióticos**

La temperatura y la humedad se consideran los principales factores reguladores del número de generaciones de cochinilla que se dan por año, variando sustancialmente entre las diferentes regiones, pero oscilando por lo general entre dos y seis (Beardsley y González, 1975). El máximo se encuentra en Sudáfrica donde se pueden dar desde cuatro hasta siete generaciones (Bedford, 1998). En la Comunidad Valenciana se observan tres generaciones, con un máximo de inmaduros a finales de mayo, otro a finales de julio y un tercero, menor y parcial, en septiembre-octubre, en función de las condiciones climáticas (Ripollés, 1990; Rodrigo y Garcia-Marí, 1990 y 1992; Rodrigo, 1993; Rodrigo y Garcia-Marí, 1994).

La temperatura afecta a la fecundidad, duración del ciclo biológico y a la longevidad de *A. aurantii*. Willard (1972) observó que a 35 °C, *A. aurantii* presentaba las mayores tasas de fecundidad, situándose su rango óptimo de temperaturas entre 25-35 °C, mientras que los umbrales mínimos y máximos se encontrarían alrededor de los 10 y los 40 °C. La longevidad de la hembra se calcula que es de 4 a 5 meses, mientras que si no son fertilizadas pueden llegar a vivir incluso periodos superiores a 6 meses (Bodenheimer, 1951). La longevidad de los machos adultos, en condiciones de laboratorio, oscila entre las 14 y 28 horas a 25 °C, o hasta 42 horas a 10 °C, en condiciones de oscuridad (Tashiro y Beavers, 1968). Los estados de ninfa y de hembra grávida son los más tolerantes a las temperaturas extremas (McLaren, 1971; McLaren y Buchanan, 1973; Abdelrahman, 1974; Rodrigo y Garcia-Marí, 1992).

- **Factores bióticos**

Los factores bióticos que afectan principalmente a las cochinillas, a parte de los enemigos naturales, son el tejido vegetal sobre el cual se desarrollan y la especie y variedad de la planta hospedadora. Carroll y Luck (1984) indican que el sustrato más favorable es el fruto seguido de hojas o tallos verdes y el peor la madera. Además, los individuos desarrollados sobre fruto tienen una mayor supervivencia, un desarrollo más rápido y son más grandes que los criados sobre ramas verdes u hojas (Quayle, 1932; Bodenheimer, 1951; Willard, 1972; Atkinson, 1977; Carroll y Luck, 1984; Hare *et al.*, 1990; Hare y Luck, 1991). Dentro del grupo de los cítricos, el limón es la especie más susceptible de ser atacada, seguida del naranjo amargo, el pomelo, el grupo de las naranjas Valencia, las Navel y, por último, las mandarinas (Quayle, 1932; Cameron *et al.*, 1969; Habib *et al.*, 1972; Cameron *et al.*, 1975; Yu, 1986; VVAA, 1991).

#### 1.1.6. Daños

Los daños causados son de dos tipos: directos e indirectos. Los directos se deben a la succión de la savia del vegetal que en casos de fuerte infestación pueden producir secas de ramas. Esto es debido por un lado a la extracción de la savia de la planta (que implica la destrucción de células corticales) (Washington y Walker, 1990), al mismo tiempo que inyectan una saliva tóxica (Ebeling, 1959) que provoca una reducción en el crecimiento y en el vigor de la planta. Los daños indirectos son los más comunes e importantes y causan un perjuicio estético debido a la presencia de *A. aurantii* en el fruto y que implica destríos importantes por pérdida de calidad comercial. Incluso en un número reducido, entre tres y cinco individuos, provoca que la cosecha afectada se destine a destrío y se dificulte la exportación (figura 1.8).



**Figura 1.8.** Presencia de *A. aurantii* en hoja (a), fruto (b) y rama (c) (Pina, 2007).

## 1.2. Métodos de control de *A. aurantii*

Actualmente en España se utilizan varios métodos para controlar las poblaciones de *A. aurantii* que van desde los culturales como la poda, hasta los químicos, biológicos y biotecnológicos que incluyen la confusión sexual. Esta técnica puesta a punto recientemente en nuestro país (Vacas *et al.*, 2009; Vacas *et al.*, 2010; Vacas *et al.*, 2012) no deja residuos en fruto, no supone ningún riesgo para la salud humana y es compatible con otros métodos como el control biológico. Este último se basa en la utilización de depredadores, entomopatógenos y, especialmente, parasitoides, que son los enemigos naturales más efectivos para el control de *A. aurantii* (Rosen, 1994).

A diferencia de los métodos biotecnológicos, el control químico interfiere habitualmente de una forma negativa en la efectividad del control biológico. Por ello, aunque el control químico continúa siendo el método más utilizado para el control de *A. aurantii* en los cultivos cítricos españoles, la tendencia actual para su control se basa en la aplicación de un programa de gestión integrada de plagas (GIP). La GIP es una estrategia de control que consiste en la aplicación racional de una combinación de medidas biológicas, biotecnológicas, químicas, de cultivo o de selección de vegetales, de modo que la utilización de productos fitosanitarios se limite al mínimo necesario para mantener los niveles poblacionales de este fitófago plaga por debajo de su umbral económico de daño (Urbaneja *et al.*, 2014).

### 1.2.1. Control químico

Las formas sensibles del piojo rojo de California a los tratamientos químicos están constituidas por los individuos inmaduros de  $N_1$  y  $N_2$ . Tradicionalmente, las aplicaciones químicas se realizan contra las formas sensibles de la primera generación de *A. aurantii* (desde finales de mayo a principios de junio) y, si este tratamiento resulta no ser suficiente, también contra las de la segunda generación (en agosto) (Urbaneja *et al.*, 2014). En España los productos recomendados contra esta plaga son: aceite de parafina (asfixia del insecto), clorpirifos y metil clorpirifos (organofosforados neurotóxicos), piriproxifen (miméticos de la hormona juvenil) y spirotetramat (inhibidor de la síntesis de lípidos) (Urbaneja *et al.*, 2014).

El control químico es difícil y son frecuentes las infestaciones recurrentes en poco tiempo. La utilización masiva de estos plaguicidas provocan problemas asociados como la aparición de resistencias (Grafton-Cardwell y Vehrs, 1995) que ya se han observado los cítricos españoles (Martínez-Hervás *et al.*, 2005). También son importantes los efectos secundarios sobre la fauna útil, tan abundante y beneficiosa en nuestros cítricos (Jacas y Urbaneja, 2010), así como los posibles residuos en el fruto.

Los tratamientos contra la primera generación de *A. aurantii* pueden ser negativos sobre la fauna útil porque se aplican a finales de primavera e inicios de verano, cuando sus poblaciones son bajas y están aumentando de forma natural. Además, el control químico puede dificultar el establecimiento del parasitoides de *A. aurantii* por los tratamientos químicos de primavera (Tena *et al.*, 2011). Por otra parte, los tratamientos contra la segunda generación del pijo rojo están cada vez más restringidos en cítricos, sobre todo en variedades tempranas de clementinas, ya que pueden provocar la aparición de residuos en la cosecha o retrasar la maduración en el caso de los aceites minerales en verano (Martínez-Hervás *et al.*, 2005).

### **1.2.2 Control biológico por depredadores**

DeBach (1974) indicó que el control biológico mediante enemigos naturales es el método más económico y permanente para regular las poblaciones de diáspinos en cítricos. Según Samways (1985), cuando las poblaciones del piojo rojo de California escapan al control del parasitoide, los únicos factores bióticos capaces de mantener el desarrollo de *A. aurantii* son los depredadores. Estos enemigos naturales son efectivos para regular altas densidades de *A. aurantii* y aunque son poco específicos, han sido utilizados mediante sueltas inoculativas e inundativas (Siscaro *et al.*, 1999).

#### **• Depredadores coccinélidos**

En España se han citado tres especies de coccinélidos sobre cóccidos diáspidos, que son: *Rhyzobius lophantae* Blaisdell, *Chilocorus bipustulatus* (L.) y *Exochomus quadripustulatus* (L.) (Mercet, 1923; Gómez-Menor, 1937; Gómez-Clemente y Planes, 1950; Gómez-Clemente, 1951- 52; Ripollés, 1990; Alfaro *et al.*, 1993; Alfaro *et al.*, 1999; Moner, 2000; Urbaneja *et al.*, 2005; Sorribas y Garcia-Marí, 2010).

Sin embargo, estas especies no parecen ser muy abundantes en los cítricos valencianos, al menos cuando se ha empleado el aspirador entomológico como método de muestreo. En un trabajo realizado durante tres años en parcelas de cítricos valencianos, en un total de 5.265 individuos, sólo se capturó un ejemplar de *R. lophantae* (Alvis *et al.*, 2002). Sin embargo, en otro estudio también en la Comunidad Valenciana, *R. lophantae* resultó ser el coccinélido más abundante, y se concluyó que los depredadores tuvieron mucha menor incidencia en las poblaciones de *A. aurantii* que los parasitoides. No obstante, su efecto en el control de las ninfas móviles y las hembras grávidas fue importante mostrando la importancia de conservar un buen complejo de enemigos naturales para un buen control de la plaga (Sorribas, 2011).

- **Otros depredadores**

En otras regiones citrícolas, se han observado algunos neurópteros de la familia Chrysopidae (Furness *et al.*, 1983; Forster y Luck, 1996) y al neuróptero coniopterígido *Conwentzia psociformis* (Curtis) (Bodenheimer, 1951) atacando a diversos estados de *A. aurantii* para alimentarse. También han sido citados el trips *Aleurodothrips fasciapennis* (Franklin) (Palmer y Mound, 1990) y ácaros de la familia Hemisarcoptidae (Luck *et al.*, 1999). En España, algunos dípteros cecidómidos se han observado depredando a *A. aurantii* (Vanaclocha *et al.*, 2012), como el caso de la especie *Lestodiplosis aonidiellae* (Sorribas, 2011), también los ácaros fitoseidos *Typhlodromus phialatus* (Athias-Henriot) y *Amblyseius swirskii* (Athias-Henriot) (Juan-Blasco *et al.*, 2008). A pesar de la importancia de los distintos depredadores, DeBach (1969) indica que en un cultivo en el que exista un buen control biológico de *A. aurantii* la presencia de depredadores es rara, por tanto los parasitoides parecen ser una mejor solución que los depredadores.

### **1.2.3 Control biológico por parasitoides himenópteros**

Los parasitoides himenópteros son un grupo diverso de insectos cuyas especies se caracterizan por su alto grado de especialización y especificidad. Sin embargo, los hospedadores fitófagos son frecuentemente atacados por diversas especies de parasitoides especializados, los cuales, inevitablemente, entrarán en competencia interespecífica por este recurso (Godfray, 1994).

### 1.2.3.1 Endoparasitoides: géneros *Comperiella* y *Encarsia*

*Comperiella bifasciata* (Hymenoptera: Encyrtidae) es el endoparasitoide más importante en algunas regiones de California, Australia, Sudáfrica, Italia y Argentina (Anneck, 1969; Catling, 1971; McLaren, 1978; Rosen y DeBach, 1978; Atkinson, 1983; Forster y Luck, 1996; Smith *et al.*, 1997; Bedford, 1998; Siscaro *et al.*, 1999). En España se realizaron sueltas en los años noventa pero no se ha conseguido instalar (Pina y Verdú, 2007a). *Encarsia perniciosi* (Hymenoptera: Aphelinidae) es el segundo endoparasitoide solitario más eficiente, pero el control que ejerce sobre las poblaciones de *A. aurantii* es insuficiente (figura 1.9). En España se liberó en los años noventa y se instaló en el sur de la provincia de Valencia (Sorribas *et al.*, 2010), pero su incidencia es menor la de los ectoparasitoides.



**Figura 1.9.** Adulto del endoparasitoide *Encarsia perniciosi* (Vanaclocha, 2012).

### 1.2.3.2 Ectoparasitoides: género *Aphytis*

Los ectoparasitoides son los más eficaces de entre todos los enemigos naturales de *A. aurantii*. Todos los ectoparasitoides conocidos de *A. aurantii* pertenecen al género *Aphytis* Howard (Hymenoptera: Aphelinidae) cuyas especies son generalmente superiores en efectividad a los endoparasitoides y a los depredadores de cóccidos diaspididos. Los parasitoides del género *Aphytis* están considerados como los más efectivos y más ampliamente utilizados agentes de control biológico de *A. aurantii* en cítricos (DeBach, 1974; Rosen y DeBach, 1979; Rosen, 1994; Forster y Luck, 1996).

El género *Aphytis* es cosmopolita y está formado por insectos de color amarillento o grisáceo que rara vez exceden el milímetro de longitud (Rosen y DeBach, 1979). Las tres especies más importantes de *Aphytis* en el control de *A. aurantii* en cítricos a nivel mundial son: *Aphytis melinus* DeBach, *Aphytis lingnanensis* Compere y *Aphytis chrysomphali* (Mercet) (figura 1.10). De estos tres, *A. melinus* es el parasitoide capaz de controlar satisfactoriamente las poblaciones de *A. aurantii* en muchas partes del mundo (DeBach *et al.*, 1971; Rosen y DeBach, 1979).

Un ejemplo del control natural de las poblaciones de *A. aurantii* por *A. melinus* se da en el sur California, mientras que en el norte de este estado americano el control está basado en sueltas masivas de este parasitoide (Luck, 2006). Sin embargo, en Sudáfrica, otras especies indígenas del género *Aphytis* son las que han atacado eficazmente a *A. aurantii* siendo capaces de ofrecer un control biológico satisfactorio (Bedford y Grobler, 1981). En España, a diferencia de otras zonas cítricas, las poblaciones de *A. aurantii* no son controladas naturalmente por las especies del género *Aphytis* (Jacas y Urbaneja, 2010).



**Figura 1.10.** Pupas de los ectoparasitoides *A. chrysomphali* (a), *A. melinus* (b) y *A. lingnanensis* (c) (Vanaclocha, 2012).

- **Biología, ecología y comportamiento**

La mayoría de especies de *Aphytis* son multivoltinas, es decir, se desarrollan de forma continua a lo largo del año pudiendo completar hasta tres generaciones por cada generación de *A. aurantii* (Murdoch *et al.*, 1995), completando su ciclo en 12-13 días a 26,7°C (Rao y DeBach, 1969). Muchas especies son biparentales y se reproducen sexualmente exhibiendo reproducción arrenotoca donde los huevos sin fertilizar dan lugar a machos y los fertilizados a hembras (Doutt, 1959; Rosen y DeBach, 1979).

Además, las hembras son capaces de acumular el esperma del macho en la espermateca, pudiendo controlar el sexo de su descendencia en el momento de la puesta vía haplodiploidía; huevos sin fertilizar producen machos y huevos fertilizados producen hembras (Flanders, 1953; Rosen y DeBach, 1979). En otras especies se desconoce la existencia del macho o es tan infrecuente que se consideran uniparentales (Rosen y DeBach, 1979; Viggiani, 1984). Las especies uniparentales exhiben partenogénesis telitoca como consecuencia de la infestación con la bacteria simbiótica *Wolbachia*, como es el caso de *A. chrysomphali*. En estas especies la descendencia está formada exclusivamente por hembras procedentes de huevos sin fertilizar por la ausencia de machos (Doutt, 1959; Rosen y DeBach, 1979). Los insectos del género *Aphytis* tienen un desarrollo holometábolo y pasan por los siguientes estados de desarrollo: huevo, larva, prepupa, pupa y adulto (figura 1.11).

