

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

PROGRAMA DE DOCTORADO EN RECURSOS Y TECNOLOGÍAS
AGRARIAS, AGROAMBIENTALES Y ALIMENTARIAS



**ACEITES ESENCIALES DE ORIGEN BOTÁNICO
COMO INSECTICIDAS Y REPELENTES EN
PULGONES DE CULTIVOS HORTÍCOLAS**

2022

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Manuel Cantó Tejero

Directora:

Dra. Dña. María Jesús Pascual Villalobos

Codirector:

Dr. D. Pedro Luis Guirao Moya



La presente Tesis Doctoral, titulada “Aceites esenciales de origen botánico como insecticidas y repelentes en pulgones de cultivos hortícolas”, se presenta bajo la modalidad de **Tesis por compendio** de las siguientes **publicaciones**:

- **Cantó-Tejero, M.**, Casas, J. L., Marcos-García, M. A., Pascual-Villalobos, M. J., Florencio-Ortiz, V., Guirao, P. (2022). Essential oils-based repellents for the management of *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*. *Journal of Pest Science*, 95(1): 365-379. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01380-5>

- **Cantó-Tejero, M.**, Guirao, P., Pascual-Villalobos, M. J. (2022). Aphicidal activity of farnesol against the green peach aphid–*Myzus persicae*. *Pest Management Science*, 78(6):2714-2721. <https://doi.org/10.1002/ps.6902>

- **Cantó-Tejero, M.**, Pascual-Villalobos, M. J., Guirao, P. (2022). Aniseed essential oil botanical insecticides for the management of the currant-lettuce aphid. *Industrial Crops and Products*, 181: 114804. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114804>



Dña. María Jesús Pascual Villalobos, Dra. Ingeniera Agrónoma y Profesora de investigación en el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental,

D. Pedro Luis Guirao Moya, Dr. Ingeniero Agrónomo y Profesor titular de universidad del departamento de Producción Vegetal y Microbiología de la Universidad Miguel Hernández,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral Titulada “**Aceites esenciales de origen botánico como insecticidas y repelentes en pulgones de cultivos hortícolas**” de la que es autor el graduado en Ingeniería Agroambiental y Agroalimentaria, D. Manuel Cantó Tejero, ha sido realizada bajo nuestra dirección y autorizamos a que sea presentada para optar a la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández.

Y para que conste a los efectos oportunos se firma el presente certificado en Orihuela a 7 de julio de 2022.

Firmado:

Directora de la tesis

Dra. Dña. *María Jesús Pascual Villalobos*

Codirector de la tesis

Dr. D. *Pedro Luis Guirao Moya*

Dr. Dña. Juana Fernández López, Catedrática de Universidad y Coordinadora del Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias (Retos-AAA) de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH),

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Aceites esenciales de origen botánico como insecticidas y repelentes en pulgones de cultivos hortícolas**“ de la que es autor el graduado en Ingeniería Agroambiental y Agroalimentaria **D. Manuel Cantó Tejero**, ha sido realizada bajo la dirección de la **Dra. María Jesús Pascual Villalobos** y la codirección del **Dr. Pedro Luis Guirao Moya**, actuando como tutora de la misma la Dra. María José Frutos Fernández. Considero que la Tesis es conforme, en cuanto a forma y contenido, a los requerimientos del Programa de Doctorado ReTos-AAA, siendo por tanto apta para su exposición y defensa pública.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Orihuela a 7 de julio de 2022.

Dra. Dña. Juana Fernández López
Coordinadora del Programa Doctorado ReTos-AAA

Coordinadora: Dra. Juana Fernández López

Esta Tesis doctoral ha sido financiada por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Manuel Cantó Tejero ha sido financiado por una beca de formación de personal investigador (FPI) con número de referencia FPI-INIA CPD2016-0092 enmarcada dentro del proyecto RTA2014-0001 titulado "Nanotecnología aplicada a la formulación de aceites esenciales para el control de pulgón en cultivos hortícolas" financiado también por el INIA. Parte del trabajo desarrollado en esta Tesis también se ha realizado dentro del proyecto de investigación RTA2017-0001 "Optimización de nanoemulsiones de insecticidas de origen botánico"





A mis padres, Manolo y Gracia

Agradecimientos

Quisiera agradecer a mis directores de tesis, la Dra. María Jesús Pascual Villalobos y el Dr. Pedro Guirao Moya sus consejos, por la supervisión que han realizado, todo lo que me han enseñado y la confianza que han depositado en mí a lo largo de todo este tiempo. He tenido mucha suerte de poder haber trabajado con Pedro desde el momento que empecé con mi trabajo fin de grado. He aprendido mucho a lo largo de todos estos años, descubriéndome mi pasión por la entomología y enseñándome a cuestionar siempre el trabajo realizado con el fin de mejorar. Sin duda, la calidad que pueda tener este trabajo se debe a su labor en mi formación profesional y le estoy muy agradecido por ello.

También quiero agradecer a la Dra. María Ángeles Marcos y el Dr. José Luis Casas permitirme realizar una estancia y poder trabajar con ellos en el CIBIO, me sentí acogido desde el primer momento y fue una experiencia muy enriquecedora. Y también agradecer a la Dra. Victoria Florencio por toda la ayuda y apoyo que me dio durante mi periodo en el CIBIO, que hizo más amenos los largos ratos en el laboratorio.

Quiero agradecer al departamento de Protección de cultivos y al IMIDA por el buen trato que he tenido desde el principio, a Mari Carmen por la paciencia que tuvo al principio, al Dr. Alfredo Lacasa por sus sabios consejos y su ayuda, a Carlos y otros muchos más que han hecho que tenga un ambiente de trabajo tan agradable. En cuanto a mi equipo de trabajo quiero agradecer a Félix por el buen rollo que hemos tenido en el laboratorio, que ha hecho que el tiempo en el trabajo sea más divertido y menos solitario. A Miguel por la ayuda que me ha ofrecido en ciertos momentos del trabajo de la tesis cuando se ha requerido.

Esta tesis está dedicada a mis padres Manolo y Gracia, gracias por la educación y valores que me habéis enseñado, y a mi hermana Azahara por haberme apoyado siempre. Estar aquí es en gran parte, gracias a vosotros.

Y por último quiero agradecer a Carmen todo el apoyo que me has dado estos años y haberme alegrado los peores días y ayudarme a afrontar las nuevas etapas que vendrán. Que suerte habernos encontrado y haber formado nuestra familia. Sin duda alguna María y tu sois lo mejor que me llevo de toda esta experiencia.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. El Campo de Cartagena	2
1.1.1. Situación geográfica, características y clima.....	2
1.1.2. La agricultura del Campo de Cartagena	3
1.2. El cultivo del pimiento (<i>Capsicum anuum</i> Linnaeus)	3
1.2.1. Plagas y enfermedades del cultivo del pimiento	5
1.2.2. Evolución del control de plagas en los invernaderos de pimiento	8
1.3. El cultivo de la lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.).....	9
1.3.1 Plagas y enfermedades de la lechuga	11
1.4. Los pulgones como plagas agrícolas	12
1.4.1. <i>Myzus persicae</i>	13
1.4.2. <i>Nasonovia ribisnigri</i>	15
1.5. Insumos de origen vegetal para el control de plagas.....	17
1.5.1. Extractos naturales.....	18
1.5.2. Aceites esenciales	19
2. Objetivos.....	25
2.1. Objetivo general	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. Materiales y métodos generales.....	27
3.1. Insectos	28
3.2. Material Vegetal	29
3.3. Aceites esenciales y compuestos puros	31
3.4. Preparación de nanoemulsiones	33
3.5. Ensayos de laboratorio	34
3.5.1. Estudio del comportamiento.....	34
3.5.2. Efecto insecticida en pulgones	36

3.5.3. Efecto residual en enemigos naturales.....	37
3.6. Ensayos de semicampo	38
3.7. Ensayos de campo	40
3.8. Análisis estadísticos.....	42
4. Publicaciones	44
4.1. Publicación 1	45
4.2. Publicación 2	78
4.3. Publicación 3	99
5. Resultados generales y discusión	121
5.1. Repelencia de aceites esenciales en pulgones y enemigos naturales.....	122
5.2. Efectos insecticidas de aceites esenciales en pulgón y toxicidad residual en enemigos naturales.	124
5.3. Optimización de las aplicaciones con nanoemulsiones de aceites esenciales en cultivos de pimiento y lechuga (en semicampo y campo).....	127
5.4. Investigaciones futuras	132
6. Conclusiones.....	134
7. Referencias bibliográficas	137

Resumen

Los pulgones son una de las plagas agrícolas que producen grandes pérdidas económicas sobre los cultivos en el mundo. El Campo de Cartagena es una de las principales zonas agrícolas de la Región de Murcia en la que destaca el cultivo del pimiento (*Capsicum annuum* Linnaeus) bajo invernadero. Entre la gran variedad de cultivos que se dan en la zona también destaca la lechuga (*Lactuca sativa* Linnaeus), siendo Murcia una de las principales zonas de producción de Europa. Los pulgones (Hemiptera: Aphididae) son una plaga importante que afectan a estos cultivos, en concreto, *Myzus persicae* (Sulzer) y *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) son especies que afectan de forma importante al cultivo del pimiento y *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) la principal especie de pulgón que afecta al cultivo de la lechuga. Además, los pulgones son vectores de virus, en concreto *M. persicae* transmite el virus del mosaico del pepino (CMV) en pimiento y *N. ribisnigri* el virus del enrollamiento necrótico de la hoja de la lechuga en la lechuga (LNLCV). Estas especies tienen en común que poseen un gran potencial biótico, lo que hace que desarrollen grandes poblaciones en cortos periodos de tiempo. Ambos cultivos se desarrollan sobre sistemas de producción totalmente diferentes, y por lo tanto en el control de plagas también ocurre lo mismo. En el cultivo del pimiento en invernadero el control se realiza mediante la Gestión Integrada de Plagas en la que el control biológico (parasitoides y depredadores) son fundamentales, sin embargo, para el control de *M. persicae* es necesario complementarlo con tratamientos fitosanitarios en momentos puntuales en los que los enemigos naturales (principalmente *Aphidius colemani* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) no son capaces de controlarlos. En cambio, en el cultivo de la lechuga no es posible monitorizar con exactitud las plagas que aparecen en el cultivo, por lo que muchas veces los tratamientos se realizan según calendarios. Además, las especies de pulgones citadas anteriormente han generado resistencias a un gran número de materias activas y cada vez el número de productos fitosanitarios autorizados es menor debido a las restricciones o incompatibilidades con la fauna auxiliar y por requisitos legales de las cadenas de distribución de alimentos europeas.

En esta Tesis doctoral se han estudiado los efectos tóxicos y/o repelentes de una serie de aceites esenciales procedentes de plantas y compuestos puros sobre los pulgones *M. persicae*, *M. euphorbiae* y *N. ribisnigri*. Inicialmente se evaluó la repelencia de 8 aceites esenciales y 12 compuestos puros mediante un bioensayo de elección (inhibición

del asentamiento) sobre *M. persicae* y *M. euphorbiae*. Los aceites esenciales de anís (*Pimpinella anisum* Linnaeus), albahaca (*Ocimum basilicum* Linnaeus) y cymbopogon (*Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) W. Watson) ($DR_{50} = 0,039 - 0,184 \mu\text{L}/\text{cm}^2$) y los compuestos puros (*E*)-anetol, geraniol, farnesol y (*Z*)-jasmona ($DR_{50} = 0,011 - 0,086 \mu\text{L}/\text{cm}^2$) resultaron los más activos inhibiendo el asentamiento de los pulgones.

También se evaluó el efecto tóxico que se produce sobre *M. persicae* mediante un bioensayo diseñado para evaluar el efecto por contacto de los aceites (en formulaciones acuosas) en condiciones de laboratorio. El aceite esencial de anís, geraniol, (*Z*)-jasmona y farnesol a la dosis de 0,6 % (v/v) fueron los más tóxicos (> 50 % de mortalidad), siendo el farnesol el más activo de todos (93,67 % de mortalidad).

Del estudio realizado en condiciones de laboratorio se seleccionaron el aceite esencial de anís y su compuesto mayoritario el (*E*)-anetol y los compuestos puros geraniol farnesol y (*Z*)-jasmona como los más activos y se estudió su efecto al aplicarlos en pulverización sobre plantas de pimiento inoculadas con *M. persicae* y *M. euphorbiae*. Para ello se formularon los aceites esenciales y compuestos puros como nanoemulsiones con un rotor IKA-Labor Pilot de dispersión (7940 rpm durante 10 minutos) utilizando Tween80 como surfactante (1:2).

Las aplicaciones foliares de nanoemulsiones de farnesol o farnesol + (*E*)-anetol (1:1) al 0,2 % (v/v) sobre plantas de pimiento colonizadas por *M. persicae* o *M. euphorbiae* redujeron las poblaciones de pulgón a los 2 días después del tratamiento con eficacias superiores al 50 %, mientras que las aplicaciones de nanoemulsiones de anís y (*E*)-anetol al 0,4 % (v/v) sobre plantas de lechuga redujeron las poblaciones de *N. ribisnigri* a los 2 días después del tratamiento con eficacias superiores al 50 %.

También se estudió el efecto que producían los volátiles del (*E*)-anetol, (*Z*)-jasmona y farnesol sobre los pulgones *M. persicae* y *M. euphorbiae* y sus enemigos naturales *A. colemani* y *Sphaerophoria rueppellii* (Wiedemann) (Diptera: Syrphidae) mediante ensayos de olfatometría de 2 vías. El farnesol a la dosis de 10 μL fue repelente frente a los pulgones y atrayente para los enemigos naturales. También se evaluó si estos compuestos puros producían un efecto tóxico sobre los enemigos naturales mediante un ensayo de toxicidad residual, mostrando una ligera toxicidad frente a *S. rueppellii* (<20%).

A continuación, se evaluaron las nanoemulsiones de anís, (*E*)-anetol y farnesol en condiciones de semicampo y campo en invernaderos de pimiento y lechuga al aire libre durante varios años. Las aplicaciones foliares de nanoemulsiones de farnesol al 0,4 % (v/v) en condiciones de campo causó una gran reducción en las poblaciones de pulgón, con eficacias de hasta el 70-80 % con respecto del control, similar o incluso mayor a las eficacias del insecticida de referencia a base de piretrinas. Las nanoemulsiones de anís o (*E*)-anetol produjeron una mortalidad menor que el farnesol, y resultaron fitotóxicas para las plantas de pimiento. En cambio, las aplicaciones de nanoemulsiones de anís y (*E*)-anetol en semicampo redujeron las poblaciones de *N. ribisnigri* (con eficacias de tratamiento de hasta un 40–50 %), mientras que en campo, freno el desarrollo de las poblaciones de pulgón sin producir ningún efecto fitotóxico sobre el cultivo y siendo compatible con el control biológico ejercido por sírfidos y mariquitas de manera natural.

En esta Tesis doctoral, se han identificado varios aceites esenciales y compuestos puros de origen vegetal con propiedades repelentes y/o insecticidas contra los pulgones, seguido de su formulación y aplicación en cultivos de pimiento y lechuga en campo. Las formulaciones de farnesol son prometedoras para el control del pulgón en los invernaderos de pimiento (debido a que son tóxicas para los pulgones y compatibles con algunos de sus enemigos naturales). De igual forma las formulaciones a base anís y (*E*)-anetol, también pueden ayudar a complementar el control de *N. ribisnigri* en lechuga. Sin embargo, todavía es necesario mejorar y optimizar la formulación de estos bioactivos para su uso en la agricultura.

Abstract

Aphids are one of the major agricultural pests that cause important economic losses on crops in the world. Campo de Cartagena is one of the main agricultural areas in Murcia, where pepper (*Capsicum annuum* Linnaeus) greenhouse crops are one of the most important. Among other crops that grow in the area, lettuce (*Lactuca sativa* Linnaeus) is also important, whereas Murcia is one of the main lettuce production areas in Europe. Aphids (Hemiptera: Aphididae) are an important pest that affects these crops, specifically, *Myzus persicae* (Sulzer) and *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) are the main species that affect pepper crops and *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) the main species of lettuce crops. Furthermore, *M. persicae* transmits the Cucumber mosaic virus (CMV) in pepper and *N. ribisnigri* the Lettuce necrotic leaf curl virus (LNLCV). These species have great biotic potential and are able to develop large populations in a short time difficulting their control. Pepper and lettuce crops are grown differently, and their pest control is also different. In pepper greenhouse, aphid control is carried out using Integrated Pest Management strategies combining biological control (parasitoids and predators) and synthetic pesticides. On the other hand, in the lettuce, it is not possible to observe all the pests that appear in the crop, and chemical treatments are usually applied preventively. In addition, the aphid species mentioned above have generated resistance to many insecticides and the number of authorized products is decreasing due to restrictions or incompatibilities with natural enemies by legal requirements of the European food distribution chains.

In this doctoral thesis, were studied the toxic and/or repellent effects of various essential oils from plants and pure compounds on the aphids *M. persicae*, *M. euphorbiae* and *N. ribisnigri*. Initially, the repellency of 8 essential oils and 12 pure compounds were evaluated using a choice bioassay (settling inhibition) on *M. persicae* and *M. euphorbiae*. The essential oils of anise (*Pimpinella anisum* Linnaeus), basil (*Ocimum basilicum* Linnaeus) and lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) W. Watson) ($DR_{50} = 0.039 - 0.184 \mu\text{L}/\text{cm}^2$) and the pure compounds (*E*)-anethole, geraniol, farnesol and (*Z*)-jasnone ($DR_{50} = 0.011 - 0.086 \mu\text{L}/\text{cm}^2$) were the most active inhibiting the settlement of aphids.

Also, the toxic effect produced by essential oils was evaluated on *M. persicae* using a new bioassay designed to evaluate the contact effect of essential oils (in aqueous formulations) under laboratory conditions. The essential oil of anise, geraniol, (*Z*)-

jasmone and farnesol at a dose of 0.6% (v/v) were the most toxic (> 50% mortality) on *M. persicae*, where farnesol was the most active (93.67% mortality).

From the laboratory experiments, the essential oil of anise and its main compound, (*E*)-anethole, and the pure compounds geraniol, farnesol and (*Z*)-jasmone were selected as the most active, and their effect was studied when applied as a spray on pepper plants inoculated with *M. persicae* and *M. euphorbiae*. For this, the essential oils and pure compounds were formulated as nanoemulsions with an IKA-Labor Pilot dispersion rotor (7940 rpm for 10 minutes) using Tween80 as a surfactant (1:2).

Foliar applications of nanoemulsions of farnesol or farnesol + (*E*)-anethol (1:1) at 0.2% (v/v) on pepper plants reduced aphid populations (*M. persicae* or *M. euphorbiae*) at 2 days post-treatment with efficacies over the 50%, while the applications of nanoemulsions of anise and (*E*)-anethole at 0.4% (v/v) on lettuce plants reduced the populations of *N. ribisnigri* (efficacies over 50 %) at 2 days post-treatment.

The effect of (*E*)-anethole, (*Z*)-jasmone and farnesol volatiles were studied on the aphids *M. persicae* and *M. euphorbiae* and their natural enemies *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae) and *Sphaerophoria rueppellii* (Wiedemann) (Diptera: Syrphidae) using a two-way olfactometer. Farnesol at a dose of 10 µL was repellent against aphids and attractive to natural enemies. Whether these pure compounds produced a toxic effect on natural enemies was also evaluated by a residual toxicity test, showing slight toxicity against *S. rueppellii* (<20%).

Nanoemulsions of anise, (*E*)-anethole and farnesol were evaluated under semi-field and field conditions in pepper greenhouses and lettuce open-air crops for several years. Foliar applications of nanoemulsions of farnesol at 0.4% (v/v) under field conditions caused a great reduction in aphid populations, with efficacies of 70-80% with respect to the control, similar or even greater than the efficacies of the reference insecticide based on pyrethrins. Anise or (*E*)-anethole nanoemulsions produced lower mortality than farnesol and were phytotoxic to pepper plants. On the other hand, the applications of nanoemulsions of anise and (*E*)-anethol in semi-field experiments reduced the populations of *N. ribisnigri* (with efficacies of 40–50%), while in the field, the treatments stopped the development of *N. ribisnigri* populations without any phytotoxic effect on the crop and proved to be compatible with syrphids and ladybirds.

In this doctoral thesis, essential oils and pure compounds from plants with repellent and/or insecticidal effects against aphids have been identified, and their formulations have been applied to pepper and lettuce crops in the field. Farnesol formulations are promising for aphid control in pepper greenhouses (because are toxic to aphids and compatible with some of their natural enemies). On the other hand, the use of aniseed and (*E*)-anethole formulations combined with other tools is a good option to manage *N. ribisnigri* in lettuce crops in the future. However, these formulations need to be improved for use in agriculture.





1. Introducción

1.1. El Campo de Cartagena

1.1.1. Situación geográfica, características y clima

El Campo de Cartagena es una de las 6 comarcas que componen la Región de Murcia (Figura 1) con una extensión de 1.698 km², de los cuales el 80% es una planicie y el resto es montañoso (Romero y Belmonte, 2011).

El clima es de tipo mediterráneo semiárido. La temperatura media anual es de 16-18 °C, mientras que las medias de las máximas son de 38-42 °C. La pluviometría es escasa (inferior a 300 mm) e irregular entre años, siendo cada vez más frecuente la alternancia entre largos periodos de sequía con lluvias torrenciales (Romero y Belmonte, 2011). Los suelos más abundantes son de tipo calcisol háplico y calcisol pétrico (FAO, 1998), de tipo franco-arcilloso-limoso y franco-limoso (Lacasa et al., 2018).