La hembra de *Aphytis* es **sinovigénica**, es decir, emerge con un número reducido de huevos los cuales se desarrollarán y madurarán en los ovarios continuamente a lo largo de la vida del parasitoide (Rosen y DeBach, 1979; Collier 1995). Además, las especies de *Aphytis* son **idiobiontes**, es decir, en el momento de la puesta la hembra presumiblemente paraliza el desarrollo de su hospedador mediante la inserción de una sustancia paralizante a través de su ovipositor (Rosen y DeBach, 1979; van Lenteren, 1994). Las hembras de *Aphytis* realizan una búsqueda de la cochinilla de manera aleatoria mediante pequeñas carreras y vuelos cortos (DeBach y Sundby, 1963). Luck y Uygun (1986), detectaron que las hembras de *Aphytis* utilizaban una kairomona no volátil emitida por el escudo de *A. aurantii* para localizarlo y proceder a su reconocimiento externo, paso previo al examen interno.

Los adultos se alimentan presumiblemente de néctar y melaza producido por otros hemípteros para obtener carbohidratos necesarios principalmente para su movimiento (Bartlett, 1962; Avidov *et al.*, 1970; Heimpel y Rosenheim 1995). Sin embargo, las hembras necesitan proteínas para la maduración de sus huevos las cuales son obtenidas a través de la acción depredadora de las **picaduras de alimentación** o “host feeding” (figura 1.12) realizadas sobre *A. aurantii* (Rosen y DeBach, 1979; Collier, 1995), las cuales pueden causar una considerable mortalidad (Reeve, 1987).

Las picaduras de alimentación son realizadas sobre individuos de *A. aurantii* que no son utilizados por *Aphytis* para efectuar su puesta, como por ejemplo el estadio  $N_1$  o incluso pequeños escudos de los estadios  $N_2$  y  $N_3$  (Heimpel y Rosenheim, 1995). Por tanto, las cochinillas son utilizadas para “host-feeding” o para oviposición y cuando ambas acciones concurren en el mismo escudo de *A. aurantii*, la progenie de *Aphytis* no se desarrollará a adultos (Heimpel y Rosenheim, 1995).

Para averiguar si el hospedador es adecuado o no para la puesta realizan **picaduras de prueba** o “probing” (figura 1.12), y aunque no son utilizadas como fuente de alimentación, también pueden provocar la muerte de la cochinilla. No obstante, la evaluación de este tipo de mortalidad en campo es difícil de cuantificar por lo que se piensa que su importancia relativa puede estar subestimada (Vanaclocha *et al.*, 2009). Por tanto, las hembras de *Aphytis* pueden matar a la cochinilla mediante: picaduras de prueba, picaduras alimenticias y parasitismo sobre los estados inmaduros de *A. aurantii*. El parasitismo de *Aphytis* spp. puede ser evaluado una vez emergido el adulto por: restos la exuvia del parasitoide, meconios, restos del cuerpo del piojo rojo y orificio de salida del parasitoide en el escudo (Rosen y DeBach, 1979) (figuras 1.11).

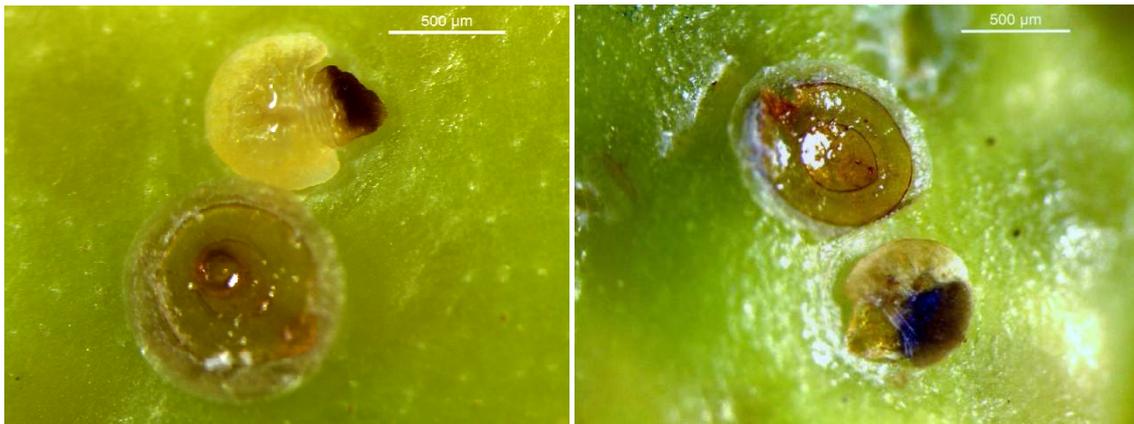


**Figura 1.11.** Estados de desarrollo de *Aphytis*: **a)** huevos, **b)** larvas, **c)** prepupas con meconios, **d)** pupas con restos de meconios, **e)** exuvia y **f)** adulto (Vanaclocha, 2012).

En la secuencia del parasitismo, una vez localizado el escudo, el parasitoide puede: 1) rechazarlo sin examinarlo, 2) reconocerlo con sus antenas y aparato bucal y rechazarlo, 3) reconocerlo externamente e internamente mediante una picadura de prueba y rechazarlo y 4) aceptar el escudo. La aceptación consiste en la localización, reconocimiento externo, picadura de prueba y oviposición (Rosen y DeBach, 1979; Luck *et al.*, 1982; van Lenteren, 1994; Casas *et al.*, 2004).

En el momento de la oviposición, las hembras de *Aphytis* necesitan un espacio libre entre la cara interna del escudo y el cuerpo del diaspino, no siendo parasitables ni los estados muda de *A. aurantii*, en los que el cuerpo de la cochinilla está firmemente unido al escudo, ni las hembras grávidas que además presentan un escudo fuertemente esclerotizado (DeBach y White, 1960; Rosen y DeBach, 1979). Las ninfas N<sub>1</sub> tampoco suelen ser parasitadas porque su reducido tamaño impide el desarrollo del parasitoide (Baker, 1976). Los *Aphytis* son **ectoparasitoides** porque durante la puesta la hembra perfora la cubierta de la cochinilla con el ovipositor y pone uno o varios huevos sobre o debajo del cuerpo de *A. aurantii*. Además, muchas especies de *Aphytis* son facultativamente **gregarias**, pudiendo poner uno o más huevos en su hospedador (Rosen y DeBach, 1979).

En el caso en el que una hembra de una especie gregaria facultativa como *Aphytis* ponga varios huevos en un mismo hospedador, éstos se desarrollarán sin ningún conflicto (Godfray, 1994; Ode y Rosenheim, 1998). Por un lado, algunas especies de este género son capaces de distinguir si la cochinilla ha sido previamente parasitada por otra hembra de su misma especie (**discriminación conespecífica del hospedador**). Con este comportamiento pueden evitar situaciones de **superparasitismo**, ya que de lo contrario sus larvas entrarán en competencia intraespecífica y tendrán una desventaja por disponer de menos recursos del hospedador (van Lenteren y DeBach, 1981; Godfray, 1994). Por otro lado, el **multiparasitismo** ocurre cuando un parasitoide ataca a un hospedador que ha sido previamente parasitado por una hembra de otra especie. En este caso, la decisión de la hembra de multiparasitar representa un riesgo para el parasitoide porque su progenie estará obligada a entrar en una competencia que puede ser letal (Godfray, 1994).



**Figura 1.12.** Izquierda: picaduras de alimentación o “host feeding” sobre hembra joven o N<sub>3</sub>. Derecha: picadura de prueba o “probing” sobre hembra joven o N<sub>3</sub>.

- **Estado actual del control biológico de *A. aurantii* en España**

En los cultivos cítricos españoles *A. melinus* y *A. chrysomphali* son los parasitoides más abundantes de *A. aurantii* (Rodrigo y Garcia-Marí, 1990; Pina *et al.*, 2003; Pina, 2007; Sorribas *et al.*, 2008; Vanaclocha *et al.*, 2009), ya que *A. lingnanensis* parece no haberse establecido (Verdú y Pina, 2002; Pina y Verdú 2007b). Sin embargo estos parasitoides no consiguen controlar las poblaciones de *A. aurantii* de forma natural (Jacas y Urbaneja, 2010). Por un lado, *A. chrysomphali* es nativo del Mediterráneo donde parasitaba a *Chrysomphalus dictyospermi* (Morgan) (Hemiptera: Diaspididae) antes de la introducción del piojo rojo de California. Por contra, *A. melinus* se introdujo en el este de España a través de un programa de control biológico clásico en los años noventa (Jacas *et al.*, 2006; Pina, 2007; Pina y Verdú, 2007a).

Actualmente en España, *A. melinus*, es el competidor superior y ha desplazado al parasitoide nativo *A. chrysomphali* de las zonas cálidas y secas ya que puede tolerar mejor las temperaturas altas del verano. Sin embargo, en contraste con lo que sucede en la mayoría de zonas citrícolas del mundo, ambos *A. melinus* y *A. chrysomphali* coexisten a lo largo de la costa de la Comunidad Valenciana desde la introducción del primero (Sorribas, 2011). La coexistencia y la abundancia de estos parasitoides en los cítricos valencianos depende no solo de las condiciones climáticas sino también de su localización geográfica (Sorribas *et al.*, 2010) y de la época del año (Boyero *et al.*, 2008). También se ha sugerido que coexisten porque ninguno de los dos ha sido capaz de controlar las poblaciones de *A. aurantii* (Pekas, 2011).

Durante los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios para mejorar el control biológico de *A. aurantii*, los cuales han descrito las posibles causas que impiden el control biológico natural. Por otro lado, otros trabajos están intentando mejorar este control biológico mediante la puesta a punto de un programa de control biológico por inoculación a través de sueltas masivas para incrementar las poblaciones del parasitoide *A. melinus* en nuestros cítricos (Tena *et al.*, 2011; Urbaneja *et al.*, 2014).

### 1.3. Interacciones competitivas entre parasitoides

La competencia entre parasitoides antagonistas puede dividirse en dos categorías: extrínseca (hembras en búsqueda activa hospedadores) e intrínseca (inmaduros del parasitoide desarrollándose sobre o dentro del hospedador compitiendo por recursos limitados) (Harvey *et al.*, 2013). La competencia intrínseca entre dos o más especies de parasitoides también se define como **multiparasitismo** (Godfray, 1994; Harvey *et al.*, 2013). Para reducir o prevenir la competencia intrínseca entre estados inmaduros, algunos parasitoides son capaces de distinguir entre hospedadores parasitados y sin parasitar por otra especie (**discriminación heteroespecífica del hospedador**) (Turlings, 1985; Pijls *et al.*, 1995; Collier *et al.*, 2007).

Cuando una hembra con esta habilidad encuentra un hospedador parasitado puede mostrar cualquiera de estos comportamientos: 1) rechazar al hospedador y buscar activamente otros 2) alimentarse de la hemolinfa de la cochinilla para producir huevos adicionales o alargar su vida; 3) parasitar añadiendo uno o más huevos en una cochinilla con una puesta previa; y/o 4) matar los huevos inicialmente puestos por otra hembra (=ovicidio) y reponerlos con los suyos propios (Strand y Godfray 1989; Mayhew, 1997; Netting y Hunter 2000; Infante *et al.*, 2001; Goubault *et al.*, 2004; Perez Lauchaud *et al.*, 2004; Collier *et al.*, 2007). Este último comportamiento puede inclinar la balanza en favor de la hembra ovicida (Quicke, 1997)

El resultado de la competencia, tanto entre inmaduros como entre adultos e inmaduros, puede también dificultar el desarrollo del competidor superior. Por ejemplo, los pocos estudios que han tratado la competencia intrínseca interespecífica han indicado que la supervivencia del competidor superior en los escudos multiparasitados es menor que cuando se desarrolla en solitario en el hospedador (Collier *et al.*, 2007; Cingolani *et al.*, 2013; Cusumano *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013).

A pesar de la mayor mortalidad que pueden tener los inmaduros en los hospedadores multiparasitados, el multiparasitismo puede ser ventajoso para el competidor superior cuando: 1) la tasa de encuentro con hospedadores no parasitados es baja, 2) las hembras de los parasitoides tienen una esperanza de vida baja y una alta carga de huevos y 3) varias hembras buscan hospedadores en el mismo lugar (Bakker *et al.*, 1985; Quicke, 1997). Como agentes reguladores de las poblaciones de insectos plaga, un mayor conocimiento de los efectos de la competencia intrínseca entre parasitoides podría ayudarnos a comprender mejor si la competencia está interfiriendo con los efectos de la supresión de la plaga, además de explicar los mecanismos biológicos por los cuales *A. melinus* es superior a *A. chrysomphali*.

### **1.3.1 Competencia interespecífica entre parasitoides del género *Aphytis***

La especialización de los parasitoides del género *Aphytis* permite que puedan reducir la cantidad de *A. aurantii* hasta niveles cerca de 200 veces menores que la media de la densidad de esta plaga en ausencia de su enemigo natural (DeBach *et al.*, 1971), sugiriendo una potencial competencia por los recursos entre las especies de parasitoides (Borer *et al.*, 2004). De hecho, las especies del género *Aphytis* representan uno de los casos más conocidos de desplazamiento competitivo en insectos (Luck *et al.*, 1982, Luck y Podoler, 1985; Murdoch *et al.*, 1996; Luck y Nunney, 1999).

Los parasitoides de la especie *A. melinus* son los responsables del control biológico natural de *A. aurantii* en California (Moreno y Luck, 1992). Durante los últimos 20 años, la supresión de *A. aurantii* en California se ha debido a una interacción estable entre este parasitoide y el piojo rojo. Sin embargo, fue necesaria la introducción de al menos 50 enemigos naturales de los que 8 consiguieron establecerse (Murdoch *et al.*, 2006).

Tras su introducción, *A. melinus* y *A. lingnanensis* eran los parasitoides más abundantes en California pero *A. melinus* desplazó a *A. lingnanensis* (Luck y Podoler, 1985) y a *A. chrysomphali* en el interior de California (Podoler, 1981; Luck *et al.*, 1982; Luck y Podoler, 1985) y en diversas áreas del Mediterráneo respectivamente (Argyriou, 1974; Gonçalves *et al.*, 2002; Guirrou *et al.*, 2003; Vela *et al.*, 2007). Sin embargo, en otras zonas del Mediterráneo ambas especies coexisten como ocurre en algunas partes del litoral español (Sorribas *et al.*, 2010).

La proporción de sexos de la descendencia de *A. melinus* y *A. lingnanensis* depende del tamaño del escudo de la cochinilla y fue sugerido como una explicación del primer desplazamiento competitivo. En comparación con *A. lingnanensis*, *A. melinus* utiliza cochinillas más pequeñas para la producción de su progenie de hembras, de este modo parasita primero los escudos cosa que dificulta la producción de hembras de *A. lingnanensis* (Luck *et al.*, 1982; Luck y Podoler, 1985; Luck y Nunney, 1999).

En el caso de *A. chrysomphali*, *A. melinus* está considerado como el competidor superior en el campo porque exhibe unos mejores parámetros biológicos, una mayor capacidad de dispersión (McLaren, 1976) y está mejor adaptado a climas secos y cálidos (Rosen y DeBach, 1979). La coexistencia de estos dos últimos parasitoides en la Comunidad Valenciana ha sido atribuida a la fluctuación de las condiciones ambientales, a la variación estacional de la abundancia de parasitoides (Sorribas *et al.*, 2010) y a la plasticidad de *A. chrysomphali* para usar diferentes tamaños de escudos dependiendo de la densidad de *A. melinus* (Pekas *et al.*, enviado).

Sin embargo, la competencia intrínseca y si las hembras son capaces o no de matar a la progenie de su competidor es algo todavía desconocido, pero podría explicar algunos de los resultados en ensayos de campo mencionados anteriormente (Sorribas *et al.*, 2010; Pekas *et al.*, 2011; Pekas *et al.*, enviado). En el presente trabajo se ha determinado el efecto de la competencia interespecífica de *A. melinus* y *A. chrysomphali*, tanto entre sus larvas, como entre las hembras de una y los huevos de la otra cuando parasitan *A. auranti*.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



*A. aurantii* se encuentra en estos momentos entre las plagas más importantes de los cultivos cítricos españoles. A pesar de que existen diferentes métodos de control alternativo, el control de esta plaga todavía se basa en el control químico con aplicaciones recurrentes e insostenibles. En los últimos años se ha intentado mejorar el control biológico de *A. aurantii* mediante la introducción de parasitoides (control biológico clásico) y, más recientemente, mediante sueltas masivas (control biológico aumentativo) del parasitoide *A. melinus*. Este último ha desplazado al parasitoide nativo *A. chrysomphali* sin que se conozcan ni los mecanismos ni el resultado de esta interacción competitiva por el recurso que comparten. Por tanto, en el presente trabajo se ha planificado el estudio de la competencia intrínseca interespecífica de estos dos parasitoides con los siguientes objetivos:

1. Conocer el comportamiento de *A. melinus* y *A. chrysomphali* cuando encuentran hospedadores (*A. aurantii*) no parasitados (sanos) y previamente parasitados por la otra especie para determinar si son o no capaces de discriminarlos.
2. Determinar si las hembras de estas dos especies son capaces de practicar ovicidio y acabar con la descendencia de la especie competidora.
3. Analizar el resultado de esta competencia evaluando la descendencia de ambos parasitoides dependiendo del orden en el que parasitan.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS



### 3.1 Sistemas de cría de laboratorio

#### 3.1.1 Cría del piojo rojo de California

Los individuos de *A. aurantii* fueron criados sobre frutos de limón (*Citrus limon* (L.) Burm f.) de color verde de la variedad Verna sin tratamientos químicos procedentes de las parcelas del Departamento de Entomología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) en Moncada (Valencia, España). La cría del piojo rojo de California del IVIA fue iniciada en 1999 con escudos recolectados en campos de cítricos de Alzira (Valencia, España), y ha sido renovada cada 2-3 años (Tena *et al.*, 2013). Los limones se conservaron a 8°C y posteriormente fueron lavados con agua y cepillados para eliminar polvo y otros posibles fitófagos.

A continuación, aproximadamente 2/3 de la superficie del limón fue sumergida en parafina coloreada para prevenir la desecación del fruto (figura 3.1). Un kg de parafina en perlas (Parafina USP perlas, Guinama S.L., Alboraya, España) se calentó hasta 65 °C y se mezcló con 1 g de colorante rojo (Sudan III, Panreac Química S.A., Castellar del Vallés, España). Entonces, la superficie del limón sin parafina, de unos 24 cm<sup>2</sup>, fue infestada por exposición durante 24 h a las hembras grávidas de la colonia de *A. aurantii* del IVIA (figura 3.1). Los limones infestados se mantuvieron en la oscuridad en cámaras climáticas a 27 ± 1 °C, 70 ± 10% HR hasta que las hembras alcanzaron el estadio N<sub>3</sub> (19-22 días), el tipo de escudos utilizados en este ensayo.



**Figura 3.1.** Izquierda: limones parafinados para la cría de *A. aurantii*. Derecha: infestación de limones en la cría de *A. aurantii* del IVIA.

### 3.1.2 Cría de los parasitoides

Los individuos de *A. melinus* y *A. chrysomphali* fueron obtenidos mediante la exposición de estos limones con escudos N<sub>3</sub> de *A. aurantii* para que fueran parasitados por adultos de procedentes de la cría de parasitoides del género *Aphytis* del Departamento de Entomología del IVIA mantenida en cámaras climáticas a  $26 \pm 1$  °C,  $60 \pm 10\%$  HR y fotoperíodo 16:8 h L:O<sup>1</sup> (figura 3.2). La cría de *A. melinus* del IVIA fue iniciada en 2008 y la de *A. chrysomphali* en 2013 con escudos de *A. aurantii* parasitados procedentes de cítricos de Alzira y Moncada respectivamente (Valencia, España), ambas renovadas anualmente.

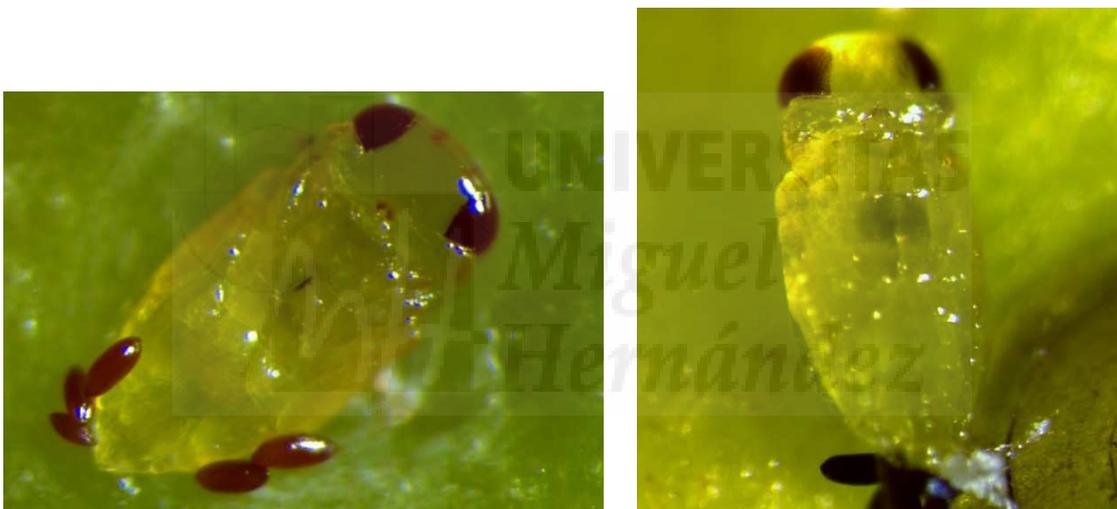
Los adultos y las pupas de ambas especies de parasitoides pudieron distinguirse por la presencia de una pequeña línea negra longitudinal en el mesosternum del tórax de *A. chrysomphali* que está ausente en *A. melinus* (Pina y Verdú, 2007a) (figura 3.3). La coloración de los ojos de las pupas es un buen indicador de su estado de desarrollo, y pasan de ser incoloros a rojos, negros y finalmente verdes que indican la próxima emergencia de los adultos (Rosen y DeBach, 1979). Las pupas de último estadio (ojos verdes) fueron extraídas de los escudos parasitados para su identificación, y luego fueron introducidas en viales individualizados de 8 mm de diámetro y 35 mm de longitud.



**Figura 3.2.** Cría de parasitoides del género *Aphytis* del IVIA.

<sup>1</sup> LO: Luz-Oscuridad

Cuando emergieron los adultos, los insectos fueron sexados y las hembras de *A. melinus* se emparejaron con machos para posteriormente ser mantenidos en sus viales durante un día para obtener hembras fecundadas. En el caso de *A. chrysomphali*, al tratarse de una especie partenogenética, su descendencia está formada exclusivamente por hembras (Gottlieb *et al.*, 1998). Un día después, las hembras de *A. melinus* fueron aisladas durante un día y se les introdujo un cuerpo de *A. aurantii* diariamente para permitirles alimentarse de la hemolinfa del insecto hasta que tuvieron 2-3 días de edad (Heimpel *et al.*, 1997). Los viales que también contenían una pequeña gota de miel y una tapa de algodón para permitir la transpiración, fueron almacenados en una cámara climática (SANYO MLR-350; Sanyo, Japan) a  $25 \pm 1$  °C,  $70 \pm 10\%$  HR y fotoperíodo 14:10 h L:O.

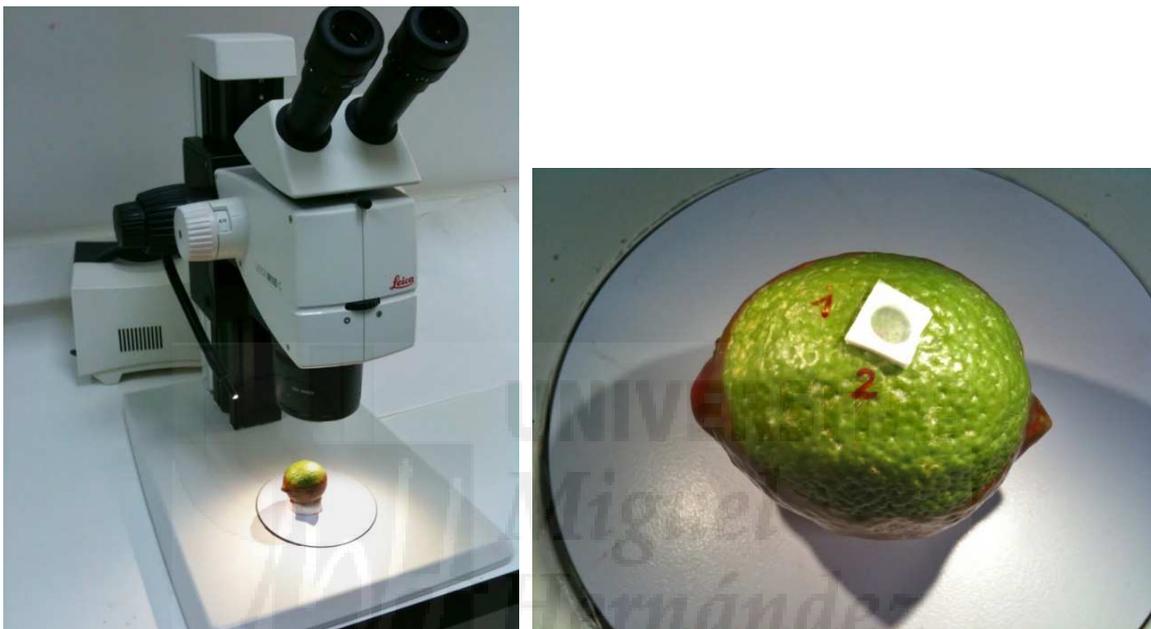


**Figura 3.3.** Izquierda: Pupa de ojos rojos de *A. chrysomphali* con una la línea negra longitudinal característica en el mesosternum. Derecha: *A. melinus* donde esta línea está ausente.

### 3.2 Arena

Las observaciones se realizaron en una sección de un limón delimitada por una placa Petri de 4 cm de diámetro por 1,5 cm de altura para evitar el vuelo de los insectos. En cada sección, se seleccionó un escudo N<sub>3</sub> de entre 0,8 y 1 mm<sup>2</sup> usando una lupa binocular con cámara digital en color incorporada de 3,1 megapixel (Leica Microsystems GmbH, España) (figura 3.4). Las imágenes se procesaron con el programa para Windows LAS EX (Leica Microsystems GmbH, España) y los escudos se midieron con el procesador de imágenes de dominio público Java ImageJ.

El escudo seleccionado con la hembra joven  $N_3$  fue identificado, mientras que el resto de escudos fueron eliminados con una aguja entomológica y retirados con papel humedecido con agua, sin dañar los escudos seleccionados. Este papel también se utilizó para eliminar el polvo de la superficie del limón, que es un factor abiótico que puede interferir en el parasitismo de la hembra de *Aphytis* (Rosen y DeBach, 1979). Para fijar el limón y evitar su movimiento utilizamos un soporte plástico.



**Figura 3.4.** Izquierda: lupa binocular donde se realizaron las observaciones. Derecha: limón con los escudos  $N_3$ , donde se aprecia que uno de los escudos está tapado para evitar el contacto de la hembra de *Aphytis* con él.

### 3.3 Observaciones del comportamiento de los insectos en el laboratorio

Las observaciones se realizaron en el Departamento de Entomología del IVIA desde diciembre de 2013 hasta marzo de 2014 y entre las 10:00 y las 14:00 h. En este experimento se establecieron cuatro tratamientos. En los dos tratamientos control, *A. melinus* y *A. chrysomphali* fueron introducidos por separado en las arenas. En los dos tratamientos de competencia, *A. melinus* y *A. chrysomphali* fueron introducidos secuencialmente en los dos órdenes posibles. La **primera hembra** fue observada hasta que realizó la oviposición en el escudo seleccionado y después fue retirada; la **segunda hembra** de la especie competidora fue introducida 2 h después y se registró su comportamiento (Collier *et al.*, 2007).

Cada tratamiento fue repetido 30 veces y en cada repetición se anotó ininterrumpidamente el comportamiento de la hembra mediante su observación con una lupa binocular de 10-50x utilizando luz fría para iluminar la arena. Las observaciones se iniciaron cuando la hembra reconoció a su hospedador, es decir cuando el insecto tocó con sus antenas y aparato bucal repetidamente la superficie del piojo rojo posicionándose sobre el escudo y moviéndose desde el centro hasta el extremo hasta reconocer toda su superficie (van Lenteren, 1994). Las observaciones terminaron cuando la hembra abandonó el escudo o se quedó en posición de reposo por un período superior a 2 minutos. Los cuatro componentes principales del comportamiento del insecto fueron identificados por separado: (1) **rechazo**, (2) **oviposición**, (3) **ovicidio + oviposición** y 4) **“host-feeding”**.

Después de reconocer externamente el escudo, la hembra siguió examinando la idoneidad del hospedador mediante una picadura de prueba, la cual incluyó la perforación del escudo con su ovipositor, exploración de la cavidad existente entre el cuerpo de la cochinilla y la cubierta del escudo, así como pinchar el cuerpo del piojo rojo para probar la hemolinfa. En los tratamientos control el parasitoide mostró uno de los siguientes comportamientos: 1) abandonó el huésped en cualquier momento de este proceso (rechazo) o 2) aceptó al hospedador y puso huevos (oviposición) o 3) consumió los fluidos de la cochinilla (“host-feeding”), mientras que en los tratamientos de competencia el parasitoide también: o 4) aceptó al hospedador, mató los huevos de la primera hembra (ovicidio) y los repuso por alguno de los suyos (multiparasitismo) (Casas *et al.*, 2004; Tena *et al.*, 2008).