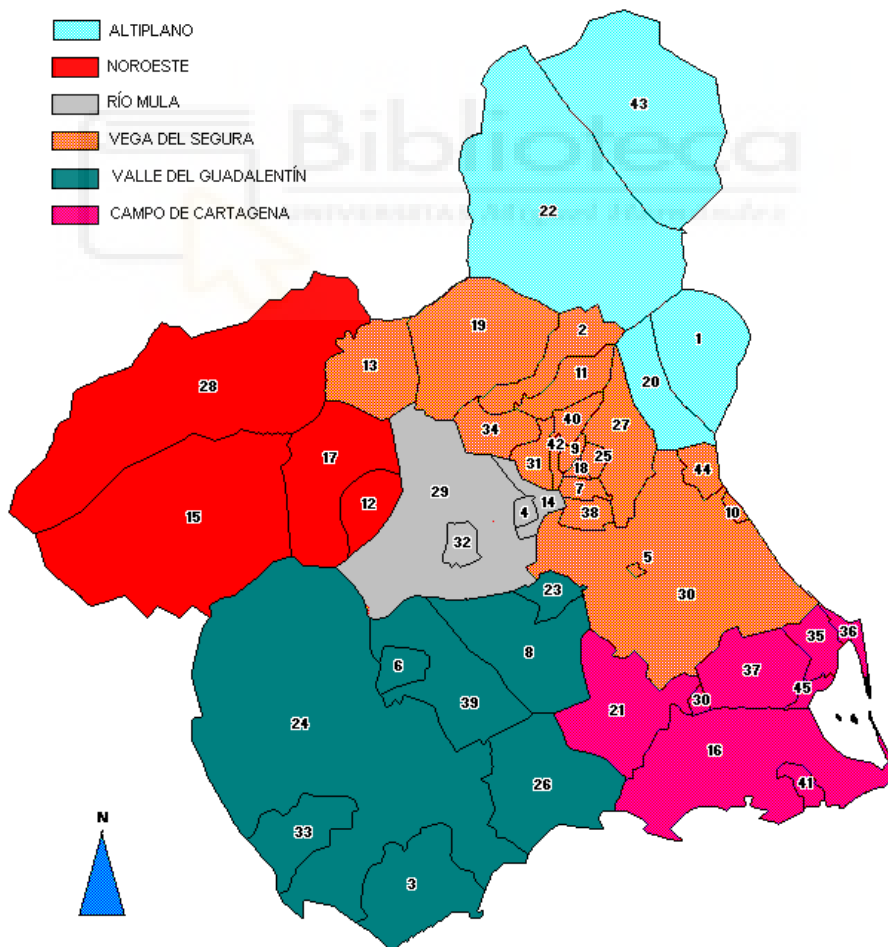


Figura 1. Distribución de las comarcas agrarias que componen la Región de Murcia (C.A.R.M., 2021).

1.1.2. La agricultura del Campo de Cartagena

Su localización y características climáticas permiten que se pueda desarrollar la actividad agrícola durante prácticamente todo el año. Sin embargo, presenta un déficit hídrico, y sin la llegada del trasvase Tajo-Segura no habría sido posible desarrollar el sistema productivo que hay hoy en día. Antes de la llegada del trasvase la superficie de secano era más del doble de la de regadío. En el año 2020, en el Campo de Cartagena, la superficie de regadío (24.809 ha) es mayor a la de secano (6.645 ha). Mientras que en toda la Región de Murcia ambas superficies son similares, algo más de 150.000 ha cada una. Destacan las comarcas del Valle del Guadalentín y Campo de Cartagena como las de mayores zonas de regadío, mientras que la mayor superficie de secano se encuentra en la comarca del Noroeste (C.A.R.M., 2021).

La llegada de agua ha permitido desarrollar una agricultura de precisión y muy tecnificada, en la que el riego localizado y el cultivo bajo invernadero tienen un gran peso. En especial ha destacado el cultivo del pimiento, produciéndose la mayor parte de la producción murciana en esta comarca (95 % en 2020). Los principales cultivos hortícolas que se desarrollan en el Campo de Cartagena son el pimiento (1.152 ha), el melón (3.400 ha), la lechuga (3.291 ha), alcachofa (1.966 ha) y brasicas (1.833 ha) (C.A.R.M., 2021). Estos cultivos tienen una gran importancia económica para la agricultura murciana, repartiéndose gran parte de la producción entre las comarcas del Campo de Cartagena y el Valle del Guadalentín. En 2016, la producción de cucurbitáceas fue de 117 M€, el pimiento fue de 90 M€, mientras que las brasicas y alcachofas fue de alrededor de 80 M€ y la lechuga de 59 M€. Cabe destacar el cultivo del tomate que es el que ocupa más extensión en invernadero y generó 216 M€ en 2016 (aunque casi toda su producción se limita prácticamente al Valle del Guadalentín) (FECOAM, 2016; en Lacasa et al., 2018).

1.2. El cultivo del pimiento (*Capsicum annuum* Linnaeus)

El pimiento (*Capsicum annuum*) es una planta que pertenece a la familia de las solanáceas procedente de Centroamérica. Actualmente se encuentra distribuido prácticamente por todo el mundo (EPPO database, 2021).

España es el principal productor de pimiento de la Unión Europea (FAOESTAT, 2021). El cultivo se desarrolla tanto al aire libre como en invernadero. Las principales zonas de producción de este cultivo son Almería (13.718 ha) seguido de Murcia (1.531

ha), representando ambas el 80% de la producción nacional (M.A.P.A., 2021). En la Región de Murcia su cultivo se realiza en la comarca del Campo de Cartagena, que fue una zona con una gran tradición de pimiento para pimentón. Actualmente el pimiento para pimentón se cultiva principalmente en la zona del Valle del Guadalentín (478 ha) seguido por el Campo de Cartagena (50 ha). Ahora en el Campo de Cartagena se cultivan variedades de pimiento de carne gruesa se en invernaderos de tipo multitúnel o parral (Figura 2) (95 % de la superficie de cultivo) desarrollándose casi su totalidad en el Campo de Cartagena (1.531 ha), (C.A.R.M., 2021). El pimiento se cultiva entre mediados de noviembre-diciembre (plantación) hasta agosto-septiembre con un marco de plantación de 1 x 0,4 m con riego localizado. El control de plagas y enfermedades se realiza bajo un plan de gestión integrada, que consiste en la aplicación conjunta de medidas biológicas, biotecnológicas, químicas y prácticas de cultivo que reducen al mínimo necesario la utilización de productos fitosanitarios (Coscollá, 2004). De todas estas medidas el uso del control biológico es el que más peso tiene, siendo la producción de pimiento murciano una referencia en el éxito del control integrado de plagas. El manejo actual del cultivo se desarrolló en torno a la virosis del Bronceado del tomate (Tomato spotted wilt virus, TSWV), y su vector, el trips *Frankiniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), que fue uno de los factores más limitantes desde que apareció en 1988 junto a la aparición como plaga de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) algo después (Lacasa, 2021).



Figura 2. Invernadero de pimiento tipo parral en el Campo de Cartagena.

1.2.1. Plagas y enfermedades del cultivo del pimiento

El pimiento se cultiva de forma intensiva en los invernaderos, que permite obtener un mayor rendimiento del cultivo durante un mayor tiempo del año. Sin embargo, estas estructuras de protección del cultivo también favorecen el desarrollo y la propagación de diferentes insectos plaga, y enfermedades, que en ocasiones no podrían desarrollarse adecuadamente en ciertas épocas del año sin esos sistemas de cultivos.

Las principales plagas del cultivo del pimiento son los trips, moscas blancas, pulgones y los ácaros tetránquidos. De cada una de las plagas mencionadas anteriormente hay una serie de especies muy polífagas que están presentes en todas las zonas productoras de pimiento nacionales. Sin embargo, en ocasiones ciertas especies tan solo ocasionan problemas en zonas puntuales, como ocurre entre los invernaderos de pimiento del Campo de Cartagena y de Almería.

Existen otras plagas secundarias que aparecen de forma esporádica en alguna campaña que pueden causar importantes daños en momentos determinados como son *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae), *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) y *Nezara viridula* (Linnaeus) (Hemiptera: Pentatomidae) (La-Spina, 2014; Montserrat, 2012; Condés Rodríguez, 2017).

Trips (Thysanoptera: Thripidae). Existen varias especies de trips que pueden afectar al cultivo del pimiento como son *Frankiniella occidentalis* (Pergande), *Trips tabaci* Lindeman o *Echinothrips americanus* Morgan entre otros (Lacasa y Llorens, 1996). Sin embargo, la que tiene mayor importancia es *F. occidentalis* debido a que es vector del virus del Bronceado del tomate (TSWV). Este trips transmite el TSWV en la forma persistente, pues solo la larva (1-2 estados iniciales) adquiere el virus cuando se alimenta de una planta virulenta. Desarrolla grandes poblaciones (produciéndose múltiples generaciones anuales) y se extiende con gran facilidad gracias al amplio rango de hospedantes que posee tanto el insecto como la virosis del TSWV. Su control químico es complicado debido a que ha generado resistencias a un gran número de materias activas de distintos grupos entre los que se incluyen organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides y espinosinas (Bielza, 2008).

Moscas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae). Principalmente hay dos especies que afectan al pimiento: *Trialeurodes vaporariorum* Westwood y *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Guirao, 2002). La especie que causa mayores daños en los invernaderos de pimiento es *B. tabaci* (Montserrat, 2012). Sus daños se deben principalmente a los derivados de su alimentación causando amarillos y sobre la melaza que secretan como residuo de su alimentación se desarrollan hongos que reducen la capacidad fotosintética y deprecian el valor comercial de los frutos (Calvo et al., 2009). En zonas templadas como la que se ocupa en este trabajo pueden desarrollarse entre 11-15 generaciones anuales, produciéndose explosiones demográficas en los meses más cálidos (Guirao, 2002). Al igual que ha ocurrido con los trips, su control químico es complicado debido a que ha desarrollado resistencias a numerosos insecticidas convencionales (Palumbo et al., 2001; IRAC, 2022).

Pulgones (Hemiptera: Aphididae). Los pulgones son una plaga importante del cultivo, sin embargo, su incidencia es variable entre diversos años, aunque siempre está presente. Las principales especies de pulgones que afectan al cultivo del pimiento son *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis gossypii* Glover, *Aphis nasturtii* Kalténbach, *Aulacorthum solani* (Kalténbach), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Blackman y Eastop, 2000). Aunque en la región Paleártica se han citado 12 especies de pulgón diferentes sobre este cultivo (Holman, 2009). La principal especie de pulgón que afecta al cultivo del pimiento en el Campo de Cartagena es *Myzus persicae* (Sánchez et al., 2011).

Los daños que producen se deben principalmente a su alimentación, debilitando la planta, y la sustancia de residuo que se deriva de esta, la melaza, sobre la que se desarrollan hongos que reducen la capacidad fotosintética de la planta y deprecian el valor comercial de los frutos. Los pulgones presentan un gran potencial biótico y se desarrollan rápidamente grandes poblaciones que causan grandes daños en el cultivo. Además, los pulgones son vectores de virus muy eficientes (de tipo persistente y no persistente) (Blackman y Eastop, 2017). En el pimiento destacan *Myzus persicae* y *Aphis gossypii* por transmitir virosis como el virus de las venas amarillas o el CMV entre otros, aunque los principales daños ocurren en cultivos al aire libre.

Antes del uso de sistemas de gestión integrada de plagas, el control de pulgones se realizaba mediante tratamientos químicos. Debido a la aparición de resistencias y el desuso de muchas materias activas debido a su prohibición por sus efectos tóxicos o incompatibilidades con los insectos beneficiosos ha dado lugar a que su control se realice

principalmente mediante el parasitoide *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae), siendo necesario realizar tratamientos fitosanitarios en momentos puntuales.

Ácaros (Acari: Tetranychidae). La principal especie de araña roja que está presente en nuestra zona es *Tetranychus urticae* Koch (Sánchez et al., 1995). Los daños que produce se deben a su alimentación, palideciendo las hojas, provocando amarillos e incluso provocando defoliaciones. También sus telarañas cubren las plantas y reducen su capacidad fotosintética (Condés Rodríguez, 2017). Este insecto aparece en las últimas fases del cultivo (a partir de julio), pues requiere de temperaturas altas para su correcto desarrollo. Su control químico no es satisfactorio debido a que los acaricidas disponibles son muy tóxicos para la fauna auxiliar y por la aparición de resistencias (Weintraub, 2007, IRAC, 2022b).

Virus

A nivel mundial se han descrito unas 49 virosis diferentes que afectan al cultivo del pimiento (Hanssen, 2010). En el sureste peninsular destacan los Tobamovirus como puede ser el virus del moteado suave del pimiento (Pepper mild mottle virus, PMMoV). Otro importante es el Bronceado del tomate (TSWV) (perteneciente a los Tospovirus) como uno de los más importantes, transmitido por *F. occidentalis*, ha tenido una gran repercusión. También existen otras virosis de cierta importancia del género Potyvirus como por el ejemplo el virus del mosaico del pepino CMV o el virus Y de la patata PVY que son transmitidos de forma no persistente por pulgones (García et al., 2014; Melgarejo et al., 2010). El control de las virosis no se puede realizar de forma curativa, por lo que su control se debe realizar de forma preventiva destruyendo los focos iniciales y mediante el control de su propagación (uso de material vegetal certificado, una buena higiene en las labores del cultivo, el uso barreras físicas, eliminación de plantas virosadas en el cultivo o tratamientos para regular las poblaciones del vector en función del tipo de transmisión que presente cada virus) (Monserrat, 2012).

Hongos y nematodos

En los suelos de los cultivos de pimiento existen varios agentes nocivos. Los nematodos son un problema emergente. El nematodo *Meloidogyne incognita* (Kofold & White) Chitwood (Tylenchida: Meloidogynidae) se encuentra ampliamente distribuido en los suelos del sureste español, a consecuencia de las restricciones para el uso de desinfectantes de suelo (Lacasa et al., 2018). De las enfermedades fúngicas del suelo

destacan *Phytophthora capsici* Leonian (Peronosporales: Peronosporaceae) y *Verticillium dahliae* Klebahn (Glomerellales: Plectosphaerellaceae) produciendo secas y marchitamientos en la planta, aunque actúan de diferente forma (Junior, 1998). En la zona aérea destacan la oidiopsis *Leveillula taurica* (Léveillé) G. Arnaud (Erysiphales: Erysiphaceae) y *Botrytis cinerea* Persoon (Helotiales: Sclerotiniaceae) para las que las condiciones de temperatura (humedad alta y temperaturas medias-cálidas) favorecen su aparición. Los medios de control de las enfermedades fúngicas aéreas se realizan de una forma más preventiva, ya que los tratamientos químicos no suelen ser respetuosos con los enemigos naturales, mientras que en el control de las de suelo, el mejor control se basa en realizar desinfecciones de suelo, biosolarización e injerto de patrones resistentes.

1.2.2. Evolución del control de plagas en los invernaderos de pimiento

El control de plagas en los invernaderos de pimiento se desarrolla mediante un sistema de Gestión Integrada de Plagas (GIP). La finalidad de este sistema es conseguir el mínimo uso de los productos fitosanitarios empleando diferentes estrategias (medidas culturales, de cultivo, biológicas y biotecnológicas) para el control de las plagas.

En las décadas de los 70-80 el control de plagas en los cultivos de pimiento del Campo de Cartagena se realizaba mediante lucha química, sin embargo, la aparición del *F. occidentalis* primero y *B. tabaci* después, propició el desarrollo de nuevas estrategias ante la pérdida de eficacia de los tratamientos químicos (Lacasa, 2021). A pesar de tener dos plagas diana muy bien definidas, el control biológico que se desarrolló fue ideado para el conjunto de artrópodos que afectan al cultivo.

El control del trips se centra en el uso de antocóridos nativos *Orius albidipennis* Reuter y *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae), siendo este último el más común debido a que se comercializa (Sánchez y Lacasa, 2002). Sin embargo, es necesario la presencia de flores para una correcta instalación del insecto, por lo que en las fases tempranas del cultivo su control se ha de complementar. Los ácaros fitoseidos también ejercen un buen control del trips, complementado el control de *F. occidentalis* con *Amblyseius (Typhlodromips) swirskii* Athias-Henriot (Acarida: Phytoseiidae) (Calvo et al., 2015). Otras especies como *Neoseiulus cucumeris* (Oudemans), *Iphiseius degenerans* (Berlese) o *Transeius (= Typhlodromips) montdorensis* (Schicha) (Acarida: Phytoseiidae) también son capaces de depredar trips (Weintraub, 2007). En ocasiones el

uso de *N. cucumeris* en las fases tempranas del cultivo ayuda a retrasar el desarrollo de las poblaciones iniciales de *F. occidentalis* y además facilita el establecimiento de las primeras sueltas de *O. laevigatus* (Sánchez et al., 1997).

El control de moscas blancas se realiza principalmente mediante el fitoseido *A. swirskii*, que se emplea también en el control de trips (Calvo et al., 2015; Bouagga et al., 2018). Su control se complementa con el parasitoide *Encarsia formosa* Gahan y *Eretmocerus eremicus* Rose & Zolnerowich (Hymenoptera: Aphelinidae) (Stansly et al., 2005).

El control de pulgones se realiza principalmente mediante el parasitoide *Aphidius colemani* que se adapta mejor en los invernaderos del sureste peninsular y las especies de pulgón presentes en el cultivo. Además, suele introducirse frecuentemente al inicio del cultivo el pulgón del cereal *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) (antes de la aparición de los pulgones plaga) para que se establezcan los parasitoides, y se cría en el invernadero sobre plantas de cebada (debido a que es un pulgón específico de monocotiledóneas) (Payton Miller y Rebek, 2018). Aparte existen otros parasitoides que también se comercializan como *Aphidius matricariae* Haliday, *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) o *Aphelinus abdominalis* Dalman (Hymenoptera: Aphelinidae). Una correcta elección del parasitoide según las condiciones climáticas o especie de pulgón puede mejorar el control, como por ejemplo ocurre con *A. abdominalis* que ejercen un mejor control (frente a *Aphidius* spp.) de los pulgones de mayor tamaño como *Macrosiphum euphorbiae* o *Aulacorthum solani*. Actualmente también es posible el uso de depredadores (sírfidos, mariquitas o cecidómidos) siendo las larvas capaces de devorar grandes poblaciones de pulgón (Amorós-Jiménez et al., 2015), aunque su establecimiento en el cultivo no es adecuado debido a la gran movilidad de los adultos. Actualmente se comercializan larvas de la mariquita *Adalia bipunctata* Linnaeus (Coleoptera: Coccinellidae) y distintas formas de los sírfidos *Sphaerophoria rueppellii* (Wiedemann) o *Eupeodes corollae* (Fabricius) (Diptera: Syrphidae).

1.3. El cultivo de la lechuga (*Lactuca sativa* L.)

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) pertenece a la familia de las asteráceas, aunque su origen no está claro se piensa que es originaria del suroeste de Asia, en el área alrededor

de los ríos Éufrates y Tigris. Sin embargo, muchos autores sitúan su origen como cultivo en el área mediterránea (De Vries, 1997).

España es el principal productor de la Unión Europea y cuarto productor a nivel mundial de lechuga con una producción de 969.060 t y una superficie de 34.300 ha en 2020 (FAOSTAT, 2022). Las principales zonas productoras se encuentran en la Región de Murcia, seguida por Andalucía, en las que se producen aproximadamente el 75% de la producción nacional (M.A.P.A., 2021). En Murcia la principal zona productora está en la comarca del Valle del Guadalentín (6.451 ha) seguido del campo de Cartagena (3.400 ha). Entre ambas producen casi el 80% de la producción murciana (C.A.R.M., 2021). El cultivo de la lechuga se extiende en grandes extensiones de monocultivo con densidades de plantación muy alta (desde 62.000 a 250.000 plantas/ha cultivadas en caballón o meseta) que varía en función de la época del año y tipo de lechuga. Principalmente se cultiva lechugas del tipo iceberg, romana y mini (Figura 3) (Benavente-García y Marín, 2003; Rincón, 2005; García García, 2020). La temperatura es un factor limitante, ya que la planta necesita temperaturas frías y suaves para que se forme bien y tenga un buen acogollado. El cultivo se realiza en un ciclo de invierno en las zonas costeras de Murcia (15 enero-10 de marzo), un ciclo de primavera (10 marzo-finales abril) en zonas alejadas de la costa y por último un ciclo de verano (1 de junio -15 de octubre) en zonas más frescas como Jumilla o Yecla (Marhuenda y García, 2017). A pesar de que las condiciones climáticas permiten el cultivo de la lechuga durante un periodo mayor en el Campo de Cartagena, el virus del Bronceado del tomate ha limitado su cultivo a los meses más fríos en las zonas costeras, habiéndose trasladado su producción a zonas más frías en el interior en los meses de primavera donde su vector (*F. occidentalis*) no se desarrolla adecuadamente (Lacasa et al., 2003).



Figura 3. Cultivo de lechuga lollo rosso en el Campo de Cartagena (foto cedida por A. Lacasa).

1.3.1 Plagas y enfermedades de la lechuga

Debido a la gran intensificación del cultivo y las grandes extensiones de monocultivo que se necesitan, el control de plagas y enfermedades de la lechuga se basa principalmente en la aplicación de tratamientos fitosanitarios, realizándose más bien de una forma preventiva que curativa (pues en muchas ocasiones no es posible controlar la aparición de todos los patógenos que afectan al cultivo) (Bàrriere et al., 2014).

Son muchas las plagas que pueden afectar al cultivo de la lechuga, aunque destacan los pulgones, distintas larvas de lepidópteros, minadores de hojas o trips.

Pulgones (Hemiptera: Aphididae). Se han citado 21 especies de pulgones que afectan a la lechuga, entre las que destacan el pulgón de la raíz de la lechuga *Pemphigus bursarius* Linnaeus, *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aulacorthum solani* y *Nasonovia ribisnigri* (Mosley), siendo este último el más importante de todos (Blackman y Eastop, 2000). Su control se realiza principalmente mediante tratamientos fitosanitarios de contacto durante las primeras semanas del cultivo ya que pierden gran parte de su efectividad una vez a acogollado la planta, al quedar el pulgón protegido en el interior del cogollo.

Orugas (Lepidoptera: Noctuidae). Su aparición en el cultivo es habitual en todas las campañas (sobre todo en las épocas más húmedas). Sus daños se deben a su alimentación, ya que pueden devorar grandes cantidades de masa foliar o dañar el cuello de la planta, por lo que se ha de prestar especial vigilancia en las fases tempranas del

cultivo. Las principales especies son *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exigua* y *Agrotis segetum* (Denis y Schiffermüller) (Morales, 2008; Marhuenda y García, 2017).

Minadores (Diptera: Agromyzidae). Los minadores pueden cobrar importancia en ciertas épocas del año (más húmedas) causando más daños cuando la planta es joven (Marhuenda y García, 2017). La principal especie es *Liriomyza trifolii* (Burgess), utilizándose tratamientos químicos para su control (Hernández-García et al., 1999).

Trips (Thysanoptera: Thripidae). La especie que es más importante en la lechuga es *Frankiniella occidentalis*. Los daños que produce debido a su alimentación no son muy problemáticos, siendo su principal daño la transmisión del virus del Bronceado del tomate (TSWV) que también afecta a la lechuga (Bàrriere et al., 2014). Actualmente se ha centrado su cultivo en la Región de Murcia en las zonas y épocas donde se desarrolla bien del cultivo y el vector no se multiplica adecuadamente (Lacasa et al., 2003).

Enfermedades

Las principales enfermedades fúngicas son el mildiu de la lechuga *Bremia lactucae* (Regel) (Peronosporales: Peronosporaceae) que ataca a la parte aérea, *Sclerotinia* spp. (Helotiales: Sclerotiniaceae) y *Botrytis cinerea* (Pers.) (Helotiales: Sclerotiniaceae) que causan podredumbres en la zona radicular o del cuello (Lacasa et al., 2003; Bàrriere et al., 2014).

1.4. Los pulgones como plagas agrícolas

Los pulgones son insectos que pertenecen al orden Hemiptera. Dentro del suborden Sternorrhyncha, forman la superfamilia Aphidoidea que a su vez se distingue en tres familias: Phylloxeridae, Adelgidae y Aphididae. Esta última contiene a la subfamilia Aphidinae, que es la de mayor importancia en agricultura por ser la más extensa y por contener el mayor número de especies que afectan a plantas herbáceas. Existen más de 5.000 especies de pulgones descritas en el mundo, de las cuales tan solo unas 100 son de importancia en la agricultura (Blackman y Eastop, 2017). Los pulgones se distribuyen prácticamente por todo el mundo, principalmente en las zonas templadas.

Los pulgones son insectos fitófagos y fluidofagos que se alimentan de la savia de los vegetales. Están considerados como unas de las plagas más importantes de los cultivos, sobre todo las especies más polífagas. Su reproducción, basada en la

partenogénesis cíclica, con la que combinan la partenogénesis que le proporciona una elevada y rápida reproducción, con la reproducción sexual que les permite generar nuevas combinaciones genotípicas consiguiendo una mejor adaptación a nuevas condiciones ambientales. Otro rasgo clave es la autorregulación que poseen para producir hembras partenogenéticas ápteras (muy prolíficas) o aladas (que buscan nuevos hospedantes cuando los recursos son limitados) (Simon y Peccoud, 2018). Los pulgones son eficaces vectores de virus, ya que transmiten casi el 50% de los virus transmitidos por los insectos, siendo vectores de los 5 virus que causan más pérdidas económicas en los cultivos de las zonas templadas: virus del mosaico del pepino (Cucumber mosaic virus, CMV), virus del mosaico del nabo (Turnip mosaic virus, TuMV), virus Y de la patata (Potato virus Y, PVY), el virus del mosaico de la lechuga (Lettuce mosaic virus, LMV) y el virus de la mancha anular de la papaya (Papaya ringspot virus, PRSV) (Dedryver et al., 2010).

1.4.1. Myzus persicae

Myzus persicae (Sulzer) es una especie cosmopolita, extremadamente polífaga y un vector muy eficiente de múltiples virosis. Posee una gran variabilidad genética. Su origen es asiático probablemente, ya que su hospedante primario, el melocotonero, procede de China. Esta especie está descrita en plantas de más de 40 familias botánicas diferentes y su distribución es mundial. Está considerado como una de las principales 15 especies de pulgones más importantes del mundo (Blackman y Eastop, 2017).

Las hembras ápteras partenogenéticas son de forma ovalada y color variable (verde claro a amarillento, rosa o rojo) (Figura 4). Tienen un tamaño de 1,2-2,5mm. Las hembras aladas son de color verde y poseen una placa dorsal negra en el abdomen. Como caracteres más significativos poseen tubérculos antenales convergentes, sifones con la punta oscura y antenas de la misma longitud del cuerpo (Hullé et al., 2020).



Figura 4. Hembra adulta de *Myzus persicae* (clon rosa) áptera (izq.) y alada (dcha.).

Su ciclo es holocíclico heteroico, en el que los huevos sexuales fecundados se depositan en un árbol (del género *Prunus* sp.) y después de eso se produce una migración a un hospedante secundario que puede ser herbáceo o leñoso (donde ocurren las generaciones partenogenéticas). Sin embargo, en climas cálidos pueden ser anoholocíclicos (pierden la parte sexual del ciclo de vida) (Blackman y Eastop 2000). En el sureste peninsular la presencia de formas holocíclicas es mayor en la zona continental, mientras que en las zonas de litoral (con temperaturas suaves) predominan las formas anoholocíclicas (La Spina, 2014).

Sus daños se derivan de su alimentación, produciendo deformaciones en los brotes tiernos y debilitamiento de la planta. Derivado de su alimentación, producen una sustancia azucarada como residuo, llamada melaza, sobre la cual se desarrollan hongos (fumagina) que deprecian el valor comercial de los frutos y reducen la capacidad fotosintética de la planta. Es capaz de transmitir más de 100 virus de las plantas, persistentes y no persistentes (Blackman y Eastop, 2017). Es vector de importantes virosis que afectan a los cultivos como por ejemplo la Sharka (Plum pox virus, PPV) en el albaricoquero, ciruelo o melocotonero. En el cultivo de pimiento es capaz de transmitir algunas virosis como por ejemplo el virus de las venas amarillas del pimiento (Pepper yellow vein virus, PeVYV), el virus del marchitamiento del haba (Broad bean wilt virus 1, BBWV-1) o el virus del mosaico del pepino (Cucumber mosaic virus, CMV) entre otros. Sin embargo, en la zona productiva del sureste español las virosis asociadas a los pulgones en cultivos protegidos de pimiento no suelen ser un problema.

Es una de las principales plagas que afectan al cultivo del pimiento en todo el mundo (Weintraub, 2007). En el sureste peninsular es la principal especie de pulgón que afecta al cultivo del pimiento (Sánchez et al., 2011). Su control habitual en los distintos cultivos que ha aparecido se ha realizado mediante tratamientos fitosanitarios. Esto ha propiciado que haya desarrollado resistencias a numerosas materias activas de diferentes grupos como los carbamatos, nicotina, neonicotinoides, organoclorados, organofosforados, piretroides y benzoilureas (Foster et al., 2017). Sin embargo, en los invernaderos de pimiento del sureste español su control se realiza mediante control integrado, siendo necesario tratamientos fitosanitarios puntuales (Sánchez et al., 2011).

1.4.2. *Nasonovia ribisnigri*

El pulgón de la lechuga, *Nasonovia ribisnigri* (Mosley), es una de las plagas más importantes del cultivo a nivel mundial (Morales, 2008). Se distribuye por toda Europa, sur y centro de Asia y Oriente Medio y fue introducido en América del Norte y Sur (Blackman y Eastop, 2000). A partir del 2003 también se detectó su presencia en Nueva Zelanda y Australia (Morales, 2008). Su rango de hospedantes se limita a distintos géneros de unas pocas plantas entre las que destacan las de la familia Asteraceae. Su hospedante primario son plantas del género *Ribes* spp. (*grosularia*, *nigrum*, *alpinum*, *ussuriense*) principalmente en el que se desarrollan las formas sexuales y posteriormente pasan a hospedantes secundarios de las familias de las compuestas (*Cichorium*, *Crepis*, *Hieracium*, *Lactuca*, *Lampsana*), escrofulariáceas (*Euphrasia*, *Veronica*) y solanáceas (*Nicotiana*, *Petunia*) (Blackman y Eastop, 2000). Sin embargo, en las zonas más cálidas las poblaciones de *N. ribisnigri* pueden comportarse de forma anholocíclica (Lacasa et al., 2003).

Las hembras ápteras partenogénicas son ovaladas de color verde amarillento a color rojo o rosado y presentan en la zona dorsal del abdomen unas líneas horizontales dispuestas a cada lado de la línea media (Figura 5). Las hembras aladas son de color verde claro a oscuro, con antenas negras (de mayor longitud que el cuerpo), con líneas transversales en el abdomen, sifones y cauda negras y las articulaciones de las patas también negras (Hullé et al., 2020). La temperatura óptima para el desarrollo de la población se encuentra entre los 20-24°C, aunque también se desarrolla bien a bajas temperaturas (8-16°C), mientras que la mortalidad es elevada a temperaturas altas (26-28°C). *Nasonovia ribisnigri* es un pulgón muy susceptible a los cambios de temperatura,

que influyen en el tiempo de desarrollo, fecundidad, proporción de formas ápteras y aladas y la coloración de los insectos (Díaz y Fereres, 2005).



Figura 5. Hembra adulta de *Nasonovia ribisnigri* áptera (izq.) y alada (dcha.).

Los principales daños que produce se deben a su alimentación y su presencia en la planta, ya que deprecia el valor comercial de la lechuga. Cuando *N. ribisnigri* se instala en el cultivo, lo hace en el interior de la lechuga, por lo que una vez se ha formado el cogollo su control es complicado.

Existen una gran variedad de enemigos naturales (depredadores y parasitoides) asociados a *N. ribisnigri* cuando no se realizan tratamientos fitosanitarios (Lacasa et al., 2003; Pascual-Villalobos et al., 2004, 2006). Sin embargo, su control biológico tampoco es efectivo debido a que no puede haber restos de insectos (enemigos naturales, pulgones o sus exuvios) en el producto final. Además, la lechuga se cultiva en grandes extensiones de monocultivo que no permiten el desarrollo de biodiversidad, y en muchas ocasiones no es posible la detección de las poblaciones iniciales de pulgón. De hecho, en muchas ocasiones los tratamientos fitosanitarios se realizan de forma preventiva (Bàrriere et al., 2014). Su control químico se realiza principalmente mediante materias activas de contacto, por lo que una vez ha acogollado la lechuga ya no resultan eficaces los tratamientos contra *N. ribisnigri*. Ha desarrollado resistencias a carbamatos, organoclorados y organofosforados (Foster et al., 2017). Actualmente, su control se basa principalmente en el uso de variedades resistentes a *N. ribisnigri* (biotipo Nr:0) debido al gen Nr introducido desde *Lactuca virosa* Linnaeus utilizando *Lactuca serriola* Linnaeus (Asterales: Asteraceae) para introducirlo (debido a la incompatibilidad con las variedades comerciales) (Van Helden et al., 1992). A este gen también está asociada una resistencia parcial frente a *M. persicae* y *M. euphorbiae*. No se conoce claramente su modo de acción

sobre el pulgón, aunque todo indica a que se produce una sustancia en la savia que provoca una inhibición de la alimentación y no se reproduce la plaga en la planta. Sin embargo, en la última década se han detectado poblaciones de *N. ribisnigri* que se han desarrollado sobre variedades resistentes (Nr:1) (Cid et al., 2012).

1.5. Insumos de origen vegetal para el control de plagas

Antes de la aparición de los insecticidas de síntesis, se utilizaban los extractos de plantas. Desde la época de los griegos, romanos o chinos ya se utilizaban extractos de plantas con acción fitosanitaria (Philogène et al., 2004). A lo largo de su evolución las plantas han desarrollado una serie de defensas físicas y químicas debido a su interacción con organismos fitófagos. Para su defensa química los metabolitos secundarios son de gran importancia, porque a pesar de que no tienen utilidad para el desarrollo o reproducción de la planta sí que son determinantes en las interacciones de defensa planta-fitófago (Ortiz, 2019). Estas moléculas (metabolitos secundarios) son las verdaderas materias activas que presentan los efectos repelentes y/o insecticidas de los extractos o aceites esenciales de las plantas. Cuando se emplean distintos preparados de origen vegetal, contienen esas moléculas activas junto a otras muchas presentes en la planta.

A pesar de que se conoce la acción de los insumos de plantas desde la antigüedad, no fue hasta principios del siglo XX cuando se identificaron las moléculas responsables de ello (Coscollá, 2004). Philogène et al., (2004) identifican dos generaciones diferentes marcadas por la aparición de las primeras moléculas vegetales: primero aparecieron varios alcaloides (de los cuales la nicotina fue la más importante), las rotenonas y las piretrinas y posteriormente apareció la azadiractina.

Actualmente se conoce como actúan las moléculas descritas anteriormente, sin embargo, el modo de acción de otras que van surgiendo está en duda. En la literatura podemos encontrar alguna revisión bibliográfica (Pascual-Villalobos, 1996). Durante mucho tiempo los aceites esenciales se han utilizado como repelentes, pero no se ha diferenciado frente a comportamientos de inhibición del asentamiento. Existen trabajos de laboratorio que han demostrado que en algunas ocasiones parece haber una relación entre estas acciones tóxicas y conductuales (Isman, 2020).

Existe una extensa bibliografía en la que se ha estudiado los efectos repelentes y/o tóxicos de los productos naturales contra pulgones (Bruce et al., 2005; Smith et al., 2018; Heydari et al., 2020), moscas blancas (Aslan et al., 2004; Deletre et al., 2016), orugas (Abdelgalei et al., 2020; Benelli et al., 2018) y plagas de productos almacenados (Hashem et al., 2018; López et al., 2008), entre otros.

1.5.1. Extractos naturales

Desde la antigüedad los primeros insecticidas que se utilizaron fueron extractos de plantas (Philogène et al., 2004). De hecho, antes del afianzamiento del uso generalizado de los insecticidas sintéticos en la década de 1940, los insecticidas de origen vegetal eran uno de los principales métodos de control de las plagas agrícolas (Isman, 2006). Estos insecticidas botánicos se basaban principalmente en moléculas pertenecientes a los grupos de la piretrinas, rotenonas o alcaloides (nicotina) (Pascual-Villalobos, 1996). El uso de extractos acuosos de tabaco con altos contenidos de nicotina se utilizaba desde 1690 contra insectos masticadores y chupadores. También está documentado el uso de extractos de piretrinas y rotenonas como insecticidas de uso común desde principios del siglo XIX (Philogène et al., 2004).

De hecho, en la actualidad el uso de insecticidas a base de piretrinas naturales es generalizado y existen diferentes productos comerciales que se pueden consultar en el registro de productos fitosanitarios del M.A.P.A. (M.A.P.A. 2022b). Actualmente las piretrinas se extraen de las flores del piretro, *Tanacetum cinerariifolium* (Treviranus) Schultz Bipontinus (Asterales: Asteraceae). Los productos comerciales pueden contener esa materia activa pura o bien un extracto de piretro.

Actualmente están surgiendo nuevos extractos de plantas de interés para la protección de cultivos. De hecho, existe un listado plantas del África subsahariana adecuadas para la producción de insecticidas botánicos contra pulgones como son, por ejemplo, *Ageratum conyzoides* Linnaeus (Asterales: Asteraceae) (ricas en cromenes) o *Tephrosia vogelii* Hooker (Fabales: Fabaceae) (compuesta principalmente por rotenoides: tefrosina, deguelin, rotenona) (Stevenson et al., 2017).

1.5.2. Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AEs) están formados principalmente por dos tipos de compuestos: terpenoides (monoterpenos y sesquiterpenos de bajo peso molecular), y en menor medida fenilpropanoides. Los monoterpenos presentes en los AEs pueden contener terpenos que son hidrocarburos (α -pineno), alcoholes (mentol, geraniol, linalol, terpinen-4-ol, p-mentano-3,8-diol), aldehídos (cinamaldehído, cuminaldehído), cetonas (tuyona), éteres (1,8-cineol o eucaliptol), y lactonas (nepetalactona). Los aceites esenciales se obtienen de la hidrodestilación, la destilación al vapor, la destilación seca o el prensado mecánico de las plantas. Este proceso suele necesitar de grandes cantidades de material vegetal debido al bajo rendimiento que suele tener (<1%). El rendimiento de la extracción depende de muchos factores, que pueden ser variables genotípicas (variedad, órgano de la planta destilado) y/o fenotípicas (clima, tipo de suelo, disponibilidad de agua, fotoperiodo). Los aceites esenciales se producen en 17.500 especies de plantas aromáticas que pertenecen en su mayoría a unas pocas familias botánicas entre las se encuentran Myrtaceae, Lauraceae, Lamiaceae y Asteraceae (Regnault-Roger et al., 2012).

El campo de estudio de los aceites esenciales como repelentes y o insecticidas de plagas ha cobrado una gran importancia en las últimas dos décadas, propiciado sobre todo por su mayor seguridad frente a los insecticidas convencionales, aunque tampoco se puede asumir una seguridad relativa ante ciertos productos naturales (como por ejemplo la nicotina) (Isman, 2008). Además, cada vez hay un menor número de materias activas disponibles debido a su toxicidad o incompatibilidades con la fauna auxiliar y por requisitos legales de las cadenas de distribución de alimentos europeas. Debido a que no se suple el vacío de productos fitosanitarios que se retiran, se limita el control de las plagas favoreciendo la aparición de resistencias a los productos que quedan. En ese sentido, los aceites esenciales son una buena opción para complementar el control de las plagas con nuevos productos o como alternativa a los insecticidas de síntesis en un futuro. Tanto el USFDA (Food and Drug Administration) y EPA (Environmental Protection Agency) en Estados Unidos consideran o califican los aceites esenciales como GRAS (Generally Recognized as Safe) (Pavoni et al., 2020) y por lo tanto está facilitado su uso fitosanitario. En Europa pocos de estos productos están autorizados como sustancias activas, por ejemplo, si lo está el aceite esencial de naranja, mientras que es difícil el uso de otras similares al no estar registradas para la protección de cultivos.

Los aceites esenciales pueden producir efectos tóxicos, repelentes, inhibidores de la alimentación, del establecimiento, de la oviposición, etc. (Isman, 2017). En muchos casos se puede presentar una combinación de ellos. A continuación, se expone el estado del arte de los aceites esenciales que producen un efecto insecticida o repelente sobre los pulgones, debido a que el objetivo principal de esta Tesis se basa en el control del pulgones en los cultivos de pimiento y lechuga.

Propiedades repelentes

No existe en la bibliografía muchos trabajos que demuestren claramente los efectos repelentes de los aceites esenciales y sus compuestos mayoritarios sobre los pulgones. En muchas ocasiones el tipo de bioensayo utilizado para medir la repelencia no es el más adecuado para estudiarlo. Para diferenciar el efecto repelente de un aceite esencial (por los volátiles) suelen ser los ensayos de olfatometría los más adecuados. En cambio, los bioensayos de elección y no elección pueden evaluar la repelencia, pero también la toxicidad fumigante y residual por lo que en ciertas ocasiones no es fácil de discernir cual es el efecto que está produciendo el aceite esencial.

Hori (1996, 1998, 1999a, 1999b) estudió el efecto de un gran número de aceites esenciales sobre *M. persicae* utilizando diferentes bioensayos de elección, no elección y olfatómetro en condiciones de laboratorio. Los aceites esenciales de cebolla [*Allium cepa* Linnaeus (Amaryllidaceae)], ajo [*Allium sativum* Linnaeus (Amaryllidaceae)], romero [*Salvia rosmarinus* Spenner (Lamiaceae)], tomillo [*Thymus vulgaris* Linnaeus (Lamiaceae)], lavanda [*Lavandula* sp. Linnaeus (Lamiaceae)], menta verde [*Mentha spicata* Linnaeus (Lamiaceae)], menta piperita [*Mentha piperita* Linnaeus (Lamiaceae)], jengibre [*Zingiber officinale* (Willdenow) Roscoe (Zingiberaceae)], pimienta [*Piper nigrum* Linnaeus (Piperaceae)], eucalipto [*Eucalyptus* sp. L'Héritier (Myrtaceae)], cedro [*Cedrus* sp. Trew (Pinaceae)] y laurel [*Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae)] mostraron un fuerte efecto repelente y/o tóxico contra *M. persicae* en ensayos de laboratorio y campo. El aceite esencial de mejorana [*Origanum majorana* Linnaeus (Lamiaceae)] también resulta repelente contra *M. persicae* cuando se aplica a una dosis de 5 µL sobre plantas de pimiento en ensayos de olfatometría (Khaled-Gasmi et al., 2021). Birkett et al., (2010) también probaron que los volátiles de los aceites esenciales de las lamiáceas *Nepeta grandiflora* Marschall von Bieberstein y *Nepeta clarkei* Hook.f. a una dosis de 1

µg son repelentes frente a *Sitobion avenae* Fabricius (Hemiptera : Aphididae) en ensayos de olfatometría de 4 vías. Mientras que Halbert et al., (2009) también evaluaron los efectos repelentes de los volátiles de diferentes aceites esenciales y compuestos puros sobre hembras adultas aladas de *R. padi* en un ensayo de elección en el que se trataban distintas baldosas a las que se le aplicaban glicerina para capturar los pulgones en su primera elección. De todos los productos evaluados a una dosis de 0,4 µL/cm² fueron repelentes distintos aceites de artemisia, [*Achillea millefolium* Linnaeus (Asteraceae)] y los compuestos puros farnesol, geraniol y linalol.

Algunos de los compuestos mayoritarios que forman parte de los aceites esenciales nombrados anteriormente y que también se ha probado en su estado puro han sido evaluados por otros autores utilizando ensayos de elección (inhibición del asentamiento). Gutiérrez et al., (1997) observó que el geraniol y farnesol inhiben el asentamiento de hembras adultas de *M. persicae* (79,6 y 97,14 % respectivamente) a la dosis de 100 µg/cm² en un bioensayo de elección. En un trabajo realizado en nuestro grupo de investigación, también observamos que el geraniol y farnesol producían el mismo efecto (99,3 y 98,7 % respectivamente) sobre el pulgón de la cebada *R. padi* (Pascual-Villalobos et al., 2017). Dancewick et al., (2010) también observó el mismo efecto disuasorio producido por el farnesol y algunos compuestos similares utilizando un bioensayo similar.

Otros autores también han observado la disuasión producida por aceites esenciales como el de las semillas de alcanforero [*Cinnamomum camphora* (Linnaeus) Presl (Lauraceae)] que inhibe el asentamiento de *A. gossypii* a una dosis de 20 µL/mL (76,19%) (Jiang et al., 2016) o el laurel canario [*Laurus novocanariensis* Rivas Martínez, Lousã, Fernández Prieto, Días, Costa & Aguiar (Lauraceae)] sobre *M. persicae* y *R. padi* (Rodilla et al., 2008).

Propiedades insecticidas

Se han realizado muchos trabajos que hablan del potencial tóxico de los aceites esenciales contra los pulgones. En la revisión realizada por Ikbal y Pavela (2019) enumeran los trabajos más significativos en los que se ha probado la toxicidad de diferentes aceites esenciales por contacto, de los cuales destacan los pertenecientes a las familias Lamiaceae, Asteraceae y Apiaceae. Hori (1999a) que estudió el efecto repelente

de los aceites esenciales de tomillo y menta poleo [*Mentha pulegium* Linnaeus (Lamiaceae)] sobre *M. persicae*, también observó que producen un efecto tóxico tras un tiempo de exposición de 24h al aceite. Otros autores también han observado el efecto tóxico del aceite esencial de menta piperita (DL₅₀ = 0,04 µL/mL) (Al-Antary et al., 2017) o menta poleo (DL₅₀ = 0,88 µL/mL) (Behí et al., 2017) sobre hembras adultas de *M. persicae*.