Las picaduras pueden ser de tres tipos: 1) picadura de prueba (“probing”) siempre antes de poner un huevo, 2) picadura de alimentación (“host-feeding”) y 3) picadura para matar los huevos de la otra especie (ovicidio). Cuando se produce una picadura para poner un huevo conducente a una situación de parasitismo nos referiremos a ella como oviposición. La puesta de un parasitoide son todas sus oviposiciones en ese hospedador mientras que el tamaño de puesta es el número total de huevos puestos.

La oviposición fue identificada por las vibraciones abdominales de la hembra. En ese momento la hembra de *Aphytis* extraía el ovipositor del cuerpo de *A. aurantii* y podía abandonar el escudo o bien poner otro huevo (Pina, 2007). También registramos datos de comportamientos adicionales durante nuestras observaciones: (1) posición y número de oviposiciones en cada escudo y (2) posición y número de picaduras en cada escudo. La situación de las oviposiciones y todas las picaduras en el escudo fueron registradas convenientemente con un diagrama. Los parasitoides fueron utilizados una sola vez y cada limón se almacenó individualmente en recipientes de plástico (14 x 14 x 8 cm) con una abertura sellada con muselina para facilitar la ventilación. Estos recipientes se mantuvieron en una cámara climática a  $25 \pm 1$  °C,  $70 \pm 10\%$  HR y fotoperíodo 14:10 h L:O para posteriormente determinar los resultados de estos encuentros.

- **Discriminación y uso del hospedador**

Primero se determinó si las hembras de ambas especies eran capaces de discriminar escudos sanos (no parasitados) de escudos parasitados por la otra especie. Para ello se compararon: 1) tasas de aceptación del escudo, 2) duración de las picaduras y 3) tamaño de puesta de las hembras en escudos parasitados y sin parasitar. También se comprobó si el multiparasitismo representó un coste extra de tiempo para ambas especies. Con este objetivo, se registró y comparó el tiempo invertido en parasitar los escudos sanos con el de los escudos parasitados.

- **Posible ovidio heteroespecífico**

Para determinar si *A. melinus* y *A. chrysomphali* eran capaces de detectar (discriminación heteroespecífica) y matar los huevos de la especie competidora (ovidio heteroespecífico), primero se determinó y comparó si la segunda hembra picaba el escudo en el mismo lugar en el que la primera hembra había realizado la puesta. Entonces se comprobó si estas picaduras eran letales, para ello se comparó la supervivencia de las puestas que habían sido picadas con las que no lo habían sido.

### 3.4 Descendencia

- **Resultado de la competencia**

Para determinar el resultado de la interacción competitiva entre *A. melinus* y *A. chrysomphali*, se revisaron los escudos no parasitados y los multiparasitados entre 10 y 12 días después de las observaciones y se evaluaron las progenes<sup>2</sup> de ambos parasitoides. La cubierta de los escudos fue retirada cuidadosamente con una aguja entomológica bajo lupa binocular. Entonces se registró: 1) especie y 2) número de pupas (Pekas *et al.*, 2010). Estos datos fueron usados para determinar y comparar la supervivencia y el tamaño de las puestas.

### 3.5 Análisis de datos

Todas las comparaciones se realizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) asumiendo que los errores de la varianza tienen una distribución normal, cuando encontramos diferencias significativas realizamos una separación de las medias de los tratamientos utilizando un test LSD con un nivel de significación del 5%. Antes de realizar los análisis de la varianza (ANOVA) se constató el cumplimiento para cada caso de la homocedasticidad (homogeneidad de las varianzas) mediante un test de Levene y la normalidad de los valores mediante la representación en gráficas de probabilidad. En el caso de la variable picar en el sitio de la puesta de la primera hembra los datos fueron analizados usando la Prueba de Bondad  $\chi^2$ . Los análisis fueron realizados con el programa Statgraphics plus versión 5.1 para Windows (Statgraphics 2000).

---

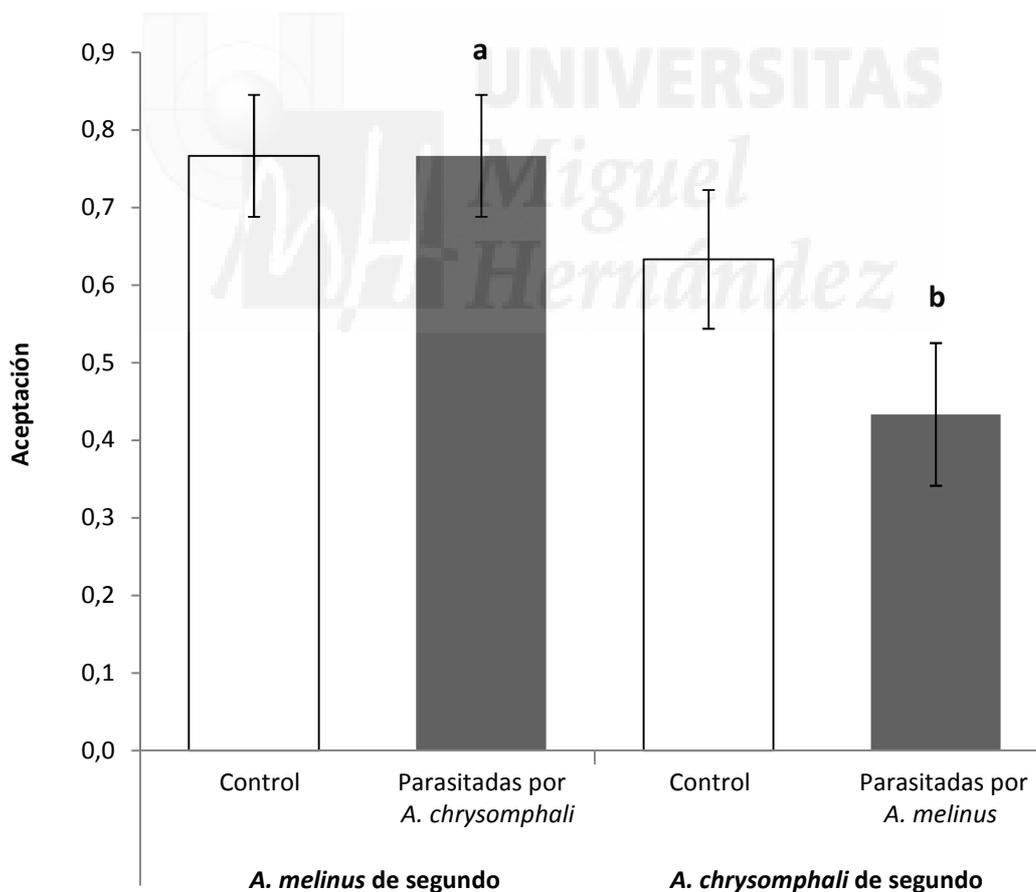
<sup>2</sup>Progenie: todos los individuos inmaduros (pupas) de un parasitoide desarrollados en el hospedador

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



#### 4.1 Aceptación del escudo

En ausencia de competencia, *A. melinus* y *A. chrysomphali* aceptaron los escudos no parasitados de *A. aurantii* (controles) a unos niveles similares y no hubieron diferencias significativas entre los dos parasitoides ( $F_{1, 58} = 1,23$ ;  $P = 0,271$ ) (figura 4.1). La proporción de aceptación de los escudos no parasitados (control) y los parasitados por la especie competidora no fue significativamente diferente ni para *A. melinus* ( $F_{1, 58} = 0$ ;  $P = 1$ ) ni para *A. chrysomphali* ( $F_{1, 58} = 2,35$ ;  $P = 0,13$ ). Sin embargo, *A. melinus* aceptó a los hospedadores parasitados por la especie competidora más frecuentemente que *A. chrysomphali* ( $F_{1, 58} = 6,87$ ;  $P = 0,011$ ). Las observaciones de picaduras de alimentación o “host-feeding” fueron escasas debido a que a las hembras les fueron suministrados dos cuerpos de cochinilla antes del comienzo de las observaciones, y no fueron incluidas en ninguno de los análisis.



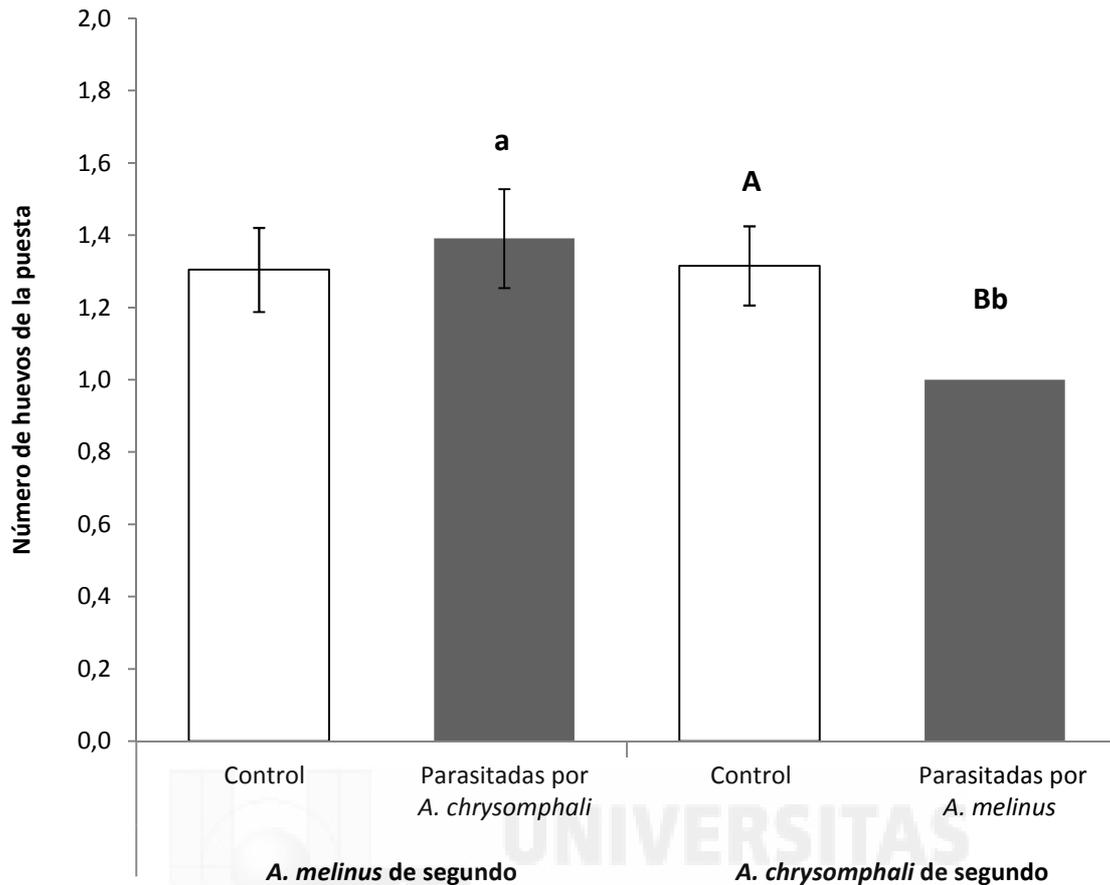
**Figura 4.1.** Proporción de aceptación (oviposición) de *Aonidiella aurantii* por *A. melinus* y a *A. chrysomphali* cuando encontraron un escudo no parasitado (control) y un escudo parasitado por la especie competidora. Diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas para  $P < 0,05$ .

Nuestros resultados, al igual que los publicados por Pekas *et al.*, (2010), muestran que ambos parasitoides aceptan igualmente el tercer estadio de *A. aurantii* ( $N_3$ ) como hospedador no parasitado, a pesar que *A. chrysomphali* es nativo del Mediterráneo y *A. aurantii* es oriundo de Asia. Por lo tanto, teniendo en cuenta esta característica biológica, ambos parasitoides parecen idóneos para mejorar el control biológico de *A. aurantii* en nuestros cítricos. Sin embargo, cuando estos parasitoides encontraron un hospedador parasitado por la otra especie, la competencia se decantó a favor de *A. melinus*; cosa que indica que esta especie presenta una adaptación superior para aceptar en mayor medida este tipo de hospedadores.

Al igual que *A. chrysomphali*, otros parasitoides también disminuyen la aceptación de hospedadores parasitados previamente por otros parasitoides con respecto a los hospedadores sanos, tanto de su misma especie (superparasitismo) (Vinson, 1976; van Aphen y Visser, 1990; van Baaren *et al.*, 1994; Tena *et al.*, 2008; Magdaraog *et al.*, 2013) como de especies diferentes (multiparasitismo) (Magdaraog *et al.*, 2013). Por otra parte, este resultado muestra que *A. chrysomphali* es capaz de discriminar los hospedadores parasitados de los sanos (discriminación heteroespecífica del hospedador). Este rasgo, además de ser innato por ser hembras sin experiencia previa, ha sido documentado anteriormente en otras especies del género *Aphytis* (Abdelrahman, 1974; van Lenteren y DeBach, 1981). Estos autores sugieren que los parasitoides del género *Aphytis* utilizan tanto las señales químicas que deja la primera hembra como el estado interno del diaspídido al que parasitan para discriminar.

#### 4.2 Tamaño de la puesta

*A. melinus* y *A. chrysomphali* pusieron un número similar de huevos cuando parasitaron hospedadores no parasitados (control) ( $F_{1, 37} = 0,04$ ;  $P = 0,84$ ) (figura 4.2). El número de huevos puestos por *A. melinus* fue similar en escudos sin parasitar (control) que en los escudos parasitados por la otra especie ( $F_{1, 37} = 0,047$ ;  $P = 0,83$ ). Sin embargo, *A. chrysomphali* redujo el tamaño de su puesta cuando aceptó hospedadores parasitados comparado con los escudos no parasitados ( $F_{1, 30} = 6,36$ ;  $P = 0,017$ ). Además, *A. melinus* puso significativamente un mayor número de huevos en los escudos parasitados por la otra especie que *A. chrysomphali* ( $F_{1, 34} = 5,25$ ;  $P = 0,028$ ).



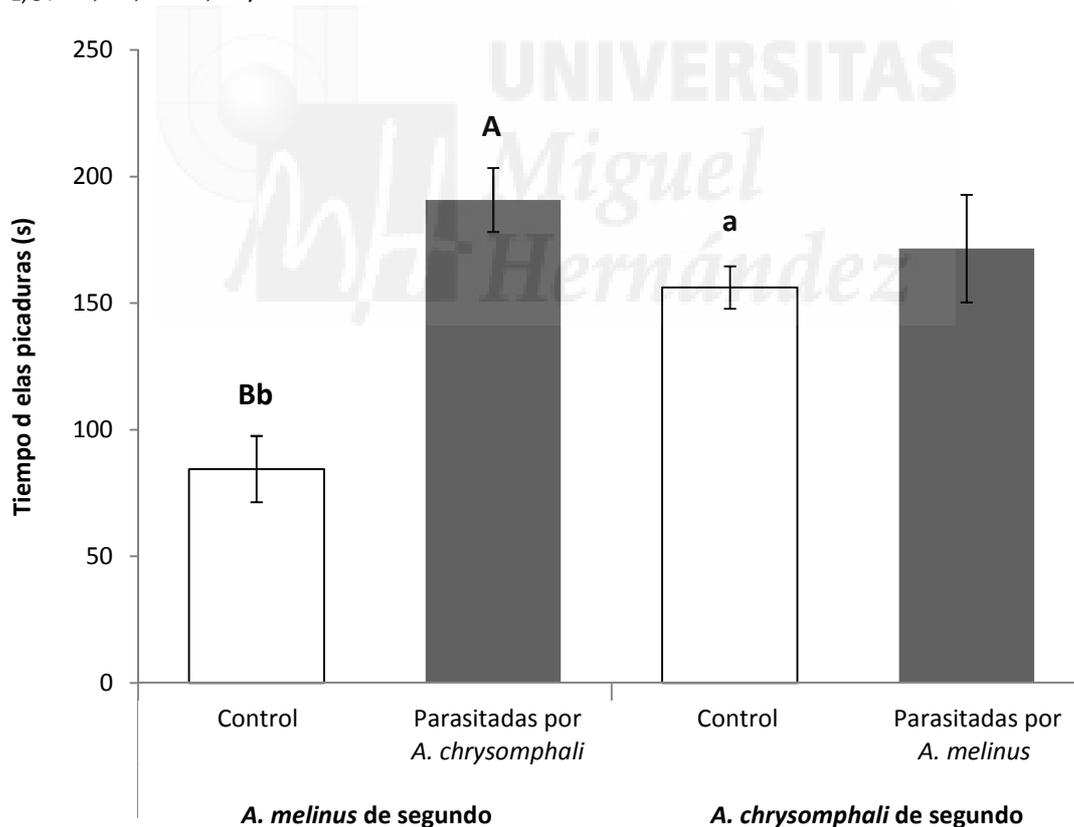
**Figura 4.2.** Comparación del tamaño de la puesta de *A. melinus* y *A. chrysomphali* cuando encontraron un escudo no parasitado (control) y un escudo parasitado por la especie competidora. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo parasitoide para  $P < 0,05$ . Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre parasitoides para un mismo tratamiento para  $P < 0,05$ .

Los parasitoides gregarios tienden a disminuir el tamaño de la puesta cuando superparasitan porque consideran que esos hospedadores son de peor calidad, y consiguientemente su progenie tendrá menores posibilidades de sobrevivir (Godfray, 1994). Sin embargo, el efecto del multiparasitismo en el tamaño de la puesta es poco conocido. En nuestro estudio, a pesar que ambos parasitoides son gregarios facultativos y se comportan principalmente como solitarios, *A. chrysomphali* también disminuyó el tamaño de su puesta. Esto sugiere de nuevo que este parasitoide es capaz de discriminar los escudos sanos de los escudos parasitados por la especie competidora. Por el contrario, *A. melinus* pudo reemplazar parte de los huevos picados de *A. chrysomphali* por los suyos propios con lo que mantuvo un número de huevos en los escudos multiparasitados similares a los de los controles.

### 4.3 Ovicidio/Larvicidio

#### 4.3.1 Duración de las picaduras

Para comprobar si *A. melinus* era capaz de discriminar entre escudos no parasitados y escudos parasitados, se registró también el tiempo de duración de las picaduras (figura 4.3). *A. melinus* pasó significativamente menos tiempo que *A. chrysomphali* picando con el ovipositor a los hospedadores no parasitados (controles) ( $F_{1, 40} = 7,34$ ;  $P = 0,0098$ ). El tiempo de las picaduras de *A. melinus* fue aproximadamente el doble en los escudos parasitados por *A. chrysomphali* que en los no parasitados (controles) ( $F_{1, 44} = 5,74$ ;  $P = 0,021$ ). Por el contrario, *A. chrysomphali* pasó el mismo tiempo picando los hospedadores parasitados por *A. melinus* que los no parasitados ( $F_{1, 30} = 0,028$ ;  $P = 0,6$ ). La duración de las picaduras de ambos parasitoides fue similar cuando parasitaron hospedadores parasitados por la especie competidora ( $F_{1, 34} = 1,13$ ;  $P = 0,72$ ).



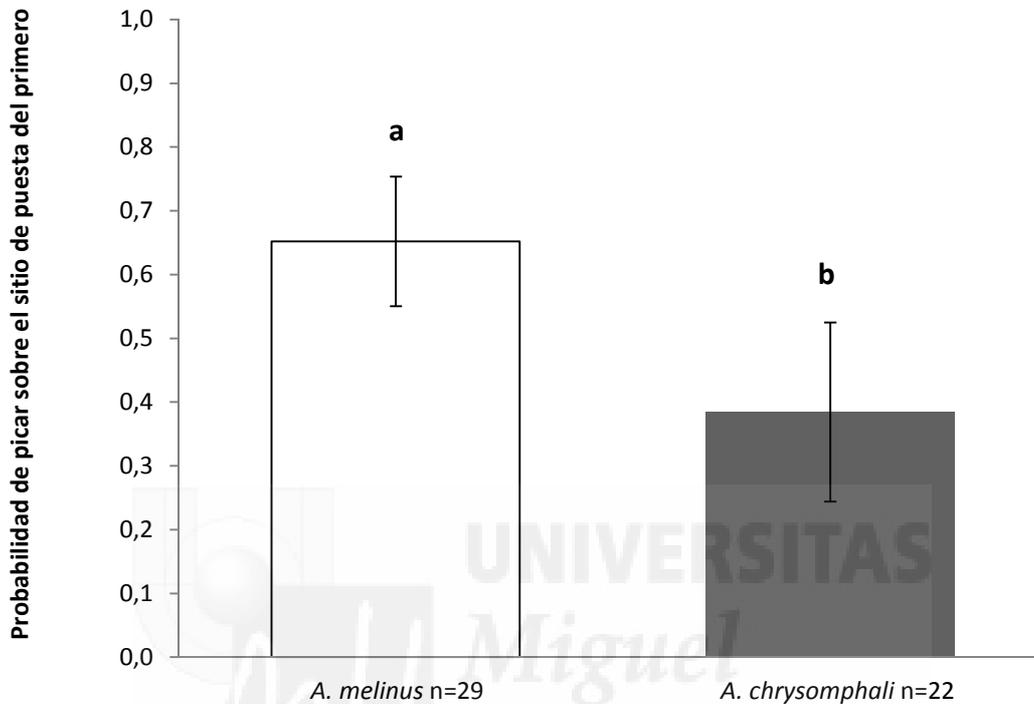
**Figura 4.3.** Tiempo de las picaduras de *A. melinus* y *A. chrysomphali* cuando encontraron un escudo no parasitado (control) y uno parasitado por la especie competidora. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo parasitoide para  $P < 0,05$ . Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre parasitoides para un mismo tratamiento para  $P < 0,05$ .

Por una parte, estos resultados muestran que *A. melinus* es un parasitoide superior porque necesita menos tiempo para parasitar los escudos sanos de *A. aurantii* que *A. chrysomphali*. El tiempo de puesta se considera un factor muy importante en los programas de control biológico en los que se utilizan parasitoides y hay hormigas presentes en el cultivo (Barzman y Daane, 2001). Esto se debe a que las hormigas molestan e impiden la puesta de los parasitoides que necesitan más tiempo para poner huevos (Martínez-Ferrer *et al.*, 2003; Casas *et al.*, 2004). En el caso de *A. aurantii* y de las especies de *Aphytis* se sabe que estos últimos se ven afectados negativamente por la presencia de las hormigas (Pekas *et al.*, 2011; Calabuig *et al.*, 2014).

Por otra parte, el hecho que *A. melinus* destine más tiempo a picar a los hospedadores parasitados que a los sanos demuestra que este parasitoide también es capaz de discriminar entre un hospedador sano y uno parasitado. Algunos parasitoides gregarios facultativos también son capaces de discriminar sin que por ello disminuyan la proporción de puesta y su tamaño (Suzuki *et al.*, 1984; Tena *et al.*, 2008). Aunque la duración de las picaduras de *A. melinus* no fue superior a la de *A. chrysomphali* cuando picaban los escudos parasitados por la especie competidora, *A. melinus* tendió a matar los huevos o larvas ya presentes en el hospedador andes de poner su propia puesta, por tanto los hospedadores parasitados y no parasitados por *A. melinus* fueron de similar calidad para su progenie (Tena *et al.*, 2008).

#### 4.3.2 Lugar de las picaduras

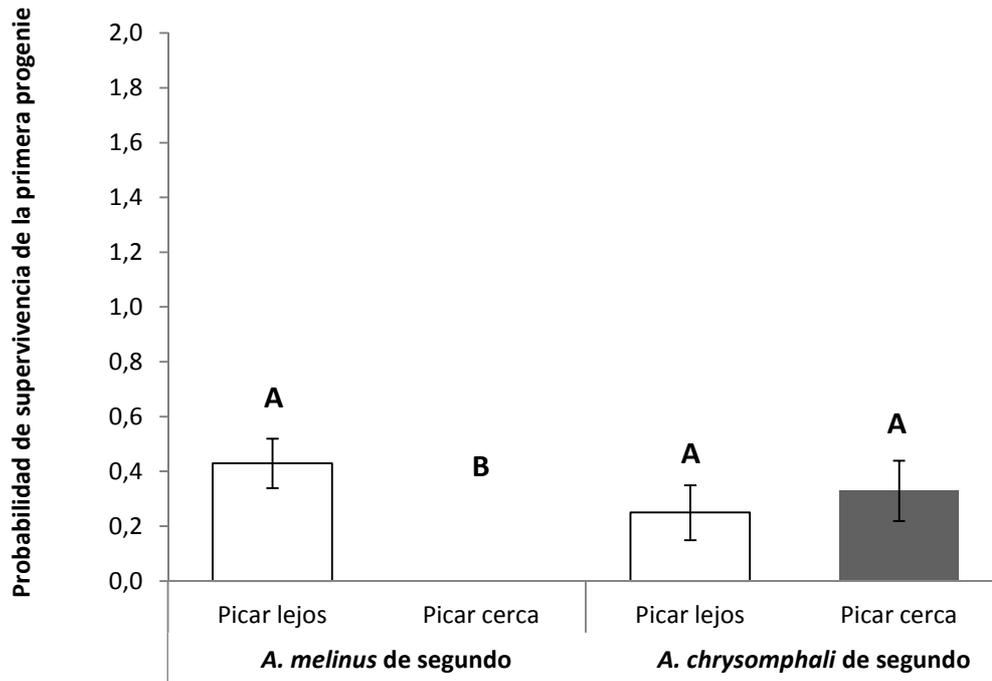
*A. melinus* ( $0.65 \pm 0.10$ ) tendió a realizar picaduras en el lugar del escudo donde la primera hembra había puesto el huevo de un modo más frecuente que *A. chrysomphali* ( $0.33 \pm 0.13$ ) ( $X^2=42,7$ ;  $P=0,049$ ) (figura 4.4).



**Figura 4.4.** Probabilidad que *A. melinus* y *A. chrysomphali* realicen picaduras en el mismo lugar donde el primer competidor parasitó previamente. Diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas para  $P < 0,05$ .

#### 4.3.3 Supervivencia de los huevos picados por la hembra competidora (posible ovidio)

La supervivencia de *A. melinus* fue independiente del lugar donde *A. chrysomphali* realizó las picaduras al hospedador (supervivencia de *A. melinus* cuando *A. chrysomphali* realizó picaduras en el lugar de la puesta del primero ( $0,33 \pm 0,11$ ) y cuando no fue así ( $0,25 \pm 0,08$ ) ( $F_{1, 5} = 0,041$ ;  $P = 0,85$ ). Por el contrario, ningún *A. chrysomphali* sobrevivió cuando *A. melinus* realizó picaduras donde *A. chrysomphali* había puesto su huevo. La probabilidad que *A. chrysomphali* sobreviviera en los hospedadores multiparasitados en los que *A. melinus* no hubiera realizado picadura alguna en el lugar de la puesta del primero fue de  $0,43 \pm 0,09$  (figura 4.5).



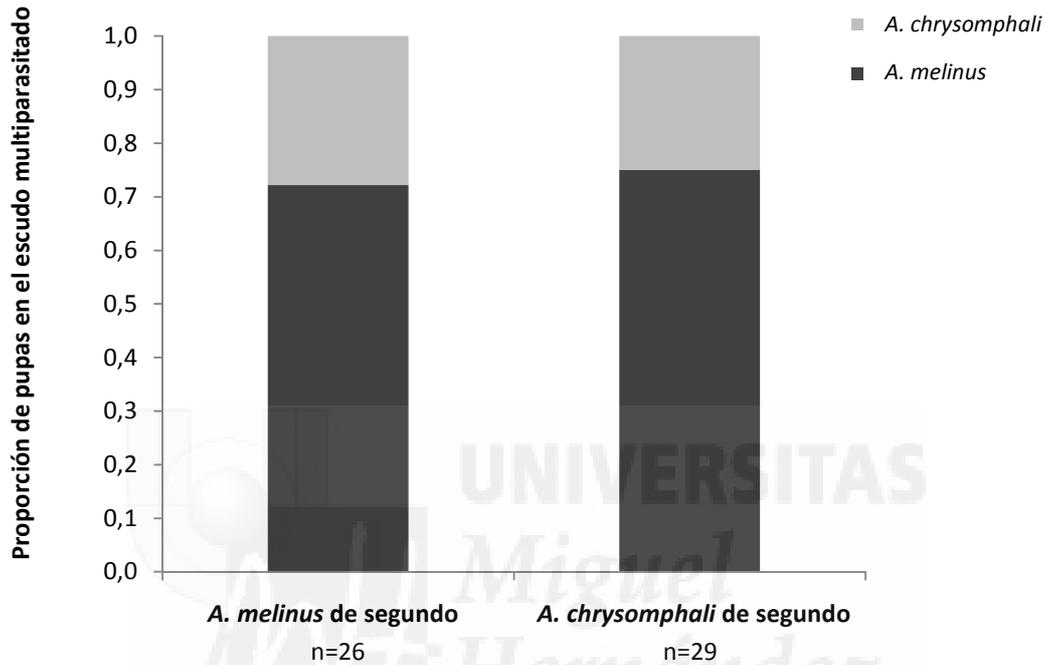
**Figura 4.5** Probabilidad de supervivencia de la primera progenie cuando el segundo parasitoides realizó picaduras cerca o lejos del lugar de parasitismo del primero. Diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas para  $P < 0,05$ .