Sampson et al., (2005) evaluaron la actividad insecticida de distintos aceites esenciales diluidos en DMSO sobre el pulgón del nabo *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis), resultando el aceite esencial *Bifora radians* Marschall von Bieberstein (Apiaceae), con un alto contenido en (*E*)-2-tridecenal y (*E*)-2-tetradecenal, el más tóxico (CL₅₀= 0,3 mg/mL). A continuación, los aceites con un alto contenido en pulegona (menta poleo) (CL₅₀= 1,8 mg/mL), linalol [coriandro, *Coriandrum sativum* Linnaeus (Apiaceae)] (CL₅₀= 2,9 mg/mL), 1,8-cineol (romero) (CL₅₀= 7,4 mg/mL) y (*E*)-anetol [anís, *Pimpinella anisum* Linnaeus (Apiaceae)] (CL₅₀= 4,6 mg/mL) resultaron los siguientes más tóxicos. Benelli et al., (2018) también evaluaron el efecto tóxico de formulaciones acuosas de anís (93 % de (*E*)-anetol) sobre *M. persicae* (CL₅₀ = 3,2 mL/L). Mientras que Jalei et al, (2015) calcularon una CL₅₀ de 0,27 µL/L del aceite esencial de *Dracocephalum kotschy* Boiss. (Lamiaceae) (73,75 % limoneno-10-al y 19,96 % de linalol) contra *M. persicae*. Actualmente uno de los pocos insecticidas de origen botánico autorizado contra insectos chupadores está formulado con aceite de naranja (PRE-VAM[®]), siendo el limoneno su principio activo.

Otros autores también han evaluado la mortalidad que producen los vapores de los aceites esenciales sobre los pulgones. Según Tunç y Şahinkaya (1998) los vapores de los aceites esenciales de comino [*Cuminum cyminum* Linnaeus (Apiaceae)], anís, orégano [*Origanum syriacum* Linnaeus (Lamiaceae)] y eucalipto [*Eucalyptus camaldulensis* Dehnhardt (Myrtaceae)] son efectivos contra *A. gossypii* produciendo una elevada mortalidad en ciertos casos. Digilio et al., (2008) también observaron que los aceites esenciales de anís, hinojo, albahaca, orégano y tomillo resultaban muy tóxicos (100% de mortalidad) cuando se exponían hembras adultas de *M. persicae* y *A. pisum* en cajas sin ventilación a una concentración de 2 µL/L de aire. Existen otros muchos trabajos que hablan de la actividad fumigante de distintos aceites esenciales (algunos nombrados anteriormente), sobre distintas especies de pulgones como *M. persicae*, *Aphis fabae* Scopoli, *A. pisum* y *Macrosiphoniella sanborni* (Gillette), o *M. euphorbiae* (Kimbaris et

al., 2010; Górski y Tomczak, 2010; Górski et al., 2016). En otros trabajos también se ha probado el efecto de algunos de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales nombrados anteriormente. Erler y Tunc (2005) observaron el efecto tóxico producido por los monoterpenos (*E*)-anetol, carvacrol, 1,8-cineol, p-cimeno, mentol, γ -terpineno, terpinen-4-ol y timol sobre *A. gossypii*. Pascual-Villalobos et al., (2020) también calcularon una CL_{50} del (*E*)-anetol de 0,336 μ L/L de aire sobre *M. persicae*.

Si bien, hay numerosos trabajos que describen el efecto insecticida y repelente de muchos aceites esenciales y sus principales moléculas sobre diferentes plagas, la mayoría se limitan a trabajos de laboratorio en los que el insecto está sobreexposto al tratamiento y su efectividad no es real en muchos casos, por lo que su aplicabilidad inmediata en agricultura todavía queda lejos.

Tampoco se pueden aplicar estos aceites esenciales en su forma oleosa o utilizando disolventes orgánicos, como ocurre en la mayoría de los experimentos de la bibliografía descrita anteriormente. Una de las principales limitaciones de los aceites esenciales es su baja persistencia debido a su alta volatilidad y su gran insolubilidad en agua debido a que son sustancias no polares (Isman, 2020). Sin embargo, las aplicaciones de productos destinados a la protección o nutrición del cultivo se suelen realizar vía riego o foliar. El uso de microemulsiones y nanoemulsiones para encapsular compuestos es cada vez más frecuente debido a que son relativamente barato económicamente y fáciles de fabricar (Pavoni et al., 2020). En una nanoemulsión, el aceite esencial tiene una mejor solubilidad e incrementa el área de interface entre los distintos componentes (aceite, agua y surfactante) consiguiendo una distribución más homogénea del aceite esencial y aumentando la actividad biológica (Pascual-Villalobos et al., 2019).

El trabajo que se desarrolla en esta Tesis doctoral parte de un trabajo previo que realizamos utilizando el pulgón del cereal *Rhopalosiphum padi* como especie modelo en el que se evaluaron 10 aceites esenciales y 18 compuestos puros (algunos de ellos presentes como compuestos mayoritarios en los aceites esenciales) (Pascual-Villalobos et al., 2017). En este trabajo se seleccionaron como más repelentes los aceites esenciales de anís, cymbopogon, menta piperita y los compuestos puros (*E*)-anetol, carvona, geraniol, farnesol (*Z*)-jasmona y linalol. A su vez el aceite esencial de anís y los compuestos puros (*E*)-anetol, cariofileno, estragol y pulegona también fueron tóxicos contra *R. padi*. La mayor parte de estos aceites esenciales y compuestos puros se seleccionaron para testar sus efectos sobre los pulgones *Myzus persicae*, *Nasonovia*

ribisnigri y *Macrosiphum euphorbiae* en los trabajos que se han desarrollado en esta esta Tesis.





2. Objetivos

2.1. Objetivo general

El objetivo principal fue estudiar los efectos insecticidas y repelentes de aceites esenciales y compuestos puros de origen vegetal, para encontrar nuevas sustancias activas en el control de los pulgones *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae* y *Nasonovia ribisnigri*, compatibles con el control integrado de plagas.

2.2. Objetivos específicos

1. Estudiar la repelencia de un grupo de aceites esenciales y compuestos puros en *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae*.
2. Determinar la actividad insecticida de formulaciones, aplicadas en pulverización, de los aceites esenciales y compuestos activos sobre pulgones en ensayos con plantas.
3. Evaluar los efectos secundarios de bioactivos volátiles, y su potencial como atrayentes de enemigos naturales.
4. Optimizar dosis de aplicación de los tratamientos en condiciones de campo en cultivos de pimiento de invernadero y lechuga al aire libre.



3. Materiales y métodos generales

Para facilitar la lectura de los distintos artículos, en esta sección se resumen las técnicas y experimentos comunes a la mayoría de las publicaciones recogidos en los siguientes capítulos. Para una mejor comprensión de la metodología empleada en cada momento pueden consultarse las separatas de las publicaciones que forman esta Tesis (ver Capítulo 4).

3.1. Insectos

Para los ensayos que se han realizado en esta Tesis se han empleado 3 especies de pulgón distintas (dos en pimiento y una en lechuga): *Myzus persicae* (clon rosa y clon verde), *Macrosiphum euphorbiae* y *Nasonovia ribisnigri*. *M. persicae* y *M. euphorbiae* se han criado en plantas de pimiento separados en diferentes jaulones cubiertos por malla antitrips (Figura 6). Estas especies se recolectaron sobre plantas de pimiento en el Campo de Cartagena y en Murcia y se mantienen en crías desde 2017 hasta la actualidad. Dada la gran variabilidad genética de *M. persicae* se establecieron dos colonias diferentes para poder realizar estudios de comparación entre diferentes poblaciones de la misma especie. Las crías para mantener las poblaciones de *M. persicae* se renovaban 1 vez cada dos semanas y las de *M. euphorbiae* 1 vez al mes. Los pulgones se criaron en cámaras de cultivo en condiciones controladas a temperatura constante de 25 ± 1 °C y fotoperiodo 16:8 h (L:O) en las instalaciones del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA) situado en la Alberca, Murcia (37° 56' 18,1'' N, 1° 08' 01.1'' O).



Figura 6. Cámara de cultivo con las jaulas de cría de pulgones.

Nasonovia ribisnigri se ha criado en lechuga (Figura 7). Fue recolectado sobre plantas de lechuga en Orihuela (Alicante, España), en 2017, y se siguen manteniendo hasta la actualidad. Las crías masivas de *N. ribisnigri* se realizaron en fitotrones (Sanyo MRL-350, Gallenkamps PCL, Reino Unido) y las condiciones de cultivo son 22 ± 1 °C, humedad relativa del $60 \pm 10\%$ y fotoperiodo 10:14 h (L:O). Las crías para mantener las poblaciones se renovaban 1 vez cada dos meses.



Figura 7. Hembras ápteras adultas de *Myzus persicae* clon rosa (arriba izq.) y clon verde (arriba dcha.) *Nasonovia ribisnigri* (abajo izq.) y *Macrosiphum euphorbiae* (abajo dcha.).

3.2. Material Vegetal

Durante todos los trabajos de esta Tesis se han utilizado plantas de pimiento tipo Lamuyo (*C. annuum*) de la variedad Herminio (Syngenta seeds, USA). Se utilizó la misma variedad para el mantenimiento de las crías de los pulgones y todos los ensayos de laboratorio, semicampo y campo realizados. La planta utilizada para el mantenimiento de las poblaciones de pulgón y los ensayos de laboratorio se pregerminaba colocando a las semillas en una placa Petri con papel de filtro humedecido, durante 3-4 días. Después se trasplantaban a un semillero con turba, y posteriormente se trasplantaban a macetas de 0,33 L y 2,5 L cuando era necesario. Las macetas se rellenaban con una mezcla de turba (Klasmann TS3, Klasmann-Deilmann GmbH, Alemania) y perlita (Projar S.A., Valencia, España) en proporción de 3:1 (v:v). Las plantas se regaban dos veces por semana y se fertilizaban con una solución nutritiva una vez por cada 3 riegos, según los requerimientos

del cultivo. La solución nutritiva madre se preparaba en una de macronutrientes (600g KNO₃ y 700 g Ca(NO₃)₂) y otra de micronutrientes (246 g MgSO₄, 33 g Fe-EDDHA, 140 g KH₂PO₄, 0,27 g ZnSO₄, 1,76 g H₃BO₃, 0,39 g CuSO₄, 0,1 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 1,56 g MnSO₄) en 5 L de agua cada una, y para el riego se diluían 50 mL de cada una en 10 L de agua.

Las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo en las instalaciones del IMIDA a 23 ± 1 °C, 60 ± 10 % H.R. y fotoperiodo 16:8 h (L:O) (Figura 8). Sin embargo, la planta utilizada en los ensayos de semicampo y campo se obtenía de un vivero (en cultivo ecológico) y se retiraba 1-2 días antes de su trasplante en el invernadero.



Figura 8. Cámara de cultivo para la producción de planta de pimiento utilizada en los ensayos y las crías de pulgones.

Para los trabajos realizados con lechuga (*L. sativa*) se ha empleado la variedad Bondena de tipo Baby (Syngenta seeds, USA) de igual forma a la descrita con el pimiento, pero con diferentes condiciones de cultivo: 22 ± 1 °C, 60 ± 10 % H.R. y fotoperiodo 10:14 h (L:O). Las plantas se cultivaron en un fitotrón (Sanyo MRL-350, Gallenkamps PCL, Reino Unido) (Figura 9).



Figura 9. Fitotrón utilizado en la producción de plantas de lechuga y cría de *Nasonovia ribisnigri*.

3.3. Aceites esenciales y compuestos puros

Durante los ensayos se estudió el efecto sobre los pulgones de 8 aceites esenciales: procedentes de 3 especies de Umbelliferae (anís, coriandro e hinojo), 2 de Lamiaceae (albahaca y menta piperita), 1 de Rutaceae (limón) y 1 de Graminaceae (cymbopogon) (Tabla 1); y un grupo de 12 compuestos puros que incluye fenilpropanoides ((*E*)-anetol), Ketonas monoterpénicas (carvona), aldehídos monoterpénicos (cital), monoterpénos (geraniol y linalol), otros alcoholes (farnesol y (*Z*)-hexenol), hidrocarburos monoterpénicos (limoneno y γ -terpineno) y otros productos (cariofileno, (*Z*)-jasmona y salicilato de metilo) (Tabla 2). Todos los aceites esenciales se obtuvieron de Destilerías Muñoz Gálvez S.A. (Murcia), excepto el aceite de limón que se obtuvo de Citromil S.L. (Santomera, Murcia). En cuanto a los compuestos puros se obtuvieron de Sigma Aldrich, Across Organics y Alfa Aesar. La elección de estos aceites esenciales y compuestos puros se basa en un trabajo previo realizado con el pulgón del cereal *Rhopalosiphum padi* L. (Pascual-Villalobos et al., 2017)

Tabla 1. Aceites esenciales de plantas.

Nombre científico	Nombre vulgar	Compuestos mayoritarios
<i>Pimpinella anisum</i> L.	Anís	(E)-anetol (96,9%)
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Albahaca	Estragol (79,2%), Linalol (15,5%)
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Coriandro	Linalol (69,9%), Alcanfor (6,2%)
<i>Foeniculum vulgare</i> Miller	Hinojo	(E)-anetol (30,9%), Limoneno (19,2%), α -Phellandrene (14,8%), Fenchona (13,1%)
<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. F	Limón	Limoneno (67,6%), β -pineno (11,4%), γ -Terpinene (8,3%)
<i>Cymbopogon flexuosus</i> (Nees ex Steud.) W. Watson	Cymbopogon	Citral (geranial + neral) (79,7%)
<i>Mentha piperita</i> L.	Menta piperita	Mentol (40,4%), Mentona (23,5%), Acetato de mentol (8,3%), Isomentona (6,1%)

Tabla 2. Compuestos puros de aceites esenciales.

Compuestos puros	Tipo	Aceites esenciales donde se encuentra
(E)-Anetol 99%	Fenilpropanoide	Anís, Hinojo
D-Carvona	Ketona monoterpénica	--
β -Cariofileno	Hidrocarburo terpénico	--
Citral 95% (mezcla de geranial y neral)	Aldehído monoterpénico	Cymbopogon
Geraniol	Alcohol monoterpénico	Cymbopogon
Farnesol	Alcohol acíclico sesquiterpénico	--
(Z)-Hexenol	Alcohol	--
(Z)-Jasmona	Compuesto orgánico volátil	--
(R)-(+)-Limoneno	Hidrocarburo monoterpénico	Hinojo, Limón
Linalol	Alcohol monoterpénico	Albahaca, Coriandro
Salicilato de Metilo 98%	Ester orgánico	--
γ -Terpineno 98%	Hidrocarburo monoterpénico	Limón

3.4. Preparación de nanoemulsiones

Los aceites esenciales se han formulado en nanoemulsiones de aceite en agua (O/W), utilizando el surfactante no-iónico Tween™ 80 (Polysorbate 80) (Panreac, Barcelona, España) en una relación 1:2 (aceite esencial: Tween™ 80) siguiendo el procedimiento de Pascual-Villalobos et al., (2019). Las nanoemulsiones se han realizado con una máquina de dispersión de laboratorio, rotor de alta velocidad IKA-Labor Pilot 2000/4 (IKA-Werke GmbH and Co. Staufen, Alemania) (Figura 10). Todas las nanoemulsiones utilizadas en esta Tesis se han preparado a 7940 rev/min durante 10 min a 15 °C. Los controles se realizaron de igual forma y a la misma dosis que las nanoemulsiones, pero sin añadir el aceite esencial (solo con Tween™ 80). Las nanoemulsiones utilizadas en los ensayos de laboratorio para los que se requerían menores volúmenes se prepararon el día antes, mientras que las utilizadas en los ensayos de campo se preparaban 1-2 días antes a una concentración del 2 % (v/v) y se diluían a la dosis deseada el día del ensayo.



Figura 10. Máquina de dispersión (rotor de alta velocidad) utilizado para la preparación de las nanoemulsiones.

3.5. Ensayos de laboratorio

3.5.1. Estudio del comportamiento

Inhibición del asentamiento del pulgón

El bioensayo empleado fue descrito por Gutiérrez et al., (1997). Se trata de un ensayo en el que se le da a elegir al pulgón entre dos trozos de hoja de pimiento (uno tratado y otro sin tratar). Los aceites esenciales y compuestos puros se aplicaron en disoluciones de acetona al 2 %. Se distribuían 10 μ cada trozo de hoja con una micropipeta Gilson, por tanto, la dosis neta de AE o compuesto puro era de 0,2 μ L por cm^2 . El control solo fue tratado con acetona. El bioensayo se realizó en cajas de 3 x 3 x 1,5 cm, ventiladas con una abertura de 1 cm de diámetro y cubierta con muselina (Figura 11). Cada tratamiento consta de 20 cajas (repeticiones) con 10 hembras ápteras adultas en cada caja. Las cajas se mantuvieron en fitotrones (Sanyo MRL-350, Gallenkamps PCL, Reino Unido) a temperatura constante de 25 ± 2 °C y fotoperiodo 16:8 h (L:O) durante el ensayo.



Figura 11. Caja, con dos semicírculos de hoja, uno tratado y otro sin tratar empleada en los bioensayos de inhibición del asentamiento.

A las 24 h se anotó el número de pulgones que se asentaron en el control y el tratamiento y se calculó el índice de repelencia (I.R.):

$$\left(1 - \frac{T}{C}\right) \times 100$$

donde T es el número de pulgones en el trozo de hoja tratada y C es el número de pulgones en el trozo de hoja control.

Respuesta olfativa en pulgones y enemigos naturales

Se ha estudiado la repelencia/atracción de algunos de los aceites esenciales y compuestos puros sobre los pulgones *M. persicae* y *M. euphorbiae* (ápteros y alados) y sus enemigos naturales *Aphidius colemani* y *Sphaerophoria rueppellii* utilizando un olfactómetro de 2 vías, el cual estaba fabricado en vidrio, de 15 mm de diámetro interior con un vástago de 60 mm y dos brazos de 50 mm cada uno con un ángulo de 60° entre ellos. Cada brazo se conectaba a un frasco tipo Drexler de 250 mL con tubos de teflón, donde se colocaba un disco de papel de filtro de 2 cm de diámetro tratado con 10 µL del producto (tratamiento) o sin tratar (control) (Figura 12). A través de cada brazo se hacía pasar un flujo de aire de 700 mL min⁻¹, filtrado previamente con carbón activo. Para evitar un sesgo en la elección de los insectos se cambió el olfactómetro y la posición de las fuentes cada 5 repeticiones y se renovó el tratamiento de la fuente cada 10 insectos. Para cada producto se testaron 120 insectos individualmente en 6 grupos de 20. Para cada tipo de insecto se estableció un tiempo máximo de elección 5 min para pulgones y *A. colemani* y 3 min para *S. rueppellii*, excluyéndose del análisis estadístico todos aquellos que no eligieron ningún brazo.

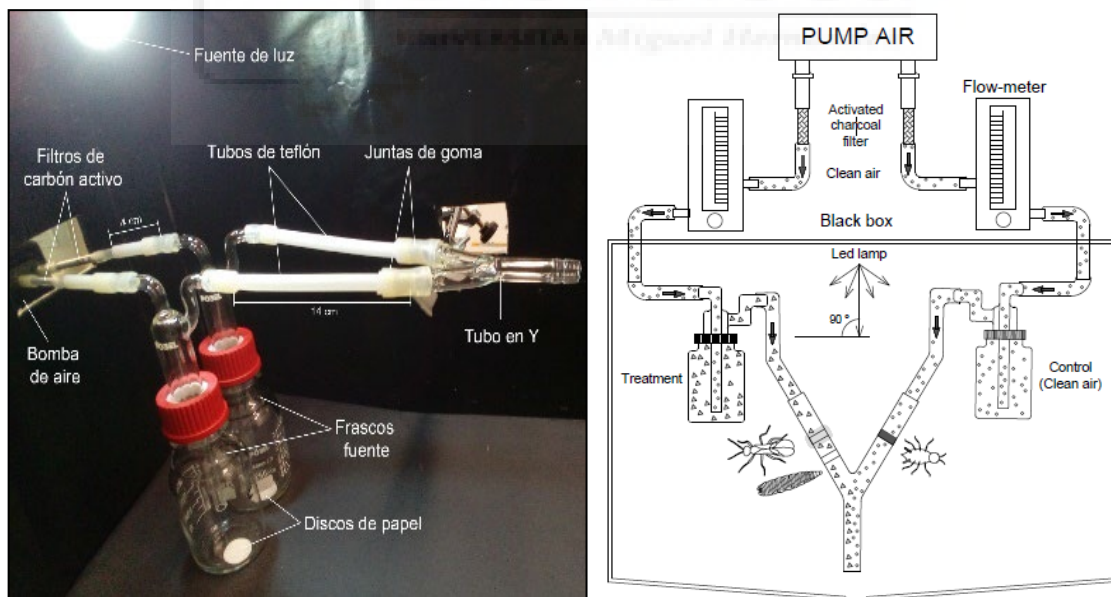


Figura 12. Olfatómetro utilizado en los ensayos de repelencia/atracción de pulgones y sus enemigos naturales.

3.5.2. Efecto insecticida en pulgones

Placas Petri con hojas de pimiento

Se diseñó un bioensayo para evaluar el efecto tóxico de las nanoemulsiones de aceites esenciales por contacto sobre pulgones en condiciones de laboratorio. Cada tratamiento constaba de grupos de 5 placas Petri de 9 cm de diámetro ventiladas (Figura 13) (con 20 pulgones cada una) que se repetían en tres días diferentes (3 repeticiones). En cada placa Petri se colocaba un disco de hoja de pimiento de 9 cm de diámetro sobre agar al 1% (p/v) y posteriormente se colocaban 20 hembras adultas ápteras de *M. persicae* clon rosa con la ayuda de un pincel y se sellaban las placas con Parafilm. Posteriormente se dejaba que los pulgones se asentaran durante 1 h para que no se escaparan durante el tratamiento. Los tratamientos se realizaban mediante un aparato de pulverización controlada asistido por ordenador (CCSA) (Burkard Manufacturing Co. Ltd., Rickmansworth, Reino Unido) (Figura 13) que trataba las placas a un volumen de aplicación de $2 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ y una presión de 5 psi (0,34 bar) de la formulación deseada.

Después del tratamiento las placas se colocaban durante 48 h en fitotrones (MRL-350, Gallenkamps PCL, Reino Unido) en condiciones controladas a temperatura constante de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y fotoperiodo 16:8 h (L:O). La mortalidad se comprobaba las 24 y 48 h después del tratamiento con la ayuda de un pincel.

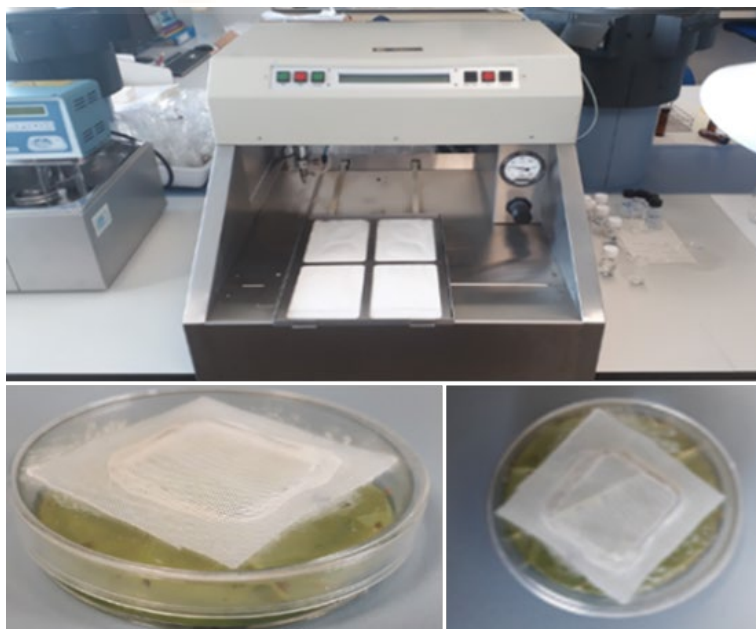


Figura 13. Arriba, aparato de pulverización controlada utilizado para realizar los tratamientos en las placas Petri. Abajo, placas Petri con hojas de pimiento, con malla en la tapadera para ventilar.

Ensayos con plantas de pimiento y lechuga

Se adaptó la metodología descrita por Ribeiro et al., (2014) para estudiar el efecto tóxico de los compuestos puros más activos en el bioensayo de inhibición del asentamiento (descrito en el apartado 3.5.1.) sobre *M. persicae*, *M. euphorbiae* y *N. ribisnigri*. Se utilizaron plantas de pimiento o lechuga en función de la especie de pulgón, y se cultivaron en macetas de 0,33 L. Las plantas se infestaron con 10 hembras adultas ápteras con la ayuda de un pincel y se dejaron durante una semana para su establecimiento. Se utilizaron 10 plantas por tratamiento y cada grupo se mantuvo en diferentes cámaras de cultivo (Sanyo MRL-350, Gallenkamps PCL, Reino Unido) en condiciones controladas durante todo el ensayo de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y fotoperiodo 16:8 h (L:O) para el pimiento, y $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y fotoperiodo 14:10 h (L:O) para la lechuga.

Después del periodo de colonización, se contó el número de pulgones por planta y se trataron con las respectivas nanoemulsiones utilizando formulaciones solo con Tween™ 80 como control. Los tratamientos se pulverizaron con un atomizador manual (Matabi 1,5 berry, Grupo Goizper, Gipuzkoa, España) con un volumen de aproximadamente 50 mL por planta. El número de pulgones vivos por planta se contó antes y durante varios días después del tratamiento para poder calcular el ratio instantáneo de crecimiento de las poblaciones (r_i) (Stark y Banks, 2003):

$$r_i = \frac{\ln \frac{N_f}{N_0}}{\Delta T}$$

Siendo N_f el número de pulgones en cada planta tratada el día después del tratamiento, N_0 el número inicial de pulgones en la misma planta y ΔT los días transcurridos entre ambos conteos.

3.5.3. Efecto residual en enemigos naturales

Se estudió el efecto residual de algunos compuestos puros sobre el parasitoide *Aphidius colemani* y el sírfido depredador *Sphaerophoria rueppellii* utilizando un bioensayo estandarizado de la Organización Internacional para el Control Biológico (IOBC) (Mead-Briggs et al., 2000). Para ello se trataban los cristales de unas cajas de madera para los parasitoides (Figura 14) y placas Petri para los sírfidos, con las

nanoemulsiones de los compuestos mediante el aparato de pulverización CCSA descrito anteriormente (Apartado 3.5.2). Las superficies tratadas se dejaban secar al aire, y se introducían los insectos en el interior de cada caja o placa Petri.



Figura 14. Cajas empleadas para evaluar la toxicidad residual de los aceites esenciales sobre *Aphidius colemani*.

Cada tratamiento consistía en 4 repeticiones con 10 adultos de *A. colemani* por repetición y 8 repeticiones con 5 larvas de *S. rueppellii* por repetición. Las cajas se mantenían a 22 ± 1 °C y 60% H.R. en un fitotron. Con un pincel se tocaba a los individuos y se determinaba número de insectos vivos y muertos a las 24 y 48 h después del tratamiento

3.6. Ensayos de semicampo

Los ensayos de semicampo se realizaron en dos invernaderos situados en las instalaciones del IMIDA en La Alberca. Se ensayó el efecto de aquellos aceites esenciales y compuestos puros que resultaron más tóxicos en los ensayos de laboratorio previos para lechuga y pimiento. Las plantas de pimiento de la variedad Herminio, se cultivaban en macetas de 2,5 L y las de lechuga de la variedad Bondena, en macetas de 0,33 L con una mezcla de turba y perlita (3:1 v:v) (Figura 15).

En todos los ensayos se incluía como control una formulación de agua y Tween™ 80 y un insecticida de referencia a base de piretrinas (Pirecris®, Seipasa, Valencia, España). Las nanoemulsiones se preparaban a una concentración del 2% (v/v) y posteriormente se diluían a la dosis deseada para cada experimento. Las plantas se trataban con un pulverizador de mano (Polita 7, Matabi, Grupo Goizper, Gipuzkoa, España) con un volumen de aproximado de 80 y 50 mL por planta para pimiento y lechuga respectivamente.



Figura 15. Ensayo de semicampo de pimiento (izq.) y lechuga (dcha.) para evaluar el efecto insecticida de nanoemulsiones de aceites esenciales.

Se realizaron diseños de bloques al azar con 3 repeticiones para el pimiento y 4 para la lechuga, formados por 10 y 12 plantas por cada repetición del tratamiento respectivamente. Las plantas se inocularon con pulgones de las crías de laboratorio una semana antes del ensayo (Figura 16) y se dejaron evolucionar. El número de pulgones vivos se contó el día previo al tratamiento y 1, 2, 3 y 6 días después del tratamiento.



Figura 16. Inoculación de plantas de lechuga con *Nasonovia ribisnigri* (izq.) y pimiento con *Myzus persicae* (dcha.) al inicio del ensayo.

3.7. Ensayos de campo

Pimiento

Los ensayos de campo se realizaron en la finca experimental "Torreblanca" del IMIDA (37° 46' 36,8" N, 0° 53 '49,7" O) (Torrepacheco, Murcia). Se ensayó el efecto de aquellos aceites esenciales y compuestos puros que resultaron más efectivos en los ensayos de semicampo. Los ensayos de pimiento se realizaron en invernaderos tipo multitunel (40 m²) durante 2 años consecutivos utilizando la variedad Herminio a una densidad de 5 plantas/m² (Figura 17), establecidas en el suelo. Las plantaciones se realizaron el 27 enero de 2020 y el 21 de octubre de 2020 manteniéndose el cultivo hasta mediados de julio del año siguiente. Los ensayos se realizaron entre los meses de abril y julio.



Figura 17 Ensayo de campo de pimiento en invernadero para evaluar el efecto insecticida de nanoemulsiones de aceites esenciales.

Se realizó un diseño de bloques al azar con 2 repeticiones (1 invernadero por repetición) con 4 tratamientos (16 plantas en cada repetición), de los cuales uno era el control (nanoemulsión solo con Tween™ 80 y agua), otro un insecticida de referencia a base de piretrinas (Pirecris®, Seipasa, Valencia, España) y los otros dos las nanoemulsiones a testar.

Las plantas se inocularon previamente al ensayo con hembras adultas de *M. persicae* (clon rosa) de las crías del laboratorio. Las plantas se trataron utilizando una mochila de pulverizar (Super 16, Matabi, Grupo Goizper, Gipuzkoa, España). El número de pulgones vivos se contaron un día antes del primer tratamiento y 1, 2 y 7 días después.

También se realizaron observaciones sobre enemigos naturales, que se presentaban espontáneamente.

Lechuga

Se realizó un ensayo de lechuga (variedad Bondena) en una parcela a campo abierto en la finca Experimental Torreblanca del IMIDA en 2018. El cultivo se trasplantó sobre caballones al tresbolillo a una densidad de 12 plantas/m² (Figura 18) según es tradicional en la zona en una parcela de 300 m². La duración del cultivo fue desde el 2 de mayo hasta el 5 de junio.



Figura 18. Ensayo de campo de lechuga para evaluar el efecto insecticida de nanoemulsiones de aceites esenciales.

Se realizó un diseño de bloques al azar con 4 repeticiones y 6 tratamientos, delimitándose 24 parcelas elementales de 10 m² cada una. Después de la plantación se muestreó el cultivo 2 veces por semana hasta que el 50 % de las plantas fueron colonizadas por hembras adultas de *N. ribisnigri* de forma espontánea. Para su correcta identificación se tomaron muestras de los pulgones previamente al inicio del ensayo para su identificación en el laboratorio con la lupa binocular. Para asegurar unas poblaciones adecuadas de pulgones al inicio del pulgón además se hicieron sueltas de hojas con hembras de *N. ribisnigri* procedentes de las crías del laboratorio (450 hojas distribuidas por toda la parcela) (Figura 19).



Figura 19. Identificación de pulgones recolectados en la parcela (izq.) e inoculación de plantas de lechuga con *Nasonovia ribisnigri* para asegurar poblaciones homogéneas antes del ensayo.

Las plantas se trataron utilizando una mochila de pulverizar (Super 16, Matabi, Grupo Goizper, Gipuzkoa, España). El número de pulgones vivos y enemigos naturales se contaron un día antes del tratamiento y 1, 3 y 7 días después.

3.8. Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos en esta investigación se analizaron mediante diversos métodos en función del tipo de ensayo. A continuación, se detallan únicamente los análisis más genéricos para las distintas publicaciones. Para una mejor comprensión de los análisis estadísticos concretos a cada caso se puede consultar el Capítulo 4.

La mayoría de los datos de conteos de pulgones se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics (Centurion 18.1.6.) cuando los datos eran normales y presentaban homogeneidad de varianzas. Para estudiar las diferencias entre tratamientos se utilizó la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher a un nivel de confianza del 95%.

Cuando los datos no eran normales se emplearon modelos lineales generalizados (GLM) utilizando diferentes paquetes del programa R (versión 3.6.2.) (por ejemplo, los paquetes MASS, emmeans, etc.) en función del tipo de datos. En estos casos se analizaron las diferencias entre tratamientos mediante la prueba de Tukey o de comparaciones múltiples LSD de Fisher a un nivel de confianza del 95%.

En la Tabla 3 se resume el plan de trabajo que ha resultado durante la realización de la Tesis.

Tabla 3. Plan de trabajo, experimentos y las publicaciones que conforman la Tesis doctoral.

	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3	AÑO 4	PUBLICACIONES ^a
PUESTA A PUNTO Y CRÍA DE INSECTOS					
ENSAYOS DE LABORATORIO					
Estudio del comportamiento					
Inhibición del asentamiento (<i>M. persicae</i> , <i>M. euphorbiae</i>)					1
Repelencia/Atracción (Olfatometría) (<i>M. persicae</i> , <i>M. euphorbiae</i> , <i>A. colemani</i> , <i>S. rueppellii</i>)					1
Efecto insecticida					
Placas Petri (<i>M. persicae</i>)					2
Plantas (<i>M. persicae</i> , <i>M. euphorbiae</i> , <i>N. ribisnigri</i>)					1 y 3
Efecto residual en enemigos naturales (<i>A. colemani</i> , <i>S. rueppellii</i>)					1
ENSAYOS DE SEMICAMPO					
Pimiento (<i>M. persicae</i>)					2
Lechuga (<i>N. ribisnigri</i>)					3
ENSAYOS DE CAMPO					
Pimiento (<i>M. persicae</i>)					2
Lechuga (<i>N. ribisnigri</i>)					3
REDACCIÓN Y PUBLICACIÓN DE ARTÍCULOS					1, 2 y 3

^a Publicación 1: M. Cantó-Tejero et al. Essential oils-based repellents for the management of *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*.

Publicación 2: M. Cantó-Tejero, P. Guirao, M.J. Pascual-Villalobos. Aphicidal activity of farnesol against the green peach aphid – *Myzus persicae*.

Publicación 3: M. Cantó-Tejero, M.J. Pascual-Villalobos, P. Guirao. Aniseed essential oil botanical insecticides for the management of the currant-lettuce aphid



4. Publicaciones

4.1. Publicación 1

Essential oils-based repellents for the management of *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*

Manuel Cantó-Tejero, José Luis Casas, María Ángeles Marcos-García, María Jesús Pascual-Villalobos, Victoria Florencio-Ortiz, Pedro Guirao

Journal of Pest Science **95**: 365–379 (2022)

[DOI:10.1007/s10340-021-01380-5](https://doi.org/10.1007/s10340-021-01380-5)



Métricas de calidad JCR (2021)

Área:	Entomology
Factor de impacto:	5,742 (3/100)
Cuartil:	Q1

Essential oils-based repellents for the management of *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*

Manuel Cantó-Tejero, José Luis Casas, María Ángeles Marcos-García, María Jesús Pascual-Villalobos, Victoria Florencio-Ortiz and Pedro Guirao

Abstract

Aphids are one of the major agricultural pests in the world. Their pest management in pepper greenhouses is based on integrated control with release of natural enemies and pesticide treatments used in specific conditions. Essential oils may be used as an eco-friendly alternative for the control of this pest. In this work, we study the repellent effect of essential oils and pure compounds against aphids by two-choice bioassays. (*E*)-anethole, geraniol, farnesol, and (*Z*)-jasmone were the most repellent compounds for *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* ($RD_{50} = 0.011-0.086 \mu\text{l}/\text{cm}^2$). Farnesol at dose of 10 μl attracts natural enemies of aphids, *Aphidius colemani* adults and *Sphaerophoria rueppellii* larvae, in y-tube olfactometer bioassays. A residual toxicity bioassay, using a computer-controlled spraying apparatus, showed a slight toxicity (<20% mortality) against larvae of *S. rueppellii* when exposed to treatments of (*E*)-anethole, farnesol, or (*Z*)-jasmone individually. The foliar application of farnesol+(*E*)-anethole (1:1) nanoemulsions on plants infested with aphids resulted in a reduction of the population growth ratio of *M. persicae* ($r_i = -0.78$) and *M. euphorbiae* ($r_i = -3.85$). Among the tested compounds, farnesol is a promising compound to be introduced in aphid management for its potential as a repellent and aphicide, as well as an attractant of some natural enemies of this pest.

Keywords: botanical insecticides, Integrated Pest Management (IPM), *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Sphaerophoria rueppellii*, *Aphidius colemani*

Introduction

There are more than 5,000 species of aphids in the world. Among these, about 450 species have been reported in crop plants. *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) is one of the most damaging aphids in world agriculture. It is cosmopolitan and polyphagous and is a vector of a high number of plant viruses (Blackman and Eastop 2017). In the 1990s, the control of aphids was mainly performed by organophosphates and carbamates. These compounds are systemic, relatively persistent and highly toxic to aphids but also to non-target insects. In the 2000s, control was mainly based on pyrethroids which are not the most suitable treatments, due to their low persistence and their broad-spectrum action on natural enemies. Neonicotinoids are now widely used (Dewar and Denholm 2017), however, the application of three of the most common neonicotinoids on blooming crops is heavily restricted in Europe (Cressey 2017). Furthermore, *M. persicae* easily generates resistance to pesticides. To date, resistance has been reported to organophosphates, carbamates, pyrethroids, neonicotinoids, and organochlorines (Simon and Peccoud 2018).

In southeastern Spain, sweet pepper is grown in greenhouses using Integrated Pest Management (IPM) strategies combining biological control and synthetic pesticides (Calvo et al. 2012; Dáder et al. 2019). As previously mentioned, the number of authorized insecticides is decreasing due to restrictions or incompatibility with natural enemies and by legal requirements of the European food distribution chains. Biological control of aphids is based on the use of parasitic wasps like *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae) (Payton and Rebeck 2018) or predators like syrphid *Sphaerophoria rueppellii* (Wiedemann) (Diptera: Syrphidae) (Amorós-Jiménez et al. 2015; Calvo-Agudo et al. 2020).

The application of insecticides in the greenhouse may be employed when natural enemies have already settled in the crop. In these cases, pesticides need to be compatible and not harmful to natural enemies. Overcoming these incompatibilities is one of the most complicated aspects in IPM strategies (Rodrigues et al. 2013).

Most essential oils (EOs) are a complex mixture of monoterpenes, biogenetically related phenols, and sesquiterpenes (Isman 2006). In previous studies, our research group tested the repellent effects of EOs on *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) using a settling inhibition bioassay (Pascual-Villalobos et al. 2017).

Some plants have repellent properties against insects due to Volatile Organic Compounds (VOCs) emitted by them, in fact, these plants can be intercropped in order to protect other harvests from their attack. This is, for example, the case of intercrops of onion, basil, rosemary, or marigolds repelling aphids, thrips, or whiteflies (Hori 1996, 1999a; Dardouri et al. 2019; Guilbaud and Khudr 2020; Ben Issa et al. 2017). Extracts and EOs obtained from these plants often cause repellency/deterrence as well. Hori and Komatsu (1997) reported the repellent effect of rosemary essential oil (EO) and some of its main compounds against the aphid *Neotoxoptera formosana* (Takahashi). The EOs of pennyroyal, spearmint or thyme have also been reported as repellents against *M. persicae* in laboratory conditions (Hori 1999b).

Citral, linalool, farnesol or geraniol have been reported to exert repellent effects on *M. persicae* in laboratory choice bioassays (Gutiérrez et al. 1997; Gabryś et al. 2005; Dancewicz et al. 2010). (*Z*)-jasmone, a compound present in many EOs, is also considered as a repellent against the cereal aphid *Sitobion avenae* (Fabricius) and the lettuce aphid *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Birkett et al. 2000; Bruce et al. 2003). As described in other studies, some EOs are toxic to aphids, like anise (*Pimpinella anisum*), cumin (*Cuminum cyminum*) or fennel (*Foeniculum vulgare*) when they are topically applied to *M. persicae* (Benelli et al. 2018; Pavela 2018).

The main objective of this work was to study the repellent effects of a selected group of EOs and pure compounds on *M. persicae* and *M. euphorbiae*. The EOs and pure compounds were selected in continuation of our previous work on the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (Pascual-Villalobos et al. 2017). We performed a two-choice bioassay in order to distinguish whether the repellence is produced through settling inhibition or by olfactory repulsion. We also provided behavioural data regarding the response of natural enemies to the products.

Materials and methods

Essential oils and pure compounds

Eight plant EOs were studied. Three from Apiaceae: aniseed (*Pimpinella anisum* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), fennel (*Foeniculum vulgare* Miller); 3 from Lamiaceae: basil (*Ocimum basilicum* L.), peppermint (*Mentha piperita* L.), lavandin (*Lavandula* hybrid); 1 from Rutaceae: lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. f); and 1 from Poaceae: lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) W. Watson). Also, 12 pure compounds were studied: phenylpropanoids ((*E*)-anethole), monoterpenic ketones

(carvone), monoterpenic aldehydes (citral), monoterpene alcohols (geraniol and linalool), other alcohols (farnesol and (*Z*)-hexenol), monoterpenic hydrocarbons (limonene and γ -terpinene), and other products (caryophyllene, (*Z*)-jasnone and methyl salicylate). EOs were purchased from Distilleries Muñoz Gálvez S.A. (Murcia, Spain) and pure compounds from Sigma Aldrich. Lemongrass EO was obtained from plants grown at Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) facilities (Murcia, Spain).

Aphids

Macrosiphum euphorbiae and two clones of *M. persicae*, clone 1 (red clone) and clone 2 (green clone) were used in bioassays. Clone 1 was collected in Campo de Cartagena (Murcia, Spain) from pepper plants (2016), clone 2 was collected in Orihuela (Alicante, Spain) from *Brassica oleracea* var. Italica (2016) and *M. euphorbiae* was collected from pepper plants in La Alberca (Murcia, Spain) (2017). All aphid species were maintained on pepper plants (*Capsicum annuum* L., cv Herminio) in a growth chamber under a 16:8 (L:D) photoperiod, at 25±1°C and 65% relative humidity for several generations prior to the performance of the assays. Adult aphids of the same size were used in all the bioassays.

Natural enemies

Larvae of the predator *S. rueppellii* were obtained from BioNostrum Pest Control S.L. (Alicante, Spain). Freshly received second-instar larvae (five-six days-old) were used in all the bioassays. The parasitoid *A. colemani* was obtained from Agrobio S.L. (Almería, Spain) as mummies. Mummies were reared in ventilated plastic containers (0.89 L) and maintained in a growth chamber under a 16:8 (L:D) photoperiod, at 22±1°C and 60±10% RH. Female adults were fed with cotton pads soaked in 30% (v/v) honey solution in water. One- to three-day-old female adults that emerged from mummies were used in the bioassays.

Two-Choice Bioassay (Aphid settling inhibition)

An aphid settling inhibition bioassay was performed in square plastic Petri dishes of 3x3x1.5 cm, provided with a mesh-covered air vent (1 cm diameter), according to a previously published method (Gutiérrez et al. 1997). Each box contains two halves (control and treatment) of pepper leaf discs (1 cm²) (*C. annuum*, cv. Herminio) placed on agar at 1.15% in the box lid. In the initial screening, EOs and pure compounds were diluted in 99% acetone (Sigma Aldrich Company, St. Louis, MO, USA) at 2% (v/v) and applied to the pepper leaf using a pipette (10 µl/cm²) (0.2 µl of EO or pure compound per cm²) and led dry 2 min. The control was treated with acetone. Twenty boxes with 10 wingless adults in each one were included in each treatment. Aphids were released in the inside of the lid of the Petri dishes and then they were sealed. Boxes were maintained under controlled conditions at 22±2 °C and 16:8 hours (L:D) photoperiod. The Repellence Index (%) (*RI*) was calculated after 24 hours using the formula (Gutiérrez et al. 1997):

$$RI (\%) = \left(1 - \frac{T}{C}\right) \times 100$$

T is the number of aphids on the treated surface and C is the number of aphids located in the control.