Los dos últimos resultados sugieren que *A. melinus* no solo es capaz de discriminar los hospedadores parasitados por otra especie sino también de detectar la presencia de sus huevos y probablemente matarlos con su ovipositor. Este comportamiento se conoce como ovidio y últimamente se han revelado varios casos en endoparasitoides y en ectoparasitoides (van Alphen y Visser, 1990; Netting y Hunter 2000). Sin embargo, en un principio se pensaba que los primeros no realizaban ovidio por la dificultad de detectar los huevos dentro de los hospedadores. Los parasitoides del género *Aphytis* a pesar de ser ectoparasitoides presentan un comportamiento semejante al de los endoparasitoides porque ponen los huevos debajo del escudo, de forma que no son visibles para la segunda hembra (van Lenteren y DeBach, 1981).

En nuestro caso, aunque fue difícil observar el ovidio a través del escudo oscuro de *A. aurantii*, se pudo confirmar la mortalidad de los huevos porque ningún *A. chrysomphali* sobrevivió al ataque (figura 4.5). A pesar de esta dificultad *A. melinus* fue capaz de detectarlos sin que ello supusiera un coste extra de tiempo como ocurre con otros parasitoides (Tena *et al.*, 2008). Estos resultados muestran que *A. melinus* es un competidor superior a *A. chrysomphali* porque es capaz de eliminar los huevos del anterior sin que esto suponga un coste de tiempo adicional.

#### 4.3.4. Influencia del multiparasitismo en la descendencia

Independientemente del orden de parasitismo, *A. melinus* fue el parasitoide superior puesto que se recuperaron una mayor proporción de pupas (figura 4.6). En aproximadamente un 70% de los casos las pupas que se recuperaron fueron de *A. melinus*.



**Figura 4.6.** Proporción de pupas recuperadas de *A. melinus* y *A. chrysomphali* en el escudo multiparasitado según el orden en el que los parasitoides encontraron el escudo.

*A. melinus* fue de nuevo un competidor superior a *A. chrysomphali* porque las hembras de *A. melinus* consiguieron producir una mayor proporción de pupas en los escudos multiparasitados independientemente del orden en el que los parasitoides fueron introducidos. Sin embargo, en contraste con nuestros resultados, en otros estudios indican que la progenie de segunda hembra tiene aparentemente una mayor ventaja que la primera en la competencia intrínseca (Collier y Hunter, 2001). En nuestro caso esta diferencia podría deberse a la interacción entre las larvas vía explotación competitiva de los recursos del hospedador, combate entre larvas y al ovicidio practicado por *A. melinus* sobre los huevos de *A. chrysomphali* (Hagen, 1964; Godfray, 1994).

Además, los resultados también parecen revelar que debido a la mayor agresividad de las larvas de *A. melinus*, éstas podrían ser capaces de competir mejor por los recursos del hospedador multiparasitado. Como resultado de los comportamientos descritos anteriormente y de la lucha que se establece entre las larvas de las dos especies dentro del escudo de *A. aurantii*, *A. melinus* fue el parasitoide más eficaz siendo un competidor superior a *A. chrysomphali*. Estos resultados de competencia intrínseca entre los principales parasitoides del género *Aphytis* presentes en España confirman los datos recogidos en campo que muestran que *A. melinus* está desplazando a *A. chrysomphali* en los cítricos españoles (Sorribas *et al.*, 2010; Boyero *et al.*, 2014). En aquellas parcelas donde ambos coexisten, la coexistencia puede ser debida a la baja presión de los parasitoides sobre el hospedador (Pekas *et al.*, 2011), a condiciones climáticas (Sorribas *et al.*, 2010) y/o la presencia de hospedadores alternativos (Pina, 2007).



## 5. CONCLUSIONES

UNIVERSIDAD  
Miguel  
Hernández

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten extraer las siguientes conclusiones:

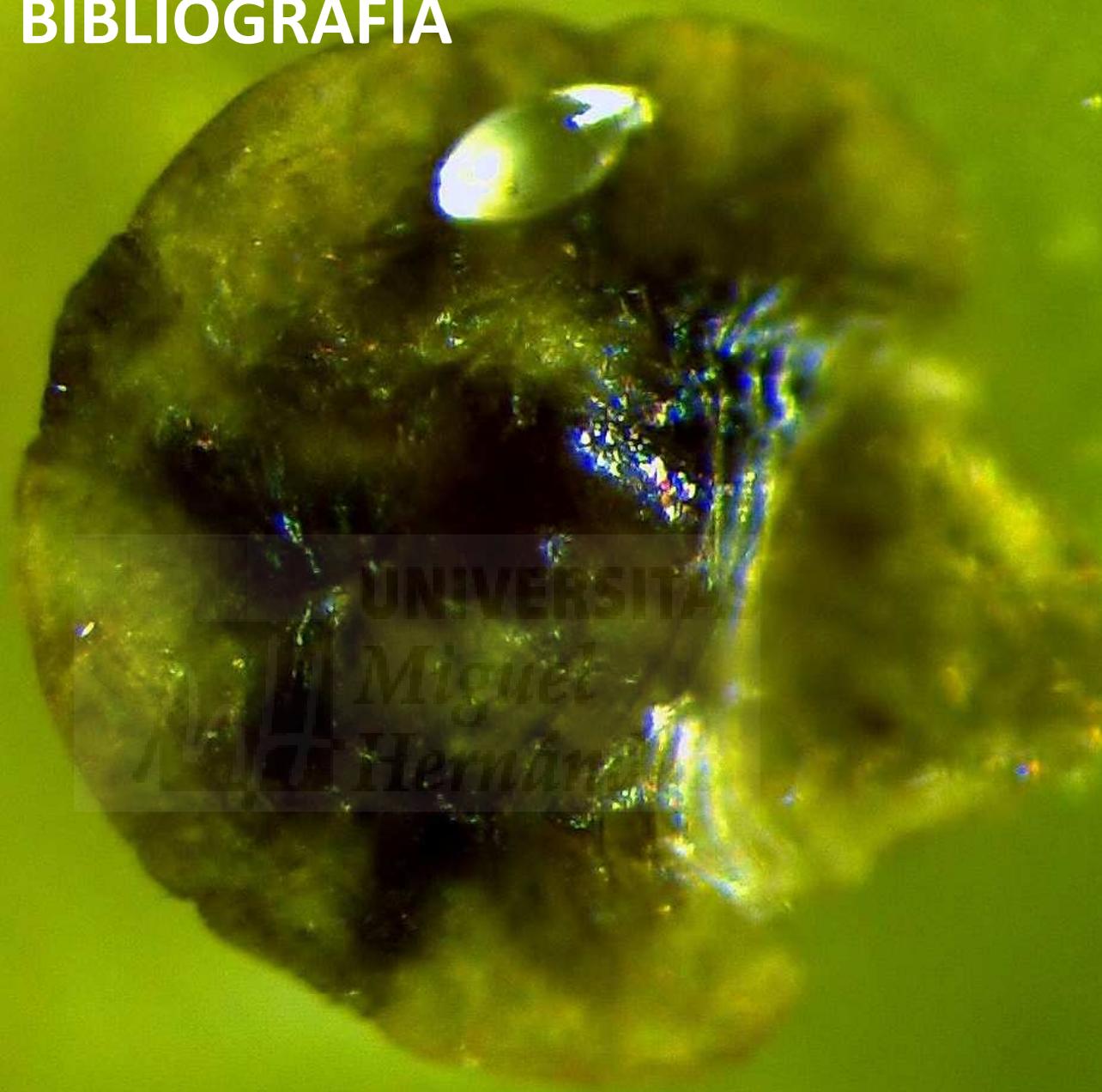
1. Tanto *A. melinus* como *A. chrysomphali* aceptan *A. aurantii* por igual y a altas proporciones. Este resultado tiene implicaciones en los programas de control biológico inundativo en los que se está recomendando las sueltas de *A. melinus* que está plenamente adaptado a las condiciones de cultivo de los cítricos españoles (Boyero *et al.*, 2014). Si se tienen en cuenta nuestros resultados y los publicados anteriormente que muestran porcentajes de aceptación mejor (Pekas *et al.*, 2010; Sorribas *et al.*, 2010), para mejorar las sueltas se recomendaría que los parasitoides tuvieran acceso a los hospedadores antes de las sueltas para que tendieran a parasitar cuando son liberados en campo en lugar de utilizar los hospedadores como fuente de alimentación.

2. Ambos parasitoides son capaces de discriminar entre hospedadores no parasitados (sanos) y parasitados por la otra especie. Esta característica biológica les permite evitar hospedadores parasitados en el caso de *A. chrysomphali* y practicar ovicidio en el caso de *A. melinus*. Este resultado muestra que *A. melinus* es un competidor superior y por lo tanto es previsible que desplace a *A. chrysomphali* en todas las zonas donde todavía coexisten.

3. En condiciones adecuadas, la suelta masiva de *A. melinus* podría acelerar la reducción de los niveles de plaga (*A. aurantii*) sin que las sueltas se vean afectadas negativamente por la presencia y competencia de las poblaciones autóctonas de *A. chrysomphali*.

4. Es previsible que ambos parasitoides coexistan solo en aquellos lugares donde *A. chrysomphali* tenga hospedadores alternativos o en lugares de climas fríos que le son más favorables, especialmente en otoño y primavera.

## 6. BIBLIOGRAFÍA



- Abdelrahman, I.** 1974. The effect of extreme temperatures on California red scale, *Aonidiella aurantii* (Mask.) (Hemiptera: Diaspididae) and its natural enemies, in relation to temperature. *Australian Journal of Zoology*, 22: 203-212.
- Alfaro, F., Cuenca, F.J. y Ferrer, C.** 1993. Piojo rojo de California. *Levante Agrícola*, 323: 101-108.
- Alfaro, F., Cuenca, F. y Esquivá, M.** 1999. Problemática actual del piojo rojo de California en la Comunidad Valenciana. *Comunitat Valenciana Agraria*, 13: 21-28.
- Alvis, L., Raimundo, A., Villalba, M. y Garcia-Marí, F.** 2002. Identificación y abundancia de coleópteros coccinélidos en los cultivos cítricos valencianos. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas*, 28: 479-491.
- Annecke, D.P.** 1969. Recent developments in biological and integrated control of citrus pests in South Africa. *Proceedings of the First International Citrus Symposium*, 849-854 pp. University of California, Riverside.
- Argyriou, L.C.** 1974. Data on the biological control of citrus scales in Greece. *OILB/WPRS Bulletin*, 3: 89-94.
- Atkinson, P.R.** 1977. Preliminary analysis of a field population of citrus red scale, *Aonidiella aurantii* (Maskell), and the measurement and expression of stage duration and reproduction for life tables. *Bulletin of Entomological Research*, 67: 65-87.
- Atkinson, P.R.** 1983. Environmental factors associated with fluctuations in the numbers of natural enemies of a population of citrus red scale, *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae). *Bulletin of Entomological Research*, 73: 417-426.
- Avidov, Z., Balshin, M. y Gerson, U.** 1970. Studies on *Aphytis coheni*, a parasite of the California red scale, *Aonidiella aurantii*, in Israel. *Entomophaga*, 15: 191-207.
- Baker, J.L.** 1976. Determinants of host selection for species of *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae), parasites of diaspidine scales. *Hilgardia*, 44(1): 1-25.
- Bakker, K., van Alphen, J.J.M., van Batenburg, F.H.D., van der Hoeven, N., Nell, H.W., van Strien-van Liempt, W.T.F.H. y Turlings, T.C.J.** 1985. The function of host discrimination and superparasitization in parasitoids. *Oecologia*, 67: 572-576.
- Bartlett, B.R.** 1962. The ingestion of dry sugars by entomophagous insects and the use of this feeding habit for measuring the moisture needs of parasites. *J. Econ. Entomol.* 55: 749-753
- Barzman, M.S. y Daane, K.M.** 2001. Host-handling behaviours in parasitoids of the black scale: a case for ant-mediated evolution. *Journal of Animal Ecology*, 70: 237-247.

- Beardsley, J.W. y González, R.H.** 1975. The biology and ecology of armored scales. *Annual Review of Entomology*, 20: 49-73.
- Bedford, E.C.G. y Grobler, J.H.** 1981. The current status of the biological control of red scale *Aonidiella aurantii* (Mask.), on citrus in South Africa. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 2: 616-620. Keidanren-Kaikan, Japan.
- Bedford, E.C.G.** 1998. Red scale, *Aonidiella aurantii* (Maskell). En: *Citrus pest in the Republic of South Africa.*, Bedford, E.C.G. et al., (ed.) Institute for Tropical and Subtropical Crops, Nelspruit. Pp. 132-144.
- Ben-Dov, Y.** 2003. ScaleNet, Diaspididae: Aspidiotini and Odonaspidini Catalogue. <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm>. Acceso 17 Junio 2014.
- Bodenheimer, F.** 1951. Citrus Entomology in the Middle East. Hoitsema Brothers-Groningen (Holland). 381-387 pp.
- Borer, E.T., Murdoch, W.W. y Swarbrick, S.L.** 2004. Parasitoid coexistence: linking spatial field patterns with mechanism. *Ecology*, 85: 667-678.
- Boyero, J.R., Urbaneja, A., Verdú, M.J. y Vela, J.M.** 2008. Parasitismo natural sobre el piojo rojo de California, *Aonidiella aurantii*, en Andalucía. *Levante Agrícola*, 400: 125-131.
- Boyero, J.R., Vela, J.M., Wong, E., Garcia-Ripoll, C., Verdú, M.J., Urbaneja, A. y Vanaclocha, P.** 2014. Displacement of *Aphytis chrysomphali* by *Aphytis melinus*, parasitoids of the California red scale, in the Iberian Peninsula. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12(1): 244-251
- Calabuig, A., Garcia-Marí, F. y Pekas, A.** 2014. Ants affect the infestation levels but not the parasitism of honeydew and non-honeydew producing pests in citrus. *Bull. Entomol. Res.*, 104(4): 405-17.
- Cameron, J.W., Carman, G.E. y Soost, R.K.** 1969. Differential resistance of *Citrus* species hybrids to infestation by the California red scale, *Aonidiella aurantii* (Mask.). *Journal of American Society of Horticultural Sciences*, 94: 694-696.
- Cameron, J.W., Carman, G.E., Soost R.K. y Pappas, J.L.** 1975. Continued differential resistance among *Citrus* genotypes to California red scale. *HortScience*, 10: 515.
- Carroll, D.P. y Luck, R.F.** 1984. Bionomics of California red scale, *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Homoptera: Diaspididae), on orange fruits, leaves, and wood in California San Joaquin Valley. *Environmental Entomology*, 13: 847-853.
- Casas, J., Swarbrick, S. y Murdoch, W.W.** 2004. Parasitoid behaviour: predicting field from laboratory. *Ecological Entomology*, 29: 657-665.