For those products giving a $RI \geq 70$, repellent doses 50 and 90 (RD_{50} and RD_{90} , respectively) were also calculated. The dose of solutions ranged were between 0.125 and 4 % (v/v). A minimum of 4 doses was used to calculate the repellent dose for each product. RD_{50} and RD_{90} values were compared among products for each aphid species and among aphid species for each product.

Olfactometer Bioassays

The bioassays were performed on a 2-way olfactometer, as described by Vaello et al. (2017). The olfactometer consists of a Y-shaped tubular piece of Pyrex glass with an inner diameter of 15 mm, a 60 mm stem and two arms of 50 mm put together with an angle of 60° (Pobel, Madrid, Spain). Each arm was connected to a 250 ml Drexler bottle which contain a filter paper disc (2 cm diameter) as the odour source. All connections were made with Teflon tubes. The filter paper in one bottle was moistened with 10 µL of the product to be tested. The control was untreated filter paper. (*E*)-anethole, farnesol, (*E*)- anethole+farnesol (1:1), and (*Z*)-jasmone were the treatments tested on wingless and winged adults aphids of two species: *M. persicae* (clone 1) and *M. euphorbiae*. The same

compounds together with the addition of aniseed EO, citral, and methyl salicylate were tested on adult females of *A. colemani* and *S. rueppellii* larvae. A flow of 700 ml min⁻¹ of previously activated charcoal filtered air, was passed through each olfactometer arm. Air flow was controlled using a flow meter (Cole-Parmer, Vernon Hills, Illinois). All olfactometer tests were performed at a temperature of 25±2 °C. In order to achieve a uniform light exposure and avoid any visual stimulation during the experiments, the olfactometer was placed into a black box opened in the top (Fig. 1). A led lamp was placed on the top providing a luminous emittance around 35 μmol·m⁻²·s⁻¹, except for *S. rueppellii* which was performed in the dark. All olfactometer tests were performed between 9 am and 6 pm. Each insect had 5 min to make a choice, except for *S. rueppellii* larvae, which had 3 min. A choice made by aphids was considered if they positioned themselves 3 cm above the bifurcation, whereas for *S. rueppellii* larvae, this was 2 cm. Two choices were recorded for *A. colemani*, the first when is positioned themselves 3 cm above the intersection and second choice after 5 min or when the insect was in the end of the arm (Du et al. 1998). Insects that did not make a choice within the established time were noted as non-choice and were excluded from the statistical analysis. For each product, 120 insects were individually tested in six groups of 20. A minimum choice of 40% was considered for *S. rueppellii* larvae in each group, and 60% for aphids and parasitoids, based on insect mobility and previous literature (Du et al. 1998; Dardouri et al. 2019). The y-tube glass was renewed every five insects, and the positions of the sources were changed in order to avoid any bias in the choice. Source treatments were renewed every 10 insects. All glassware was washed with soapy water, rinsed in distilled water and finally in 99% acetone and then dried.

Toxicity bioassays

Contact toxicity (in aphids)

The toxic effect of the most active pure compounds in the two-choice and olfactometer bioassays was studied as described by Ribeiro et al. (2014). Pepper plants (*C. annuum*, cv. Herminio) 45-50 days old (6-8 leaves) in pots (0.33L) were cultivated on a mixture of peat (Klasmann TS3, Klasmann-Deilmann GmbH, Germany) and vermiculite (3:1) and were watered 2 times a week, once with mixture fertilizer of NPK (15-15-15) diluted in water. Plants were infested with 10 wingless adults of *M. persicae* (clone 1) or *M. euphorbiae* with a fine brush. Infested plants were maintained at 25±1°C and 16:8 (L:D) photoperiod for 5 days to rear the colony. After this time, the number of

aphids per plant was counted. Plants were treated with nanoemulsions of (*E*)-anethole, farnesol, (*E*)-anethole+farnesol (1:1) and (*Z*)-jasmonone at a dose of 0.2% (v/v) and Tween 80® (Panreac, chemical pure (pharma grade)) as surfactant (1:2) prepared following the procedure of previous studies (Pascual-Villalobos et al. 2017). A volume of 50 ml per plant was sprayed with a manual atomizer (Berry 1.5, Matabi, Goizper Group, Gipuzkoa, Spain). The concentration used (0.2% (v/v)) was determined based on previous observation (Pascual-Villalobos et al. 2019). Ten plants were used per treatment. Each group of plants was kept in a different growth chamber (Sanyo MLR-350) throughout the experiment.

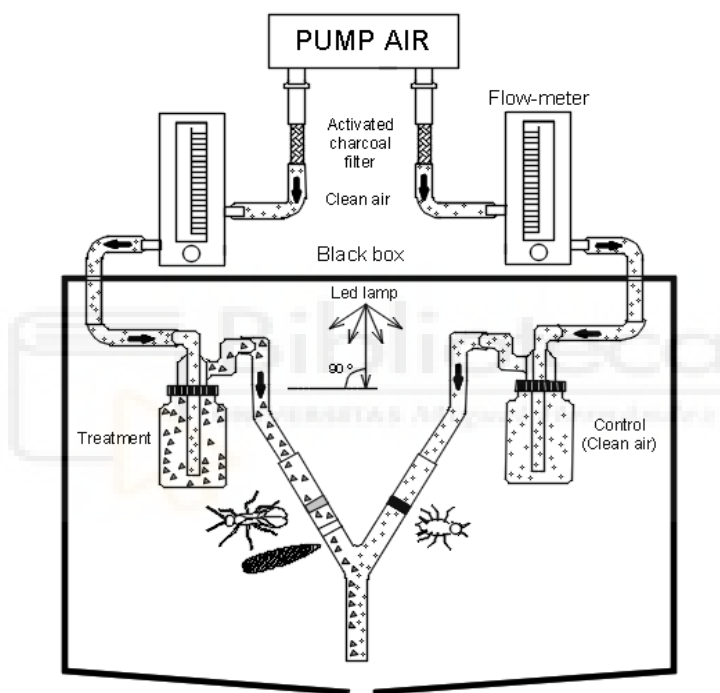


Fig. 1 Y-tube olfactometer to assess the behavioral response of predator *Sphaerophoria rueppellii*, parasitoid *Aphidius colemani* or aphids (wingless or winged), *Myzus persicae* or *Macrosiphum euphorbiae*. Six replications of 20 insects for each product was tested individually. Air flow was filtered with activated charcoal and regulated by flow meter to 700 mL min⁻¹. Each insect chooses if is positioned in the election zone during 5 min, except for *Sphaerophoria rueppellii*, which had 3 min

Surviving aphids per plant were counted at 24, 48, 72, 96 and 168 hours post-treatment. The instantaneous population growth ratio (*ri*) was calculated using the formula described by Stark and Banks (2003):

$$ri = \frac{\ln \frac{Nf}{No}}{\Delta T}$$

Nf is the number of aphids on each day after treatment, No is the initially number of aphids and ΔT are the days between both counts.

Likewise, control efficacy was calculated according to Henderson and Tilton (1955) formula.

Residual toxicity (in natural enemies)

The residual effect of some pure compounds ((*Z*)-jasmone, (*E*)-anethole, farnesol and (*E*)- anethole+farnesol (1:1)) on female adults of *A. colemani* and larvae of *S. rueppellii* was studied following a standardized protocol from the International Organisation for Biological Control (IOBC) (Mead-Briggs et al. 2000). Nine cm diameter Petri dishes were used in trials with *S. rueppellii*, while wooden boxes with 60 cm² lateral glass (10x6 cm) were used for female adults of *A. colemani*. The glass contact surface was treated with a computer-controlled spraying apparatus (Burkard Manufacturing Co. Ltd., England). The products tested, which are described above, were formulated as o/w nanoemulsions following the procedure previously described (Pascual-Villalobos et al. 2017), at concentrations ranging from 0.1-0.3% (v/v) that are likely to be used for spraying aphid infected plants under field conditions. Tween 80® was used as a surfactant at a ratio of 1:2. For each group, the Tween 80® concentration in the highest dose ((*E*)- anethole+farnesol (1:1)) was used as a control. *Aphidius colemani* adults were fed with a 30% (v/v) honey solution and *S. rueppellii* larvae with 50 aphids per larva and day. The number of dead insects was recorded after 24 and 48 hours. The glass was washed with soapy water, rinsed in distilled water and finally in 99% acetone and then dried. New Petri dishes were used in each trial.

Each treatment consisted of four replicates with 10 adults of *A. colemani* and eight replicates of 5 larvae of *S. rueppellii* for each treatment and concentration.

Statistical Analysis

Data of the aphid settling inhibition bioassay were analysed using ‘R’ software, version 3.6.2 (RC Team, 2019). Repellent doses RD_{50} and RD_{90} of the two-choice bioassay were estimated from log-normal dose-response model, calculated with `drm` function from R package `drc` (Ritz et al. 2015). Different aphid species were compared with the `edcomp` function to compare the relative potencies between dose-response curves.

Data from the Y-tube olfactometer bioassay were analysed to test whether volatile products had a significant effect compared to the untreated control. Exact Two-sided Binomial test and Clopper-Pearson 95% confidence intervals calculated with `binom.test`, from R package `stats`.

The data obtained in the contact toxicity bioassay was analysed by a one-way ANOVA and the means were separated by Fisher's LSD test. Normality of the data and homogeneity of variance was assessed with Shapiro-Wilk and Levene's tests, respectively. The data were analysed using Statgraphics (Centurion 18.1.6.).

Mortality data from residual toxicity in the natural enemies bioassay was pairwise compared within each natural enemy, dose, and time, using the two-tailed Fisher's exact test with Holm-Bonferroni p value adjustment, using R package the `R` function `pairwise.fisher.test` from package `fmsb` (Nakazawa 2019).

Results

Aphid settling inhibition in *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*

The lowest values of the Repellent Index (RI) were obtained for the lemon EO ($RI=37.8$) and for its main compound limonene ($RI=15.0$) meaning absence of repellency ($RI<70\%$). Five out of eight EOs tested were effective against *M. persicae* (clone 1), while six out of eight gave repellence in *M. persicae* (clone 2). Only three out of eight EOs were effective on *M. euphorbiae*. Aniseed, basil and lemongrass EOs were active ($RI\geq 70$) causing repellence both in *M. persicae* (in the two clones studied) and in *M. euphorbiae*, the most effective one being aniseed EO. Strikingly, coriander, peppermint, fennel and lavandin EOs proved effective against one clone of *M. persicae* but not the other. Pure compounds presented the highest RI in the bioassay. (*E*)-anethole ($RI=98.1$) is the most repellent for clone 1 of *M. persicae*; geraniol ($RI=96.9$) and (*Z*)-jasmone ($RI=94.5$) for

clone 2; whereas geraniol ($RI=99.4$) and farnesol ($RI=94.3$) for *M. euphorbiae*. RD_{50} and RD_{90} in Tables 1 and 2 were calculated for those EOs and pure compounds active in the initial screening. Only aniseed, basil and lemongrass EOs affected both species of aphids. These EOs had the most effective RD_{50} (ranging from the $RD_{50}= 0.039 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ of lemongrass EO against *M. euphorbiae*, to the $RD_{50}= 0.110 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ shown by basil EO against *M. persicae*, clone 2). However, other EOs only affected *M. persicae*. Peppermint and coriander affected both clones, lavandin EO only affected clone 2, whereas fennel only repelled clone 1 of *M. persicae* (Table 1).

Regarding pure compounds (Table 2), seven out of the twelve compounds tested gave a $RI \geq 70$ against *M. persicae* (clone 1), six against *M. persicae* (clone 2) and seven against *M. euphorbiae*. Five compounds, (*E*)-anethole, citral, geraniol, farnesol and (*Z*)-jasmone, were effective against all aphid species included in the study. Carvone was effective against *M. persicae* but not against *M. euphorbiae* while caryophyllene showed repellence against *M. euphorbiae* but not against *M. persicae* (Table 2). Linalool was repellent against *M. persicae* (clone 1) and *M. euphorbiae*, but not against clone 2.

Also, significant differences were produced between aphid species or even aphid clones for a given product if we compare RD_{50} and RD_{90} (Table 3). According to the RD_{50} values, this effect was different for the two clones of *M. persicae* in all EOs, except peppermint ($P > 0.05$). Clone 2 of *M. persicae* and *M. euphorbiae* were more susceptible to lemongrass EO, and clone 2 to aniseed. Farnesol, geraniol and (*E*)-anethole were more effective against clone 2 of *M. persicae* than for other aphids. Whereas *M. euphorbiae* was more susceptible to citral, farnesol and linalool, than clone 1. In summary, clone 1 of *M. persicae* was the most resistant aphid, less affected by products than other aphids.

Effect of compounds on the olfactory response of insects

(*E*)-anethole, farnesol, the mixture of both (1:1) and (*Z*)-jasmone were selected to perform the olfactometry bioassays because they were the most repellent products against aphids in the previous bioassay. The results of the olfactometry are plotted in Figs. 2, 3, 4, 5 (aphids) and Figs. 6 and 7 (natural enemies).

Table 4. Repellent activity of essential oils against two clones of *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* in choice bioassays after 24 hours.

	<i>Myzus persicae</i> (clone 1)			<i>Myzus persicae</i> (clone 2)			<i>Macrosiphum euphorbiae</i>		
	R.I. (%) ^a	RD ₅₀ ^b	RD ₉₀ ^c	R.I. (%) ^a	RD ₅₀ ^b	RD ₉₀ ^c	R.I. (%) ^a	RD ₅₀ ^b	RD ₉₀ ^c
Aniseed	96.5	0.072e (0.063-0.081)	0.390a (0.313-0.468)	91.9	0.060d (0.055-0.065)	0.139b (0.123-0.155)	88.3	0.081a (0.075-0.088)	0.210b (0.178-0.241)
Basil	93.9	0.087d (0.082-0.092)	0.159c (0.147-0.170)	83.7	0.110b (0.103-0.118)	0.220a (0.200-0.241)	90.7	0.085a (0.075-0.094)	0.383a (0.295-0.471)
Coriander	64.9	0.184a (0.171-0.196)	^d –	90.6	0.128a (0.113-0.144)	^d –	61.8	--	--
Fennel	74.8	0.132b (0.118-0.146)	^d –	61.8	--	--	33.3	--	--
Lemon	37.8	--	--	64.2	--	--	60.7	--	--
Lemongrass	82.5	0.100c (0.092-0.107)	0.290b (0.256-0.324)	92.1	0.047e (0.041-0.053)	0.208a (0.167-0.248)	82.7	0.039b (0.032-0.046)	0.285a (0.213-0.358)
Peppermint	91.1	0.101c (0.093-0.108)	^d –	77.0	0.093c (0.079-0.106)	^d –	49.6	--	--
Lavandin	60.5	--	--	82.8	0.084c (0.076-0.091)	0.237a (0.200-0.274)	68.7	--	--

^a Repellency Index (R.I.) = [1-(T/C)] x100 where T = total number of aphids on treated leaf after 24 hours and C = total number of aphids on control leaf after 24 hours (Gutierrez et al. 1997); Replications with less than 40% of aphid settlement were discarded for computation; EOs were applied at doses of 0.2 µl/cm².

^{b,c} RD₅₀ and RD₉₀ are doses of compounds (µl/cm²) that give R.I. values of 50 and 90, respectively. Doses were calculated in active products only (RI≥70 at 0.2 µl/cm²). RD₅₀ and RD₉₀ are followed by letters to indicate differences among treatments for each aphid. A 95% confidence interval was calculated. All calculations were made using the R package DRC (Ritz et al., 2015).

^d Values of RD₉₀ interval are above the highest concentration used.

Table 5. Repellent activity of pure compounds against two clones of *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* in choice bioassays after 24 hours.

	<i>Myzus persicae</i> (clone 1)			<i>Myzus persicae</i> (clone 2)			<i>Macrosiphum euphorbiae</i>		
	R.I. (%) ^a	RD ₅₀ ^b	RD ₉₀ ^c	R.I. (%) ^a	RD ₅₀ ^b	RD ₉₀ ^c	R.I. (%) ^a	RD ₅₀ ^b	RD ₉₀ ^c
(<i>E</i>)-anethole	98.1	0.065d (0.060-0.070)	0.152d (0.136-0.168)	85.8	0.042b (0.036-0.047)	0.186ab (0.155-0.217)	90.3	0.086b (0.076-0.095)	– ^e
Carvone	94.0	0.109c (0.103-0.115)	0.179c (0.167-0.192)	83.6	0.094a (0.088-0.100)	0.210a (0.185-0.236)	39.5	--	--
Caryophyllene	41.7	--	--	42.9	--	--	72.8	0.181a (0.162-0.200)	– ^e
Citral	74.8	0.126b (0.118-0.134)	0.277b (0.249-0.305)	79.8	^d –	0.153b (0.121-0.185)	97.1	0.029e (0.026-0.033)	0.126b (0.102-0.150)
Geraniol	87.3	0.057d (0.049-0.065)	0.331ab (0.258-0.404)	96.9	0.034c (0.030-0.037)	0.117b (0.101-0.132)	99.4	0.040d (0.036-0.044)	0.141b (0.118-0.164)
Farnesol	87.6	0.037e (0.033-0.041)	0.126d (0.108-0.145)	91	^d –	0.115b (0.082-0.149)	94.3	0.022f (0.019-0.025)	0.093c (0.077-0.108)
(<i>Z</i>)-Hexenol	59.5	--	--	18.7	--	--	29.0	--	--
(<i>Z</i>)-Jasmone	91.3	0.011f (0.008-0.015)	0.142cd (0.106-0.178)	94.5	^d –	0.039c (0.025-0.053)	92.7	0.013g (0.007-0.019)	0.123bc (0.083-0.162)
Limonene	15.0	--	--	32.4	--	--	19.8	--	--
Linalool	76.4	0.192a (0.182-0.203)	0.386a (0.350-0.421)	15.8	--	--	82.7	0.058c (0.051-0.065)	0.267a (0.214-0.319)
Methyl salicylate	44.6	--	--	55.1	--	--	64.8	--	--
□-Terpinene	63.8	--	--	61.0	--	--	55.7	--	--

^a Repellency Index (R.I.) = $[1-(T/C)] \times 100$ where T = total number of aphids on treated leaf after 24 hours and C = total number of aphids on control leaf after 24 hours (Gutierrez et al. 1997); Replications with less than 40% of aphid settlement were discarded for computation; EOs were applied at doses of 0.2 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$.

^{b,c} RD₅₀ and RD₉₀ are doses of compounds ($\mu\text{l}/\text{cm}^2$) that give R.I. values of 50 and 90, respectively. Doses were calculated in active products only (RI \geq 70 at 0.2 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$). RD₅₀ and RD₉₀ are followed by letters to indicate significant differences among treatments for each aphid. A 95% confidence interval was calculated. All calculations are made using the R package DRC (Ritz et al., 2015).

^d Values of RD₅₀ interval are below the lowest concentration used.

^e Values of RD₉₀ interval are above the highest concentration used.

Table 6. Comparison of repellent activity between the aphids, *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*, in each essential oil or pure compound.

	Essential oils	Aniseed	Basil	Coriander	Lemongrass	Peppermint		
	RD₅₀^a							
<i>Myzus persicae</i> (clone 1)		0.072a	0.087b	0.184a	0.100a	0.101a		
<i>Myzus persicae</i> (clone 2)		0.060b	0.110a	0.128b	0.047b	0.093a		
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>		0.081a	0.085b	--	0.039b	--		
	RD₉₀^a							
<i>Myzus persicae</i> (clone 1)		0.390a	0.159c	--	0.290a	-- ^c		
<i>Myzus persicae</i> (clone 2)		0.139c	0.220b	-- ^c	0.208b	-- ^c		
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>		0.210b	0.383a	-- ^c	0.285ab	--		
	Pure compounds	(<i>E</i>)-anethole	Carvone	Citral	Geraniol	Farnesol	(<i>Z</i>)-jasmone	Linalool
	RD₅₀^a							
<i>Myzus persicae</i> (clone 1)		0.065b	0.109a	0.126a	0.057a	0.037a	0.011a	0.192a
<i>Myzus persicae</i> (clone 2)		0.042c	0.094b	-- ^b	0.034c	-- ^b	-- ^b	--
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>		0.086a	--	0.029b	0.040b	0.022b	0.013a	0.058b
	RD₉₀^a							
<i>Myzus persicae</i> (clone 1)		0.152b	0.179b	0.277a	0.331a	0.126a	0.142b	0.386a
<i>Myzus persicae</i> (clone 2)		0.186a	0.210a	0.153b	0.117b	0.115ab	0.039a	--
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>		-- ^c	--	0.126b	0.141b	0.093b	0.123b	0.267b

^a Repellent doses 50 and 90 (RD₅₀ and RD₉₀) values (without confidence interval) followed by different letters in the columns indicate significant differences between aphids species or aphids clones. A 95% confidence interval was calculated. All calculations were made using the R package DRC (Ritz et al., 2015).

^b Values of RD₅₀ interval are below the lowest concentration used. RD₅₀ could not be compared with others.

^c Values of RD₉₀ interval are above the highest concentration used. RD₉₀ could not be compared with others.

Aphids

None of the compounds tested gave a significant response on *M. persicae* wingless adults (Fig. 2), and only farnesol was repellent ($P=0.012$) for *M. persicae* winged adults (Fig. 3). Likewise, farnesol and (*Z*)-jasmone induced repellency on wingless adults ($P=0.001$; $P<0.0001$, respectively), and winged adults ($P=0.027$; $P<0.0001$, respectively) of *M. euphorbiae* (Fig. 4 and 5). Although none of the aphid species exhibited a significant response to (*E*)-anethole and the mixture of (*E*)-anethole+farnesol (1:1) (Fig. 2, 3, 4, 5) in olfactometer tests.

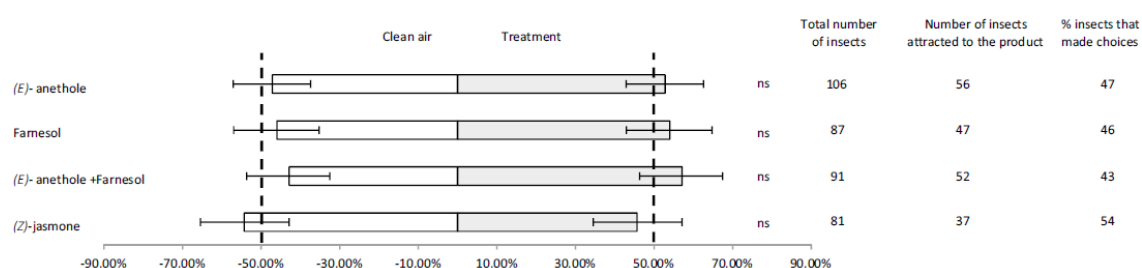


Fig. 2 Olfactometer (y-tube) response (%) of *Myzus persicae* (clone 1) wingless adult females (6 replications of 20 aphids each) to volatile products (10 μ l individually or 20 μ l (10+10) in binary mixture) after 5 min. Statistical significance according to Exact two-sided Binomial test ($*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$; ns $P>0.05$) and Clopper Pearson 95% confidence intervals.

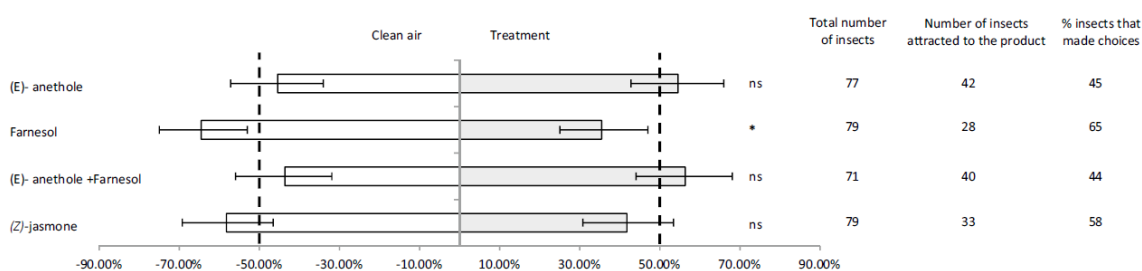


Fig. 3 Olfactometer (y-tube) response (%) of *Myzus persicae* (clone 1) alate adult females (6 replications of 20 aphids each) to volatile products (10 μ l individually or 20 μ l (10+10) in binary mixture) after 5 min. Statistical significance according to Exact two-sided Binomial test ($*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$; ns $P>0.05$) and Clopper– Pearson 95% confidence intervals.

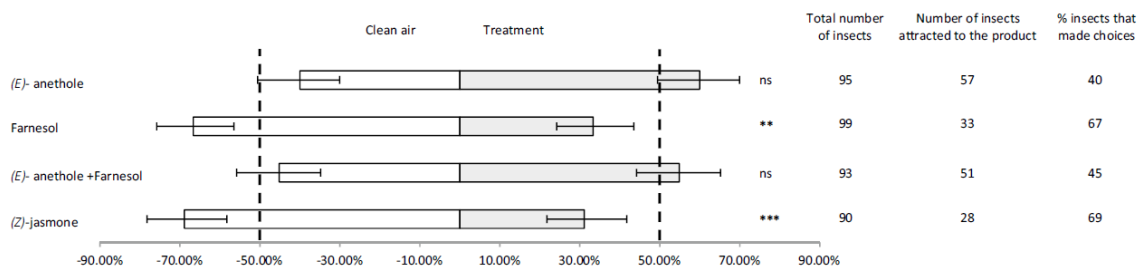


Fig. 4 Olfactometer (y-tube) response (%) of *Macrosiphum euphorbiae* wingless adult females (6 replications of 20 aphids each) to volatile products (10 μ l individually or 20 μ l (10+10) in binary mixture) after 5 min. Statistical significance according to Exact two-sided Binomial test (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; ns P >0.05) and Clopper–Pearson 95% confidence intervals.

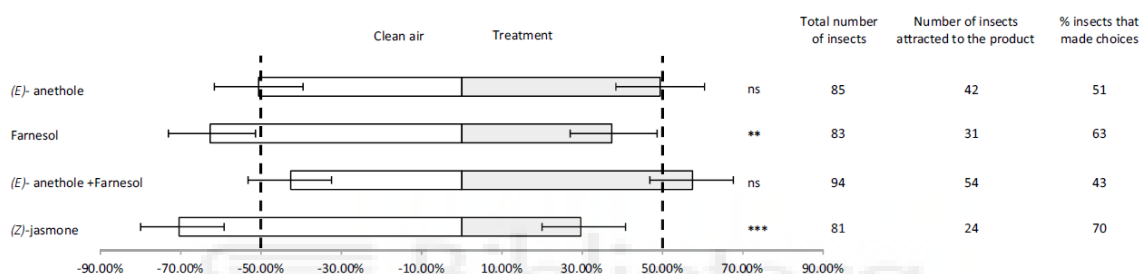


Fig. 5 Olfactometer (y-tube) response (%) of *Macrosiphum euphorbiae* alate adult females (6 replications of 20 aphids each) to volatile products (10 μ l individually or 20 μ l (10+10) in binary mixture) after 5 min. Statistical significance according to Exact two-sided Binomial test (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; ns P >0.05) and Clopper– Pearson 95% confidence intervals.

Natural enemies

Farnesol was attractive to larvae of *S. rueppellii* (P <0.01) (Fig. 6) and female adults of *A. colemani* (P <0.0001) (Fig. 7). Aniseed EO (P =0.011) and its main compound (*E*)-anethole (P <0.0001) had a significant repellent effect on larvae of *S. rueppellii* (Fig. 6), whereas citral (P <0.0001), (*Z*)-jasmone (P <0.0001) and methyl salicylate (P =0.001) were repellents to *A. colemani* (Fig. 7).

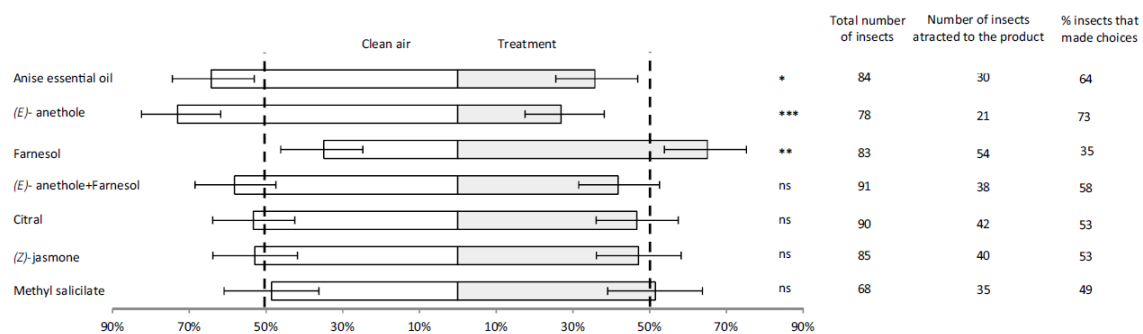


Fig. 6 Olfactometer (y-tube) response (%) of *Sphaerophoria rueppellii* L2 larvae (6 replications of 20 larvae each) to volatile products (10 μ l individually or 20 μ l (10+10) in binary mixture) after 5 min. Statistical significance according to Exact two-sided Binomial test (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; ns P >0.05) and Clopper– Pearson 95% confidence intervals.

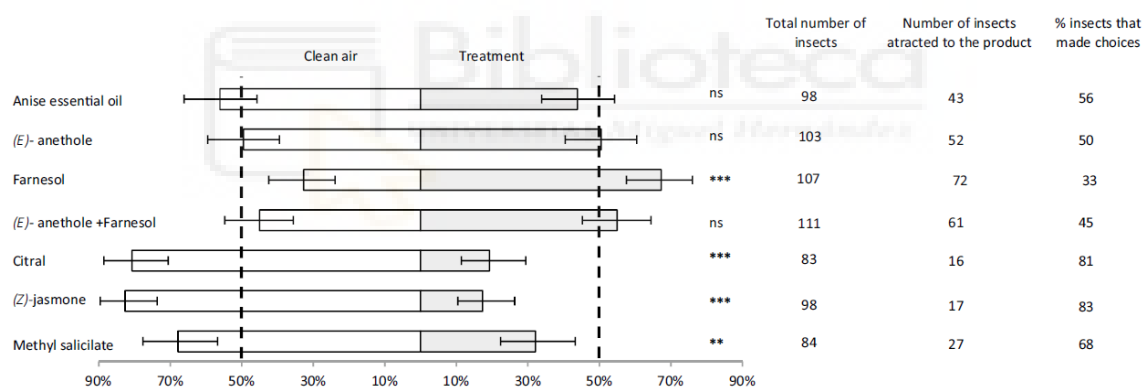


Fig. 7 Olfactometer (y-tube) response (%) of *Aphidius colemani* female adults (6 replications of 20 insects each) to volatile products (10 μ l individually or 20 μ l (10+10) in binary mixture) after 5 min. Statistical significance according to Exact two-sided Binomial test (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; ns P >0.05) and Clopper– Pearson 95% confidence intervals.

Toxicity

Contact toxicity in aphids

The plants used for the experiments presented equal initial populations of *M. persicae* (clone 1) or *M. euphorbiae*, counted as the average number of aphids per plant (± 65 and ± 35 , respectively) ($P > 0.05$) (Table 4), and were therefore considered suitable for the assay. Treatments at 0.2% (v/v) of essential oils were no produce damages to the plants.

In both species of aphids, spraying the nanoemulsions of farnesol and (*E*)-anethole+farnesol (1:1) reduced the population of insects at 96 h post-treatment in *M. euphorbiae* ($r_i = -0.16$ and -0.21 , respectively) and 72 h post-treatment in *M. persicae* ($r_i = -0.12$ and -0.13 , respectively). At 168 hours post treatment, the average number of aphids was higher than initially but much lower than the control in *M. persicae* ($F_{(4,45)} = 22.58$, $P = 0.000$) and *M. euphorbiae* ($F_{(4,45)} = 5.24$, $P = 0.0015$) (Table 4).

(*E*)-anethole causes a reduction in the population at 72 h ($r_i = -0.10$) and pauses the development of the colony at 168 h ($r_i = 0.14$) in *M. euphorbiae*. (*Z*)-jasmone also slowed down the development of the colonies of *M. persicae* compared with the control at 48 h ($P = 0.012$), although it does not cause a significant reduction in the number of aphids per plant (Table 4).

The binary mixture of (*E*)-anethole+farnesol (1:1) gave a high reduction in the instantaneous rate of population growth of *M. persicae* ($r_i = -0.78$) and *M. euphorbiae* ($r_i = -3, 85$) at 24 hours, although, at 168 h, the ratios of farnesol and (*E*)-anethole+farnesol (1:1) are similar for *M. persicae* (0.19 and 0.18, respectively) and *M. euphorbiae* (0.03 and 0.02, respectively) (Table 4).

Table 4. Aphid populations of *Myzus persicae* (clone 1) and *Macrosiphum euphorbiae* in pepper plants before and after (in hours) spraying with nanoemulsions.

Product	Number of aphids/plants ^a						C.E. (%) ^b					Instantaneous rate of population growth (ri) ^c					
	Initial	24	48	72	96	168 h.	24	48	72	96	168 h.	24	48	72	96	168 h.	
<i>Myzus persicae</i> (clone 1)	(E)-anethole 0.2%	68.3±6.37a	76.5±7.78a	98.7±9.25a	142.4±8.81 ^a	185.7±11.55a	>400a	0	0	0	0	0	0.10±0.05a	0.18±0.03a	0.25±0.02a	0.26±0.03a	0.26±0.02a
	Farnesol 0.2%	54±6.21a	33.8±3.98c	22.3±2.87c	37.8±4.10c	71.1±8.09c	197.4±20.23c	26.56	58.21	54.01	38.02	35.56	-0.47±0.11c	-0.46±0.07b	-0.12±0.04b	0.07±0.04b	0.19±0.02b
	(E)-anethole 0.2% + farnesol 0.2%	58.5±6.38a	27.8±3.61c	26.6±4.81c	41.1±6.23c	63.9±9.74c	211.2±24.85c	44.25	53.99	53.84	48.58	36.36	-0.78±0.12d	-0.43±0.08b	-0.13±0.05b	0.01±0.03b	0.18±0.02b
	(Z)-jasmone 0.2%	65.3±9.34a	56.3±8.91b	48.3±9.04b	55.3±11.82c	88.9±14.99c	326.6±30.66b	0	25.16	44.36	35.91	11.83	-0.19±0.07b	-0.26±0.15b	-0.14±0.08b	0.06±0.03b	0.24±0.02b
	Control (Tween80® 0.8%)	68.4±9.61a	58.37± 5.40b	48.3±9.05b	104.1±8.54b	145.3±10.33b	>400a	--	--	--	--	--	-0.08±0.10ab	0.02±0.04a	0.17±0.04a	0.21±0.03a	0.27±0.02a
	P value	0.6072ns	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001						<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0063
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	(E)-anethole 0.2%	33.2±3.30a	18.9±3.23b	48.3±9.06b	25.2±3.05b	35.6±7.01a	89.6±11.52a	27.88	20.29	25.42	17.48	6.31	-0.65±0.16a	-0.23±0.06a	-0.10±0.04a	-0.01±0.03a	0.14±0.01a
	Farnesol 0.2%	34.7±3.16a	10.60±2.11bc	48.3±9.07bc	14.3±2.50c	18.5±1.77b	54.2±9.95b	61.3	53.57	59.51	58.97	45.78	-1.38±0.25ab	-0.50±0.07b	-0.33±0.06b	-0.16±0.03b	0.03±0.05b
	(E)-anethole 0.2% + farnesol 0.2%	32.9±3.68a	7.50±1.75c	48.3±9.08c	13.3±3.17c	18.9±4.07b	51.5±11.68b	71.12	66.4	60.28	55.79	45.66	-3.85±2.23b	-0.77±0.15c	-0.40±0.10b	-0.21±0.08b	0.02±0.05b
	(Z)-jasmone 0.2%	32.9±3.38a	33.00±5.35a	48.3±9.09a	33.4±2.63ab	38.1±7.10a	97.6±13.83a	0	0	0.25	10.88	0	0.10±0.08a	-0.01±0.04a	0.01±0.02a	0.02±0.03a	0.15±0.02a
	Control (Tween80® 0.8%)	39.4±2.88a	31.10±4.09a	48.3±9.10a	40.1±5.68a	51.2±6.14a	113.5±12.44a	--	--	--	--	--	-0.31±0.15a	-0.12±0.08a	-0.03±0.07a	0.05±0.04a	0.14±0.02a
	P value	0.4667	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0005	0.0015						0.0620	<0.0001	<0.0001	0.0007	0.0064

^a Means (±SE) of aphids/plants followed by different letters within the column indicate significant differences among the treatments (ANOVA followed by LSD test; p>0.05; F value d.f. (4, 45).

^b C.E.: control efficacy calculated by means of Henderson and Tilton (1955) formula.

^c Instantaneous rate of population growth (ri) = ln (Nf/No)/ΔT where Nf is the number of aphids on each day after treatment, No is the initially number of aphids and ΔT are the days between them. Means (±SE) of ri followed by different letters within the column indicate significant differences among the treatments (ANOVA followed by LSD test; p>0.05; F value d.f. (4, 45).

Residual toxicity in natural enemies

The compounds were formulated as nanoemulsions ranging from 0.1 to 0.3% (v/v) (Table 5). Controls with water were carried out in each of the trials, resulting in a mortality of less than 10%.

There were no relevant side effects on the larvae of *S. rueppellii* (Table 5). No significant differences were found between products at the high doses ($P>0.05$). The mixture of (*E*)-anethole+farnesol (1:1) showed a slight toxicity, with mortalities of 37.5 and 20% at 48 h for 0.1 and 0.3%, respectively. However, mortality values were lower (usually <10%) when the pure compounds were applied alone (Table 5). Blending might favour penetration of the compounds through the insect cuticle and, therefore, the toxic effects.

Aphidius colemani was more sensitive to pure compounds than *S. rueppellii* (Table 5). The treatment with 0.1% (*Z*)-jasmone doubled the mortality recorded with *S. rueppellii* at 48 h, while at a dose of 0.2%, mortality increased to around 75%. High mortality (75,7 %) was also recorded in the treatment with 0.1% farnesol at 48 h ($P=0.0047$), that reached 100% when farnesol was applied at 0.2%. In the case of (*E*)-anethole, the mortality recorded was 37.1 % when applied at 0.1% and again 100% at 0.2%. The mixture of (*E*)-anethole and farnesol also gave mortalities above 75% at the lower dose and 100% when each compound was applied at 0.2% (Table 5). It is worth noting, finally, the high values of mortality recorded for *A. colemani* in the respective controls used (table 5).

Table 5. Residual contact toxicity of bioactive volatiles on natural enemies

Product % v/v	<i>S. rueppellii</i> (% larvae mortality) ^a		<i>A. colemani</i> (% adult mortality) ^b	
	24 h	48 h	24 h	48 h
(<i>Z</i>)-jasmone 0.1 %	7.5ab	22.5ab	10.8b	56.8ab
(<i>E</i>)-anethole 0.1%	2.5b	10.0ab	12.5b	37.1b
Farnesol 0.1%	7.5ab	17.5ab	27.0ab	75.7a
(<i>E</i>)-anethole 0.1% + farnesol 0.1%	27.5a	37.5b	47.2a	78.8a
Control (tween80® 0.4%)	2.5 b	5.0a	17.5ab	35.0b
(<i>Z</i>)-jasmone 0.2 %	5.0a	5.0a	28.2c	74.4b
(<i>E</i>)-anethole 0.2%	2.5a	7.5a	62.2b	94.4ab
Farnesol 0.2%	5.0a	10.0a	85.0ab	100.0a
(<i>E</i>)-anethole 0.2% + farnesol 0.2%	10.0a	10.0a	94.7a	100.0a
Control (tween80® 0.8%)	0.0a	5.0a	82.1ab	87.2ab
(<i>Z</i>)-jasmone 0.3 %	7.5a	12.5a	--	--
(<i>E</i>)-anethole 0.3%	2.5a	7.5a	--	--
Farnesol 0.3%	2.5a	2.5a	--	--
(<i>E</i>)-anethole 0.3% + farnesol 0.3%	17.5a	20.0a	--	--
Control (tween80® 1.2%)	0.0a	2.5a	--	--

^a Mean of Mortality (%) followed by different letters indicate significant differences between products within each natural enemy, dose, and time. Each dose value was calculated with eight replications with 5 larvae/rep. All calculations are made using R software.

^b Mean of Mortality (%) followed by different letters indicate significant differences between products within each natural enemy, dose, and time. Each dose value was calculated with 15 adults/rep. All calculations are made using R software.

Discussion

From our work, it can be concluded that some of the EOs studied (aniseed, basil and lemongrass) and natural compounds ((*E*)-anethole, farnesol, (*Z*)-jasmone, citral and geraniol) displayed clear repellent effects against the aphids of vegetables crops, *M. persicae* and *M. euphorbiae*. In our previous studies, a similar effect of these natural compounds was observed against the cereal aphid *R. padi*. However, basil, coriander, fennel and peppermint were not repellent to *R. padi* (Pascual-Villalobos et al. 2017).

The results of the olfactometer refer to an olfactive repellence in which a volatile action occurs. However, the repellency of the aphid settling inhibition assay refers more properly to a deterrence (Isman, 2019) in which it is not possible to differentiate its nature (antifeedant or other).

Some works show the toxic effect through contact of the anise and fennel EOs (Benelli et al. 2018; Pavela 2018) or by fumigant activity (Tunç and Şahinkaya 1998; Digilio et al. 2008) to aphids. Our results show a settling inhibition from (*E*)-anethole and aniseed EO. However, in the olfactometry assay, (*E*)-anethole does not act as an olfactive repellent for *M. persicae* and *M. euphorbiae*. For this reason, we suggest that the repellency attributed to EO rich in (*E*)-anethole and the compound described in this study and in previously published papers (Pascual-Villalobos et al. 2017, 2019, 2020) is due to a non-olfactive repellent effect (produced by a residual toxicity). Faraone et al. (2015) observed repellency against *M. persicae* when exposed to cabbage leaf discs treated previously with linalool, but no mortality was produced. However, the topical application of linalool on *M. persicae* causes mortality. This repellence may occur because linalool is toxic, but no produce mortality when insect is not exposed directly. In our results, the case of (*E*)-anethole is similar, because in our previous works we prove that mortality is produced in *M. persicae* (Pascual-Villalobos et al. 2020).

It can be proposed that aphids cannot perceive volatiles from (*E*)-anethole until it remains exposed for a long time or is in contact with it (even if it is residual). As for coriander and fennel, they have no effect against *M. euphorbiae*, while they do for *M. persicae*, despite the fact that one of the main compounds in fennel is (*E*)-anethole and this affected to all of them.

The highest repellency was obtained for the pure compounds, rather than the EOs. According to Deletre et al. (2016), the repellent effect of EOs results from one or several major compounds. In our results, this happens in the case of aniseed, which is less effective than its main compound, (*E*)-anethole, or lemongrass and its main compound, citral. This may be due to an antagonistic effect produced by other compounds present in the EO. For instance, Bruce et al. (2005) conclude that the repellent effect of (*E*)- β -farnesene (the main compound of the EO of *Hemizygia petiolata*) against *M. persicae* was lower than expected as a consequence of the presence of minor components in the oil, (+)-bicyclogermacrene and (-)-germacrene D.

Lemongrass EO and its main compound citral are repellent for vegetable aphids. Citral is a mixture of geranial + neral isomers and is reported to be repellent and deterrent for insects (Leal and Uchida 1998; Lü and Liu 2016; Plata-Rueda et al. 2020). In a two-choice bioassay, Gabryś et al. (2005) obtained a significant effect against *M. persicae* with ethanolic solutions of citral at 0.1% (v/v). Previously working on *R. padi* (Pascual-

Villalobos et al. 2017), a high repellency was obtained with citral. Geraniol is usually one of the major compounds in the EOs of citronella, geranium and roses (Tamagawa-Mineoka et al. 2007). In our results, it is one of the most repellent compounds in the two-choice bioassay. Gutiérrez et al. (1997) also obtained a repellent effect of geraniol on *M. persicae*. However, they obtained an RD_{50} of 47.13 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, equivalent to 0.0531 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ similar to the RD_{50} obtained in the present work (between 0.030 and 0.051 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ for all aphids), or in our previous work with *R. padi* with a RD_{50} of 0.044 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ (Pascual-Villalobos et al. 2017).

Farnesol and (*Z*)-jasmone are the compounds with the highest repellent effect in the two-choice bioassay. Farnesol repels the two forms of *M. euphorbiae*, but only winged adults of *M. persicae* in olfactometer bioassays are affected. This difference between wingless and winged adults of *M. persicae* may be explained by the type of antennal sensilla present in aphids. Nymphs and adults of aphids always have primary rhinarium (V and VI antennal segment) and winged forms can also have secondary rhinarium (III, IV and V antennal segments). In *M. euphorbiae*, both wingless and winged adults have primary and secondary rhinarium, while in the case of *M. persicae*, wingless adults only have the primary rhinarium (Shambaugh et al. 1978). The absence of secondary rhinarium in wingless adults of *M. persicae* may be the reason why they are not able to perceive farnesol.