- Catling, H.D.** 1971. Studies on the citrus red scale, *Aonidiella aurantii* (Mask.) and its biological control in Swaziland. *Journal of the Entomological Society of South Africa*, 34: 393-411.
- Cingolani, M.F. y Greco, N.M.** 2013. Multiparasitism of *Piezodorus guildinii* eggs by *Telenomus podisi* and *Trissolcus urichi*. *BioControl*, 58: 37-44.
- Collier, T.R.** 1995. Host feeding, egg maturation, resorption, and longevity in the parasitoid *Aphytis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 88: 206–214.
- Collier, T.R. y Hunter, M.S.** 2001. Lethal interference competition in the whitefly parasitoids *Eretmocerus eremicus* and *Encarsia sophia*. *Oecologia*, 129: 147-154.
- Collier, T.R., Hunter, M.H. y Kelly, S.E.** 2007. Heterospecific ovicide influences the outcome of competition between two endoparasitoids, *Encarsia formosa* and *Encarsia luteola*. *Ecological Entomology*, 32: 70-75.
- Compere, H.** 1961. The red scale, *Aonidiella aurantii* (Mask.) and its insect enemies. *Hilgardia*, 31: 173-278.
- Cusumano, A., Peri, E., Amodeo, V., McNeil, J.N. y Colazza, S.** 2013. Intraguild interactions between egg parasitoids: window of opportunity and fitness costs for a facultative hyperparasitoid. *Plusone*, 8(5): e64768.
- De Andrés-Cantero, F.** 1975. Catálogo de parásitos del olivo. *Boletín del Servicio de Plagas*, 2:1-189.
- DeBach, P. y White, E.B.** 1960. Commercial mass culture of the California red scale parasite, 1-58 pp. Division of Agricultural Science. University of California, Riverside.
- DeBach, P. y Sundby, R.A.** 1963. Competitive displacement between ecological homologues. *Hilgardia*, 34(5): 105-166.
- DeBach, P.** 1969. Biological control of diaspine scale insects on citrus in California. *First International Citrus Symposium*. University of California, Riverside, 801-815 pp.
- DeBach, P., Rosen, D. y Kennett, C.E.** 1971. Biological control of coccids by introduced natural enemies. In C. Huffaker (ed.). *Biological control*. Plenum, New York, USA, 165-194 pp.
- DeBach, P.** 1974. *Biological control by natural enemies*. Cambridge University Press, London and New York. 323 pp.
- Delucchi, V.L.** 1975. Las plagas más importantes de los cítricos. En: *Los cítricos*, Ciba-Geigy ed. Basilea, Suiza. 24-27 pp.

- Dickson, R.C.** 1951. Construction of the scale covering of *Aonidiella aurantii* (Mask.). *Annals of the Entomological Society of America*, 44: 596-602.
- Doutt, R.L.** 1959. The biology of parasitic hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 4: 161-182.
- Ebeling, W.** 1959. *Subtropical fruit pests*. University of California. Division of Agricultural Sciences. Berkeley. 436 pp.
- Flanders, S.E.** 1953. Aphelinid biologies with implications for taxonomy. *Annals of the Entomological Society of America*, 46: 84-94.
- Foldi, I.** 1990a. The scale cover. En: Rosen, D. (ed.) *Armored scale insects. Their biology, natural enemies and control*. Elsevier (ed.) Amsterdam. The Netherlands. 43-54 pp.
- Foldi, I.** 1990b. Moulting and scale-cover formation. In: Rosen, D. (ed.) *Armored scale insects. Their biology, natural enemies and control*. Elsevier (ed.) Amsterdam. The Netherlands. 257-265 pp.
- Forster, L.D. y Luck, R.F.** 1996. The role of natural enemies of California red scale in an IPM program in California citrus. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 504-507 pp. Sun City, South Africa.
- Furness, G.O., Buchanan, G.A., George, R.S. y Richardson, N.L.** 1983. A history of the biological and integrated control of red scale, *Aonidiella aurantii* on citrus in the lower Murray valley of Australia. *Entomophaga*, 28: 199-212.
- Gómez-Clemente, F. y Planes, S.** 1950. Ensayos de lucha natural o biológica contra los insectos nocivos a los agrios. *II Congreso Nacional de Ingeniería*, 1-10 pp. Madrid.
- Gómez-Clemente, F.** 1951-52. Insectos y ácaros parásitos de los "Citrus" en las comarcas españolas del mediterráneo. *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola*, 19: 197-220.
- Gómez-Menor, J.** 1937. *Cóccidos de España*. Instituto de Investigaciones Agronómicas. Estación de Fitopatología Agrícola de Almería, Madrid. 432 pp.
- Gonçalves, I., Soares, C. y Fernández, J.E.** 2002. A cochonilha pinta vermelha (*Aonidella aurantii* Maskell): resultados de estudos de prospecção e caracterização bioecológica. Pages 509-516 in *Proceedings Congresso Nacional de Citricultura de Portugal*.
- González-Regueral, F.** 1932. *Las cochinillas de los agrios y su tratamiento*. Estación de Fitopatología Agrícola de Levante, Burjassot (Valencia). 44 pp.

- Gottlieb, Y., Zchori-Fein, E., Faktor, O. y Rosen, D.** 1998. Phylogenetic analysis of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in the genus *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Insect Molecular Biology*, 7(4): 393-396.
- Grafton-Cardwell, E.E. y Vehrs, S.L.C.** 1995. Monitoring for organophosphate and carbamate-resistant armored scale (Homoptera: Diaspididae) in San Joaquin Valley. *Journal of Economic Entomology*, 88: 495-504.
- Guirrou, Z., El Kaoutari, I., Boumezzough, A., Chemseddine, M. y Hilal, A.** 2003. Contrôle des populations d'*Aonidiella aurantii* (Maskelle) en vergers d'agrumes au Maroc. *Fruits*, 58: 3-11.
- Godfray, H.C.J.** 1994. Parasitoids: Behavioral and evolutionary ecology. Monographs in behaviour and ecology. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 473 pp.
- Goubault, M., Fourier, J., Krespi, L., Poinso, D. y Cortesero, A.M.** 2004. Selection strategies of parasitized hosts in a generalist parasitoid depend on patch quality but also on host size. *Journal of Insect Behavior*, 17: 99-113.
- Gullan, P.J. y Kosztarab, M.** 1997. Adaptations in scale insects. *Annual Review of Entomology*, 42: 23-50.
- Habib, A., Salama, H.S. y Amin, A.H.** 1972. Population of *Aonidiella aurantii* on citrus varieties in relation to their physical and chemical characteristics. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 15: 324-328.
- Hagen, K.S.** 1964. Developmental stages of parasites. *Biological control of Insect Pests and Weeds* (ed. By P. DeBach), 168-246 pp.
- Hare, J.D., Yu, D.S. y Luck, R.F.** 1990. Variations in life history parameters of California red scale on different citrus cultivars. *Ecology*, 71(4): 1451-1460.
- Hare, J.D. y Luck, R.F.** 1991. Indirect effects of citrus cultivars on life history parameters of parasitic wasp. *Ecology*, 72: 1576-1585.
- Harvey, J.A., Poelman, E.H. y Tanaka, T.** 2013. Intrinsic inter-specific and intraspecific competition in parasitoid wasps. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 333-351.
- Heimpel, G.E. y Rosenheim, J.A.** 1995. Dynamic host feeding by the parasitoid *Aphytis melinus*: the balance between current and future reproduction. *Journal of Animal Ecology*, 64: 153-167.
- Heimpel, G.E., Rosenheim, J.A. y Kattari, D.** 1997. Adult feeding and lifetime reproductive success in the parasitoid *Aphytis melinus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 83: 305-315.

**Infante, F., Mumford, J., Baker, P., Barrera, J. y Fowler, S.** 2001. Inter-specific competition between *Cephalonomia stephanoderis* and *Prorops nasuta* (Hym., Bethyridae), parasitoids of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Col., Scolytidae). *Journal of applied Entomology*, 125: 63-70.

**Jacas, J.A., Urbaneja, A. y Viñuela, E.** 2006. History and future of introduction of exotic arthropod biological control agents in Spain: a dilemma?. *BioControl* 51: 1–30.

**Jacas, J.A. y Urbaneja, A.** 2010. Biological control in citrus in Spain: From classical to conservation biological control. En: Ciancio, A. y Mukerji, K.G. (eds.) *Integrated Management of Arthropod Pests and Insect Borne Diseases*. Springer, NL. Dordrecht, The Netherlands. 61-72 pp.

**Juan-Blasco, M., Verdú, M.J. y Urbaneja, A.** 2008. Depredación del piojo rojo de California, *Aonidiella aurantii* (Maskell), por fitoseidos depredadores. *Bol. San. Veg. Plagas*, 34: 187-200.

**Koteja, J.** 1990. Life history. En: Rosen, D. (ed.) *Armored scale insects. Their biology, natural enemies and control*. Elsevier (ed.) Amsterdam. The Netherlands. 243-254 pp.

**Leonardi, G.** 1920. *Monografia delle cocciniglie italiane. Opera Postuma*. Ed. Ernesto della Torre, Portici. 555 pp.

**Llorens-Climent, J.M.** 1990. *Homoptera I. Cochinillas de los cítricos y su control biológico*. Pisa Ediciones, Alicante. 260 pp.

**Llorens-Climent, J.M.** 1998. Métodos de lucha contra cóccidos. *Levante Agrícola*, 2º trimestre. 141-147 pp.

**Luck, R.F., Podoler, H. y Kfir, R.** 1982. Host selection and egg allocation behavior by *Aphytis melinus* and *Aphytis lingnanensis*: comparison of two facultatively gregarious parasitoids. *Ecological Entomology*, 7: 397-408.

**Luck, R.F., y Podoler, H.** 1985. Competitive exclusion of *Aphytis lingnanensis* by *Aphytis melinus*: Potential role of host size. *Ecology*, 66: 904-913.

**Luck, R.F. y Uygun, N.** 1986. Host recognition and selection by *Aphytis* species: Response to California red, oleander and cactus scale cover extracts. *Entomological Experimental Applied*, 40: 129-136.

**Luck, R.F., Jiang, G. y Houck, M.A.** 1999. A laboratory evaluation of the astigmatid mite *Hemisarcoptes cooremani* Thomas (Acari: Hemisarcoptidae) as a potential biological control agent for an armored scale, *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Homoptera: Diaspididae). *Biological Control*, 15: 173-183.

**Luck, R.F. y Nunney, L.P.** 1999. A Darwinian view of host selection and its practical applications. In: *Theoretical Approaches to Biological Control*, Hawkins, B.A., and Cornell, H.V. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, 283-303 pp.

**Luck, R.F.** 2006. Notes on the Evolution of Citrus Pest Management in California. *Proceedings of the California Conference on Biological Control*, 5: 1-7.

**Magdaraog, P.M., Tanaka, T. y Harvey, J.A.** 2013. Inter- and intra-specific host discrimination in gregarious and solitary endoparasitoid wasps. *Biocontrol*, 58: 745-754.

**Martínez-Ferrer, M.T., Grafton-Cardwell, E.E. y Shorey, H.H.** 2003. Disruption of parasitism of the California red scale (Homoptera: Diaspididae) by three ant species (Hymenoptera: Formicidae). *Biological Control*, 26: 279-286.

**Martínez-Hervás, M.A., Soto, A. y García-Marí, F.** 2005. Prospección de la eficacia de clorpirifos en poblaciones del cóccido *Aonidiella aurantii* (Homóptera: Diaspididae) en parcelas de cítricos de la Comunidad Valenciana. *Levante Agrícola*, 375: 176-182.

**Mayhew, P.J.** 1997. Fitness consequences of ovicide in a parasitoid wasp. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 84: 115-126.

**McKenzie, H.L.** 1938. The genus *Aonidiella* (Homoptera; Coccoidea; Diaspididae). *Microentomology*, 3: 1-36.

**McLaren, I.W.** 1971. A comparison of the population growth potential in California red scale, *Aonidiella aurantii* (Maskell), and yellow scale, *A. citrine* (Coquillet), on citrus. *Australian Journal of Zoology*, 19: 189-204.

**McLaren, I.W. y Buchanan, G.A.** 1973. Parasitism by *Aphytis chrysomphali* Mercet and *A. melinus* DeBach of California red scale, *Aonidiella aurantii* (Maskell), in relation to seasonal availability of suitable stages of the scale. *Australian Journal of Zoology*, 21: 111-117.

**McLaren, I.W.** 1976. *A behavioural study of Aphytis chrysomphali (Mercet) and Aphytis melinus DeBach (Hymenoptera: Aphelinidae) parasitic on California red scale, Aonidiella aurantii (Maskell) (Homoptera: Diaspididae)*. PhD Thesis. School of Biological Sciences. LaTrobe University. LaTrobe. 310 pp.

**McLaren, I.W.** 1978. Biological control of citrus scale pest. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 147-149 pp. Sidney. Australia.

**Mercet, R.G.** 1923. Lucha contra los insectos. *Catecismos del Agricultor y del Ganadero*. 128-129 pp, 1-64 pp.

**Moner, J.P.** 1994. Métodos de lucha contra cóccidos. *Levante Agrícola*, 2º trimestre. 122-129 pp.

- Moner, J.P.** 2000. Consideraciones sobre el control del piojo rojo de California, *Aonidiella aurantii* (Maskell). *Comunitat Valenciana Agraria*, 16: 16-19.
- Moreno, D.S. y Luck, R.F.** 1992. Augmentative releases of *Aphytis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae) to suppress California red scale (Homoptera: Diaspididae) in Southern California lemon orchards. *Journal of Economic Entomology*, 85: 1112-1119.
- Murdoch, W.W., Luck, R.F., Swarbrick, S.L., Walde, S. y Yu, D.S.** 1995. Regulation of an insect population under biological control. *Ecology*, 76: 206-217.
- Murdoch, W.W., Briggs, C.J. y Nisbet, R.M.** 1996. Competitive displacement and biological control in parasitoids: a model. *American Naturalist*, 148: 807-826.
- Murdoch, W.W., Swarbrick, S y Briggs, C.J.** 2006. Biological control: lessons from a study of California red scale. *Popul. Ecol.*, 48: 297-305.
- Nel, R.G.** 1933. A comparison of *Aonidiella aurantii* and *Aonidiella citrina*, including a study of the internal anatomy of the latter. *Hilgardia*, 7: 417-466.
- Netting, J.F. y Hunter, M.S.** 2000. Ovicide in the whitefly parasitoid, *Encarsia formosa*. *Animal Behaviour*, 60: 217-226.
- Ode, P.J. y Rosenheim, J.A.** 1998. Sex allocation and the evolutionary transition between solitary and gregarious parasitoid development. *The American Naturalist*, 152: 757-761.
- Palmer, J.M. y Mound, L.A.** 1990. Thysanoptera. In: *Armored scale insects. Their biology, natural enemies and control*, Rosen, D. (ed.), 67-97 pp. Elsevier, Oxford, New York, Tokio.
- Pekas, A., Aguilar, A., Tena, A. y Garcia-Marí, F.** 2010. Influence of host size on parasitism by *Aphytis chrysomphali* and *A. melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae) in Mediterranean populations of California red scale *Aonidiella aurantii* (Hemiptera: Diaspididae). *Biological Control*, 55: 132-140.
- Pekas, A.** 2011. Factors affecting the biological control of California red scale *Aonidiella aurantii* (Hemiptera: Diaspididae) by *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae) in eastern Spain citrus: host size, ant activity, and adult parasitoid food sources. PhD Thesis. Departamento de Ecosistemas Agroforestales. Universidad Politécnica de Valencia. 187 pp.
- Pekas, A., Tena, A., Aguilar, A. y Garcia-Marí, F.** 2011. The impact of canopy foraging ants on California red scale *Aonidiella aurantii* in a Mediterranean citrus orchard. *IOBC/WPRS Bulletin*, 62: 113-117.

**Perez-Lauchaud, G., Batchelor, T.P. y Hardy, I.C.W.** 2004. Wasp eat wasp: facultative hyperparasitism and intra-guild predation by bethylid wasps. *Biological control*, 30: 149-155.

**Pijls, J.W.A.M., Hofker, K.D., van Staalduinen, M.J. y van Alpen, J.J.M.** 1995. Interspecific host discrimination and competition in *Apoanagyrus (Epidinocarsis) lopezi* and *A. (E.) diversicornis*, parasitoids of the cassava mealybug *Phenacoccus manihoti*. *Ecological Entomology*, 20: 326-332.

**Pina, T., Martínez, B. y Verdú, M.J.** 2003. Field parasitoids of *Aonidiella aurantii* (Homoptera: Diaspididae) in Valencia (Spain). *IOBC/wprs Bulletin*, 26: 109-115.

**Pina, T.** 2007. Control biológico del piojo rojo de California *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae) y estrategias reproductivas de su principal enemigo natural *Aphytis chrysomphali* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae). PhD Thesis. Departament de Zoologia. Universitat de València. 404 pp.

**Pina, T. y Verdú, M.J.** 2007a. El piojo rojo de California, *Aonidiella aurantii* (Maskell), y sus parasitoides en cítricos de la Comunidad Valenciana. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas*, 33: 357-368.

**Pina, T. y Verdú, M.J.** 2007b. Establecimiento y dispersión de *Aphytis melinus* y *A. lingnanensis* (Hym.: Aphelinidae), dos parasitoides introducidos para el control de *Chrysomphalus dictyospermi* Morgan y *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hem.: Diaspididae) en cítricos de la Comunidad Valenciana. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas*, 33: 311-320.

**Podoler, H.** 1981. Effects of variable temperatures on responses of *Aphytis melinus* and *Aphytis lingnanensis* to host density. *Phytoparasitica*, 9: 179-190.

**Praloran, J.C.** 1971. *Les agrumes*. G. P. Maisonneuve & Larose. París. 565 pp.

**Quayle, H.J.** 1911. The red or orange scale. *University of California Publications*, 222: 99-150.

**Quayle, H.J.** 1932. *Biology and control of citrus insects and mites*. Berkeley (California), 542: 87.

**Quicke, D.L.J.** 1997. *Parasitic Wasps*. London: Chapman & Hall.

**Rao, S.V. y DeBach, P.** 1969. Experimental studies on hybridization and sexual isolation between some *Aphytis* species (Hymenoptera: Aphelinidae). Experimental hybridization and an interpretation of evolutionary relationships among the species. *Hilgardia*, 39: 515-553.

**Reeve, J.D.** 1987. Foraging behavior of *Aphytis melinus*: Effects of patch density and host size. *Ecology*, 68(3): 530-538.

- Ripollés, J.L.** 1990. Las cochinillas de los agrios. 4º Symposium Nacional de Agroquímicos. Sevilla 1990. *Levante Agrícola* 1er Trimestre, 37-45 pp.
- Ripollés, J.L., Marsá, M. y Martínez, M.** 1995. Desarrollo de un programa de control integrado de las plagas de los cítricos en las comarcas del Baix Ebre-Montsià. *Levante Agrícola*, 3er trimestre: 232- 248.
- Rodrigo, E. y Garcia-Marí, F.** 1990. Comparación del ciclo biológico de los diaspinos *Parlatoria pergandii*, *Aonidiella aurantii* y *Lepidosaphes beckii* (Homoptera, diaspididae) en cítricos. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas*, 16: 25-35.
- Rodrigo, E. y F. Garcia-Marí.** 1992. Ciclo biológico de los diaspinos de cítricos *Aonidiella aurantii* (Mask.), *Lepidosaphes beckii* (Newm.) y *Parlatoria pergandii* (Comst.) en 1990. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas*, 18: 31-44.
- Rodrigo, M.E.** 1993. Ciclo biológico comparado de *Aonidiella aurantii* (Mask.), *Lepidosaphes beckii* (Newm.) y *Parlatoria pergandii* Comst. (Homoptera: Diaspididae) y sus parasitoides. PhD Thesis, Universitat Politècnica de València. Valencia. 290 pp.
- Rodrigo, E. y Garcia-Marí, F.** 1994. Estudio de la abundancia y distribución de algunos cóccidos diaspididos de cítricos. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas*, 20: 151-164.
- Rodrigo, M.E., Garcia-Marí, F., Rodríguez-Reina, J.M. y Olmeda, T.** 2004. Colonization of growing fruit by the armored scales *Lepidosaphes beckii*, *Parlatoria pergandii* and *Aonidiella aurantii* (Hom.: Diaspididae). *Journal of Applied Entomology*, 128: 569-575.
- Rosen, D. y DeBach, P.** 1978. Diaspididae. In: *Introduced parasites and predators of arthropod pests and weeds: a world review*, Clausen, C. P. (ed.), 78-129 pp. U. S. Dept. Agr., Agr. Handbook No. 480, Washington D.C.
- Rosen, D. y DeBach, P.** 1979. Species of Aphytis of the world (Hymenoptera: Aphelinidae). Israel Universities Press, Jerusalem and W. Junk, The Hague. 801 pp.
- Rosen, D.** 1994. Fifteen years of *Aphytis* research - an update. In: *Advances in the Study of Aphytis*, Rosen, D. (ed). Intercept Ltd, Andover. 3-9 pp.
- Samways, M.J.** 1985. Relationship between red scale, *Aonidiella aurantii* and its natural enemies in the upper and lower parts of citrus trees in South Africa. *Bulletin of Entomological Research*, 75: 379-393.
- Siscaro, G. Longo, S. y Lizzio, S.** 1999. Ruolo degli entomofagi di *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Homoptera: Diaspididae) in agrumeti siciliani. *Phytophaga*, 9: 41-52.
- Smith, D., Beattie, G.A.C. y Broadley, R.** 1997. *Citrus pests and their natural enemies*. Department of Primary Industries, Queensland (Australia). 282 pp.

- Sorribas, J., Rodríguez, R., Rodrigo, E. y Garcia-Marí, F.** 2008. Niveles de parasitismo y especies de parasitoides del piojo rojo de California *Aonidiella aurantii* (Hemiptera: Diaspididae) en cítricos de la Comunidad Valenciana. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 34: 201-210.
- Sorribas, J. y Garcia-Marí, F.** 2010. Comparative efficacy of different combinations of natural enemies for the biological control of California red scale in citrus groves. *Biological Control*, 55: 42-48.
- Sorribas, J., Rodríguez, R. y Garcia-Marí, F.** 2010. Parasitoid competitive displacement and coexistence in citrus agroecosystems: linking species distribution with climate. *Ecological Applications*, 20: 1101-1113.
- Sorribas, J.** 2011. Biological control of California red scale, *Aonidiella aurantii* (Hemiptera: Diaspididae): spatial and temporal distribution of natural enemies, parasitism levels and climate effects. PhD Thesis. Departamento de Ecosistemas Agroforestales. Universidad Politécnica de Valencia. 196 pp.
- Strand, M.R. y Godfray, H.C.J.** 1989. Superparasitism and ovicide in parasitic Hymenoptera: theory and a case study of the ectoparasitoid *Bracon hebetor*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 24: 421-432.
- Suzuki, Y., Tsuji, H. y Sasakawa, M.** 1984. Sex allocation and effects of superparasitism on secondary sex ratios in the gregarious parasitoid, *Tricogramma chilonis* (Hymenoptera: Tricogrammatidae). *Animal Behaviour*, 32, 478-484.
- Talhok, A.S.** 1975. Las plagas de los cítricos en todo el mundo. In: *Los cítricos*, Ciba-Geigy ed., 21-27 pp. Basilea, Suiza.
- Tashiro, H. y Beavers, J.B.** 1968. Growth and development of California red scale *Aonidiella aurantii*. *Annals of the Entomological Society of America*, 61: 1009-1014.
- Tashiro, H. y Moffitt, C.** 1968. Reproduction in California red scale *Aonidiella aurantii*. 2. Mating behavior and postinsemination female changes. *Annals of the Entomological Society of America*, 61: 1014-1020.
- Tena, A., Kapranas, A., Garcia-Marí, F. y Luck, R.F.** 2008. Host discrimination, superparasitism and infanticide by a gregarious endoparasitoid. *Animal behaviour*, 76: 789-799.
- Tena, A. y Garcia-Marí, F.** 2011. Current situation of citrus pests and diseases in the Mediterranean Basin. *IOBC/WPRS Bulletin*, 60: 349-361.
- Tena, A., Catalán, J., Vanaclocha, P., Urbaneja, P., Jacas, J.A. y Urbaneja, A.** 2011. Evaluación de distintas estrategias de manejo químico del piojo rojo de California, *Aonidiella aurantii* (Maskell). *Levante Agrícola*, 404: 44-48.

**Tena, A., Pekas, A., Wäckers, F.L. y Urbaneja, A.** 2013. Parasitoids depend on non-host honeydew producers to cover their energetic needs. *Ecological Entomology* 38: 278-289.

**Turlings, T.C.J.** 1985. Why is there no interspecific host discrimination in two coexisting larval parasitoids of *Drosophilla* species; *Leptopilina heterotoma* (Thomson) and *Asobara tabida* (Nees). *Oecologia*, 67: 352-359.

**University of California (UC).** 1991. *Integrated pest management for citrus*. Division of Agriculture and Natural Resources. Oakland (CA). USA.

**Urbaneja, A., Ripollés, J.L., Abad, R., Calvo, J., Vanaclocha, P., Tortosa, D., Jacas, J.A. y Castañera, P.** 2005. Importancia de los artrópodos depredadores de insectos y ácaros en España. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas*, 31: 209-223.

**Urbaneja, A., Catalán, J., Tena, A., y Jacas, J.A.** 2014. Gestión integrada de plagas de cítricos. <http://www.gipcitricos.ivia.es>. Acceso 11 de Agosto de 2014.

**Vacas, S., Alfaro, C., Navarro-Llopis, V. y Primo, J.** 2009. The first account of the mating disruption technique for the control of California red scale, *Aonidiella aurantii* Maskell (Homoptera: Diaspididae) using new biodegradable dispensers. *Bulletin of Entomological Research*, 99: 415-423.

**Vacas, S., Alfaro, C., Navarro-Llopis, V. y Primo, J.** 2010. Mating disruption of California red scale, *Aonidiella aurantii* Maskell (Homoptera: Diaspididae), using biodegradable mesoporous pheromone dispensers. *Pest Management Science*, 66: 745-751.

**Vacas, S., Vanaclocha, P., Alfaro, C., Primo, J., Verdú, M.J., Urbaneja, A. y Navarro-Llopis, V.** 2012. Mating disruption for the control of *Aonidiella aurantii* Maskell (Hemiptera: Diaspididae) may contribute to increased effectiveness of natural enemies. *Pest Management Science*, 68(1): 142-148.

**Vanaclocha, P., A. Urbaneja, and M.J. Verdú.** 2009. Mortalidad natural del piojo rojo de California, *Aonidiella aurantii*, en cítricos de la Comunidad Valenciana y sus parasitoides asociados. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 35: 59-71.

**Vanaclocha, P.** 2012. Gestión integrada del piojo rojo de California, *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae): Mejora de su control biológico. Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural. Universitat Jaume I. 202 pp.

**Vanaclocha, P., Vacas, S., Alfaro, C., Primo, J., Verdú, M.J., Navarro-Llopis, V. y Urbaneja, A.** 2012. Life history parameters and scale cover surface area of *Aonidiella aurantii* are altered in a mating disruption environment: implications for biological control. *Pest Management Science*, 68: 1092-1097.

**van Alphen, J.J. y Visser, M.E.** 1990. Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 35: 59-79.

- van Baaren, J., Boivin, G. y Nenon, J.P.** 1994. Interspecific and interspecific host discrimination in two closely-related egg parasitoids. *Oecologia*, 100: 325-330.
- van Lenteren, J.C. y DeBach, P.** 1981. Host discrimination in three ectoparasitoids (*Aphytis coheni*, *A. lingnanensis* and *A. melinus*) of the oleander scale (*Aspidiotus nerii*). *Netherlands Journal of Zoology*, 31(3): 504-532.
- van Lenteren, J.C.** 1994. Oviposition behavior of *Aphytis* (Hymenoptera, Chalcidoidea, Aphelinidae) parasitoids of armored scale insects (Homoptera, Coccoidea, Diaspididae). In: *Advances in the Study of Aphytis*, Rosen, D. (ed.), 13-39 pp. Intercept Ltd, Andover.
- Vela, J., Verdú, M.J., Urbaneja, A. y Boyero, J.** 2007. Parasitoides de *Aonidiella aurantii* (Maskell) en plantaciones de cítricos en el sur de España. Proceedings V Congreso Nacional de Entomología Aplicada. Cartagena. Spain.
- Verdú, M.J. y Pina, T.** 2002. Control biológico del piojo rojo de California, *Aonidiella aurantii* (Mask.). *Phytoma* 140: 18–26.
- Viggiani, G.** 1984. Bionomics of the Aphelinidae. *Annual Review of Entomology*, 29: 257-276.
- Vinson, S.B.** 1976. Host selection by insect parasitoids. *Ann. Rev. Entomol.*, 21: 109-133.
- VVAA.** 1991. *Integrated pest management for citrus*. University of California. Publication 3303. 144 pp.
- Washington, J.R. y Walker, G.P.** 1990. Histological studies of California red scale (Homoptera: Diaspididae) feeding on citrus. *Annals of the Entomological Society of America*, 83: 939-948.
- Watson, J.R. y Berger, E.W.** 1932. Citrus insects and their control. *Florida Agricultural Experiment Station. Bulletin*, 67: 1-140.
- Willard, J.R.** 1972. Studies on rates of development and reproduction of California red scale, *Aonidiella aurantii* (Mask.) (Homoptera: Diaspididae) on citrus. *Australian Journal of Zoology*, 20: 37-47.
- Willard, J.R.** 1973. Wandering time of the crawlers of California red scale, *Aonidiella aurantii* (Mask.) (Homoptera: Diaspididae), on citrus. *Australian Journal of Zoology*, 21: 217-229.
- Xu, H.Y., Yang, N.W. y Wan, F.H.** 2013. Competitive interactions between parasitoids provide new insight into host suppression. *Plosone*, 8(11): e82003.
- Yu, D.S.** 1986. The interactions between California red scale *Aonidiella aurantii* (Maskell), and its parasitoids in citrus groves of inland southern California. PhD Thesis. University of California, Riverside.