Plants emit (*Z*)-jasmone when they are exposed to damage to plant tissue and this also acts as an elicitor of plant defenses (Dewhurst et al. 2012). (*Z*)-jasmone produced settling inhibition in both aphid species in the two-choice bioassay, however, volatiles only repelled *M. euphorbiae*. Birkett et al. (2000) obtained a repellency on the lettuce aphid *N. ribisnigri* in 4-arm olfactometer with 1 μg of (*Z*)-jasmone. Some authors have tested external applications of (*Z*)-jasmone on plants such as *Arabidopsis thaliana* (L.) to induce repellent signals against *M. persicae*. (*Z*)-jasmone treatments act as precursors to other repellent compounds (Bruce et al. 2008). However, these treatments are limited by the amount of compound that they are capable of releasing. Wheat plants treated with (*Z*)-jasmone showed repellency against *S. avenae* (Bruce et al. 2003), whereas repellency towards *M. persicae* in pepper plants treated with (*Z*)-jasmone could not be concluded (Dewhurst et al. 2012).

Farnesol is described as a juvenile hormone of *Tenebrio* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae), and other insects (Wigglesworth 1963); as a sex pheromone of mites emitted by deutonymphs (Sonenshine 1985); and also as an ant repellent (Shorey et al. 1996); or honeybee attractant (Williams et al. 1981). Our results show a clear olfactive repellence and settling inhibition in aphids. Few works have studied the effect of farnesol on aphids, using *M. persicae* as the model species. Gutierrez et al. (1997) also obtained a repellent effect from farnesol in the choice bioassay on *M. persicae*. Dancewicz et al. (2010) also studied the effect of farnesol and some of its structural derivatives in a two-choice bioassay similar to ours on *M. persicae*. A repellence against aphids is generated by the aphid alarm pheromone (*E*)- β -farnesene, which alerts them about a danger, but also alerts natural enemies about the aphid's presence (Micha and Wyss 1996). (*E*)- β -farnesene is a compound structurally related to farnesol and both belong to the same farnesene family (sesquiterpenes) (Tesh et al. 1992). Many papers have studied the effect of (*E*)- β -farnesene on aphids, but few have studied farnesol. In 4-arm olfactometry tests with winged adults of *M. persicae*, repellence was obtained with a 7 μ l treatment of synthetic (*E*)- β -farnesene (Bruce et al. 2005). Micha and Wyss (1996) also report repellent effects from (*E*)- β -farnesene against *Sitobion avenae* in Y-tube olfactometer bioassays at a dose of 5.7 μ g. Our results show a clear repellency by farnesol, like the repellent effect generated by (*E*)- β -farnesene and reported in the literature.

There are not many studies on the effect of EOs on natural enemies. In this work, the EO of aniseed and (*E*)-anethole repels *S. rueppellii*, while citral, (*Z*)-jasmone and methyl salicylate repelled *A. colemani*. Until now, it was unclear whether the larva species from the genus *Sphaerophoria*, possessed organs specialized for detecting odours (Rotheray and Gilbert 2011), but now, with our research, this has been confirmed: syrphid larvae do indeed have olfactory abilities. This is a significant finding which may stimulate further research.

On the other hand, farnesol attracts *A. colemani* and *S. rueppellii* in our olfactometer bioassays. Ma et al. (2017), in two-way olfactometer tests obtained an attractive effect for farnesol on the mirid *Campylomma chinensis* Schuch (Hemiptera: Miridae), an omnivorous generalist predator that can prey on aphids. Other authors studied the effect of (*E*)- β -farnesene on parasitoids (Micha and Wyss 1996; Heuskin et al. 2012; Zhang et al. 2020) and predators of aphids (Francis et al. 2004). In these works,

(*E*)- β -farnesene acts as an attractant for natural enemies. Again, our results show that farnesol acts in a similar way to (*E*)- β -farnesene.

In all olfactometer tests, farnesol loses its repellent or attractive effect when it is mixed with (*E*)-anethole. These findings agree with those described by Dawson et al. (1984) who observed that hop plants (*Humulus lupulus*) were readily colonised by aphids in spite of the fact that its EO contains (*E*)- β -farnesene as a major component. They concluded that the presence of the sesquiterpene (-)- β -caryophyllene in the hop EO was responsible for the inhibition of the effect of (*E*)- β -farnesene. In our case, (*E*)-anethole may act in a similar manner inhibiting the effect of farnesol.

We have found that the aphid response to certain EOs and pure compounds is species-specific and even clone-specific. For example, lavandin and fennel only repel *M. persicae* while caryophyllene is repellent only for *M. euphorbiae*. Whereas on *M. persicae*, clone 2 is repelled by lavandin EO and clone 1 by fennel EO. In terms of the activity of the products or the repellent doses, this suggests that there might be morphological or physiological differences in the insect receptors that might explain the differences. Mezei et al. (2020) obtained significant differences when comparing the susceptibility of 13 field populations of *M. persicae* against imidacloprid treatments in a laboratory bioassay. Other authors also reported differences in the responses between clones of *M. persicae* and *A. pisum* to the same treatment (Guilbaud and Khudr, 2020; Yan et al. 2020).

In the contact toxicity bioassay performed on aphids, the most effective treatments were farnesol and its mixture with (*E*)-anethole (1:1). Blending both compounds increased the activity in short treatments times, synergistic effects were not detected. Gutierrez et al. (1997) also observed mortality of *M. persicae* treated with farnesol in residual toxicity bioassays. Bruce et al. (2003) obtained a reduction of the intrinsic ratio of population growth of the aphid *Sitobion avenae* by treating wheat plants previously with (*Z*)-jasmane. In our case, the treatment with (*Z*)-jasmane also reduced the growth rate of *M. persicae* with respect to the control, being negative during the first 72 hours due to the mortality caused.

In summary, the results presented in this work show that EOs and certain pure compounds may be of interest as part of integrated control strategies to manage aphid populations in Mediterranean crops. Anyway, further efforts to improve formulations and the application method are still required, especially when these control strategies are to be implemented under field conditions.

Acknowledgements

This work was funded by the research projects (INIA RTA2014-00001 and INIA RTA2017-00001) supported by the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA, Spain), FEDER funds and CGL2016-79054 supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation. Manuel Cantó acknowledges financial support from the predoctoral research fellowship INIA CDP2016-0092 (funded by INIA, Spain), and the kind assistance of Santiago González and Miguel Ocaña during the experiments. Thanks to CIBIO Research Institute of University of Alicante where olfactometer bioassays were carried out.

Authors' contributions

Conceptualization and methodology: MC-T PG MJP-V VFO JLC MAM-G. Performed experiment: MC-T. MC-T and PG analyzed the data. Writing original draft preparation: MC-T. All authors contributed critically to the drafts and gave final approval for publication.

Declarations Funding

This study was funded by: Research projects INIA RTA2014-00001 and INIA RTA2017-00001, supported by the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA, Spain). Research project CGL2016-79054 supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation. Manuel Cantó-Tejero received a predoctoral research fellowship INIA CDP2016-0092 funded by the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA, Spain). The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of the data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Amorós-Jiménez R, Robert CA, Marcos-García MÁ, Fereres A, Turlings TC (2015) A differential role of volatiles from conspecific and heterospecific competitors in the selection of oviposition sites by the aphidophagous hoverfly *Sphaerophoria rueppellii*. *J Chem Ecol* 41:493-500. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-015-0583-9>
- Ben Issa R, Gautier H, Gomez L (2017) Influence of neighbouring companion plants on the performance of aphid populations on sweet pepper plants under greenhouse conditions. *Agric For Entomol* 19:181-191. <http://dx.doi.org/10.1111/afe.12199>
- Benelli G, Pavela R, Petrelli R, Cappellacci L, Canale A, Senthil-Nathan S, Maggi F (2018) Not just popular spices! Essential oils from *Cuminum cyminum* and *Pimpinella anisum* are toxic to insect pests and vectors without affecting non-target invertebrates. *Ind Crops Prod* 124:236- 243. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.048>
- Birkett MA, Campbell CA, Chamberlain K, Guerrieri E, Hick AJ, Martin JL, Matthes M, Napier JA, Pettersson J, Pickett JA, Poppy GM, Pow EM, Pye BJ, Smart LE, Wadhams GH, Wadhams LJ, Woodcock CM (2000) New roles for *cis*-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. *PNAS* 97:9329-9334. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.160241697>
- Blackman RL, Eastop FE (2017) Taxonomic Issues. In: HF van Emden, R Harrington (Eds) *Aphids as crop pests*. CABI, Wallingford pp.1-36
- Bruce TJ, Birkett MA, Blande J, Hooper AM, Martin JL, Khambay B, Prosser I, Smart LE, Wadhams LJ (2005) Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. *Pest Manag Sci* 61:1115-1121. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.1102>
- Bruce TJ, Martin JL, Pickett JA, Pye BJ, Smart LE, Wadhams LJ (2003) *cis*-Jasmone treatment induces resistance in wheat plants against the grain aphid, *Sitobion avenae* (Fabricius) (Homoptera: Aphididae). *Pest Manage Sci* 59:1031-1036. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.730>

- Bruce TJ, Matthes MC, Chamberlain K, Woodcock CM, Mohib A, Webster B, Smart LE, Birkett MA, Pickett JA, Napier JA (2008) *cis*-Jasmone induces *Arabidopsis* genes that affect the chemical ecology of multitrophic interactions with aphids and their parasitoids. PNAS 105:4553-4558. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0710305105>
- Calvo FJ, Bolckmans K, Belda JE (2012) Biological control-based IPM in sweet pepper greenhouses using *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae). Biocontrol Sci Technol 22:1398-1416. <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2012.731494>
- Calvo-Agudo M, González-Cabrera J, Sadutto D, Picó Y, Urbaneja A, Dicke M, Tena A (2020) IPM- recommended insecticides harm beneficial insects through contaminated honeydew. Environ Pollut 267:115581. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115581>
- Cressey D (2017) Neonics vs bees. Nature 551:156-158. <http://dx.doi.org/10.1038/551156a>
- Dáder B, Colomer I, Adán Á, Medina P, Viñuela E (2019) Compatibility of early natural enemy introductions in commercial pepper and tomato greenhouses with repeated pesticide applications. Insect Sci 27:1111-1124. <http://dx.doi.org/10.1111/1744-7917.12723>
- Dancewicz K, Gliszczynska A, Halarewicz A, Wawrzenczyk C, Gabrys B (2010) Effect of farnesol and its synthetic derivatives on the settling behaviour of the peach potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.). Pesticide Pesticides (1-4).
- Dardouri T, Gautier H, Ben Issa R, Costagliola G, Gomez L (2019) Repellence of *Myzus persicae* (Sulzer): Evidence of two modes of action of volatiles from selected living aromatic plants. Pest Manage Sci 75:1571-1584. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.5271>
- Dawson GW, Griffiths DC, Pickett JA, Smith MC, Woodcock CM (1984) Natural inhibition of the aphid alarm pheromone. Entomol Exp Appl 36:197-199.1. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1570-7458.1984.tb03427.x>
- Deletre E, Chandre F, Barkman B, Menut C, Martin T (2016) Naturally occurring bioactive compounds from four repellent essential oils against *Bemisia tabaci* whiteflies. Pest Manage Sci 72:179-189. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3987>
- Dewar AM, Denholm I (2017) Chemical control. In: HF van Emden, R Harrington (Eds) Aphids as crop pests. CABI, Wallingford pp.398-426.

- Dewhurst SY, Birkett MA, Loza-Reyes E, Martin JL, Pye BJ, Smart LE, Hardie J, Pickett JA (2012) Activation of defence in sweet pepper, *Capsicum annum*, by *cis*-jasmane, and its impact on aphid and aphid parasitoid behaviour. *Pest Manage Sci* 68:1419-1429. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3326>
- Digilio MC, Mancini E, Voto E, De Feo V (2008) Insecticide activity of Mediterranean essential oils. *J Plant Interact* 3:17-23. <http://dx.doi.org/10.1080/17429140701843741>
- Du Y, Poppy GM, Powell W, Pickett JA, Wadhams LJ, Woodcock CM (1998) Identification of semiochemicals released during aphid feeding that attract parasitoid *Aphidius ervi*. *J Chem Ecol* 24:1355-1368. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1021278816970>
- Faraone N, Hillier NK, Cutler GC (2015) Plant essential oils synergize and antagonize toxicity of different conventional insecticides against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *PloS one*, 10: e0127774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127774>
- Francis F, Lognay G, Haubruge E (2004) Olfactory responses to aphid and host plant volatile releases: (*E*)- β -farnesene an effective kairomone for the predator *Adalia bipunctata*. *J Chem Ecol* 30:741-755. <http://dx.doi.org/10.1023/B:JOEC.0000028429.13413.a2>
- Gabryś B, Dancewicz K, Halarewicz-Pacan A, Janusz E (2005) Effect of natural monoterpenes on the behaviour of the peach potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.). *IOBC/WPRS Bull* 28:29-34.
- Guilbaud CSE, Khudr MS (2020) Disturbance and competition drive diversity effects in cabbage– aphid–onion systems with intra-specific genetic variation. *Bull Entomol Res* 110:123-135. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007485319000373>
- Gutiérrez C, Fereres A, Reina M, Cabrera R, González-Coloma A (1997) Behavioral and Sublethal Effects of Structurally Related Lower Terpenes on *Myzus persicae*. *J Chem Ecol* 23:1641- 1650. <http://dx.doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006428.00568.c5>
- Henderson CF, Tilton EW (1955) Tests with acaricides against the brown wheat mite. *J Econ Entomol* 48:157-161.

- Heuskin S, Lorge S, Godin B, Leroy P, Frère I, Verheggen FJ, Haubruge E, Wathelet JP, Mestdagh M, Hance T, Lognay G (2012) Optimisation of a semiochemical slow-release alginate formulation attractive towards *Aphidius ervi* Haliday parasitoids. *Pest Manage Sci* 68:127- 136. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.2234>
- Hori M (1996) Settling inhibition and insecticidal activity of garlic and onion oils against *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). *Appl Entomol Zool* 31:605-612. <http://dx.doi.org/10.1303/aez.31.605>
- Hori M, Komatsu H (1997) Repellency of rosemary oil and its components against the onion aphid, *Neotoxoptera formosana* (Takahashi) (Homoptera, Aphididae). *Appl Entomol Zool* 32:303- 310. <http://dx.doi.org/10.1303/aez.32.303>
- Hori M (1999a) Role of host plant odors in the host finding behaviors of aphids. *Appl Entomol Zool* 34:293-298. <http://dx.doi.org/10.1303/aez.34.293>
- Hori M (1999b) Antifeeding, settling inhibitory and toxic activities of labiate essential oils against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). *Appl Entomol Zool* 34:113-118. <http://dx.doi.org/10.1303/aez.34.113>
- Isman MB (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol* 51:45-66. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>
- Isman MB (2019) Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. *Phytochem Rev* 19:235-241. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-019-09653-9>
- Leal WS, Uchida K (1998) Application of GC-EAD to the determination of mosquito repellents derived from a plant, *Cymbopogon citratus*. *J Asia-Pac Entomol* 1:217-221. [http://dx.doi.org/10.1016/S1226-8615\(08\)60022-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1226-8615(08)60022-9)
- Lü J, Liu S (2016) The behavioral response of *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae) to citronellal, citral, and rutin. *SpringerPlus* 5:1-7. <http://dx.doi.org/10.1186/s40064-016-2553-2>
- Ma FM, Zheng LX, Gao ZZ, Wu WJ (2017) Farnesol, a synomone component between lantana (Lamiales: Verbenaceae) and the omnivorous predator, *Campylomma chinensis* Schuh (Hemiptera: Miridae). *Arthropod-Plant Interact* 11:703-708. <http://dx.doi.org/10.1007/s11829-017-9523-7>

Mead-Briggs MA, Brown K, Candolfi MP, Coulson MJM, Miles M, Moll M, Nienstedt K, Schuld M, Ufer A, McIndoe E (2000) A laboratory test for evaluating the effects of plant protection products on the parasitic wasp, *Aphidius rhopalosiphi* (DeStephiani-Perez) (Hymenoptera: Braconidae). In Candolfi MP, Blümel S, Foster R, Bakker FM, Grimm C, Hassan SA, Heimbach U, Mead-Briggs MA, Reber B, Schmuck R, Vogt H (eds) Guidelines to evaluate side-effects of plant protection products to non-target arthropods, IOBC/WPRS, Gent, pp.13-25.

Mezei I, Bielza P, Siebert MW, Torne M, Gomez LE, Valverde-Garcia P, Belando A, Moreno I, Grávalos C, Cifuentes D, Sparks TC (2020). Sulfoxaflor efficacy in the laboratory against imidacloprid-resistant and susceptible populations of the green peach aphid, *Myzus persicae*: Impact of the R81T mutation in the nicotinic acetylcholine receptor. Pesticide Biochemistry and Physiology 166: 104582. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104582>

Micha SG, Wyss U (1996) Aphid alarm pheromone (*E*)- β -farnesene: A host finding kairomone for the aphid primary parasitoid *Aphidius uzbekistanicus* (Hymenoptera: Aphidiniinae). Chemoecology 7:132-139. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01245965>

Nakazawa M, Nakazawa MM (2019) Package ‘fmsb’. Retrived from <https://cran.r-project.org/web/packages/fmsb/fmsb.pdf>.

Pascual-Villalobos MJ, Cantó-Tejero M, Vallejo R, Guirao P, Rodríguez-Rojo S, Cocero MJ (2017) Use of nanoemulsions of plant essential oils as aphid repellents. Ind Crops Prod 110:45-57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.019>

Pascual-Villalobos MJ, Guirao P, Díaz-Baños FG, Cantó-Tejero M, Villora G (2019) Oil in water nanoemulsion formulations of botanical active substances. In: Koul O (ed) Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives, Academic Press, London pp.223-247.

Pascual-Villalobos MJ, Cantó-Tejero M, Guirao P, López MD (2020) Fumigant Toxicity in *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae): Controlled Release of (*E*)-anethole from Microspheres. Plants 9:124. <http://dx.doi.org/10.3390/plants9010124>

Pavela R (2018) Essential oils from *Foeniculum vulgare* Miller as a safe environmental insecticide against the aphid *Myzus persicae* Sulzer. Environ Sci Pollut Res 25:10904-10910. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-1398-3>

Payton Miller TL, Rebek EJ (2018) Banker plants for aphid biological control in greenhouses. *J Integr Pest Manage* 9:9. <http://dx.doi.org/10.1093/jipm/pmy002>

Plata-Rueda A, Martínez LC, da Silva Rolim G, Coelho RP, Dos Santos MH, de Souza Tavares W, Zanuncio JC, Serrão JE (2020) Insecticidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its terpenoids (citral and geranyl acetate) against *Ulomoides dermestoides*. *Crop Prot* 107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105299>

Ribeiro LP, Akhtar Y, Vendramim JD, Isman MB (2014) Comparative bioactivity of selected seed extracts from Brazilian *Annona* species and an acetogenin-based commercial bioinsecticide against *Trichoplusia ni* and *Myzus persicae*. *Crop Prot* 62:100-106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.013>

Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D (2015) Dose-response analysis using R. *PloS one* 10:e0146021. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>

Rodrigues ARS, Ruberson JR, Torres JB, Siqueira HÁA, Scott JG (2013) Pyrethroid resistance and its inheritance in a field population of *Hippodamia convergens* (Guérin-Méneville) (Coleoptera: Coccinellidae). *Pestic Biochem Physiol* 105:135-143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.01.003>

Rotheray GE, Gilbert F (2011) *The Natural History of Hoverflies*, Ed. by Rotheray GE and Gilbert F Forrest Text, Ceredigion, pp333.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Shambaugh GF, Frazier, JL, Castell AE, Coons LB (1978) Antennal sensilla of seventeen aphid species (Homoptera: Aphidinae). *Int J Insect Morphol Embryol* 7:389-404. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7322\(78\)80001-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7322(78)80001-4)

Shorey HH, Gaston LK, Gerber RG, Sisk CB, Phillips PA (1996) Formulating farnesol and other ant-repellent semiochemicals for exclusion of Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae) from citrus trees. *Environ Entomol* 25:114-119. <http://dx.doi.org/10.1093/ee/25.1.114>

Simon JC, Peccoud J (2018) Rapid evolution of aphid pests in agricultural environments. *Curr Opin Insect Sci* 26:17-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2017.12.009>

Sonenshine DE (1985) Pheromones and other semiochemicals of the Acari. *Annu Rev Entomol* 30:1- 28. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.30.010185.000245>

Stark JD, Banks JE (2003) Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annu Rev Entomol* 48:505-519. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112621>

Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Kishimoto S (2007) Allergic contact cheilitis due to geraniol in food. *Contact Der* 56:242-243. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.00973.x>

Tesh RB, Guzman H, Wilson ML (1992) Trans-beta-farnesene as a feeding stimulant for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 29:226-231. <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/29.2.226>

Tunç I, Şahinkaya Ş (1998) Sensitivity of two greenhouse pests to vapours of essential oils. *Entomol Exp Appl* 86:183-187. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00279.x>

Vaello T, Casas JL, Pineda A, de Alfonso I, Marcos-García, MÁ (2017) Olfactory response of the Predatory Bug *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anthocoridae) to the aggregation pheromone of its prey, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Environ Entomol* 46:1115- 1119. <http://dx.doi.org/10.1093/ee/nvx141>

Wigglesworth VB (1963) The juvenile hormone effect of farnesol and some related compounds: quantitative experiments. *J Insect Physiol* 9:105-119. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1910\(63\)90087-8](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1910(63)90087-8)

Williams IH, Pickett JA, Martin AP (1981) The Nasonov pheromone of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Part II. Bioassay of the components using foragers. *J Chem Ecol* 7:225-237. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00995745>

Yan HY, Guo HG, Sun YC, Ge F (2020) Plant phenolics mediated bottom-up effects of elevated CO₂ on *Acyrtosiphon pisum* and its parasitoid *Aphidius avenae*. *Insect Sci.* 27: 170-184. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12627>

Zhang H, Huang XZ, Jing WX, Liu DF., Dhiloo KH, Hao ZM, Zhang YJ (2020) Two farnesyl pyrophosphate synthases, GhFPS1–2, in *Gossypium hirsutum* are involved in the biosynthesis of farnesol to attract parasitoid wasps. *J Integr Agric* 19:2274-2285. [http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63203-8](http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63203-8)

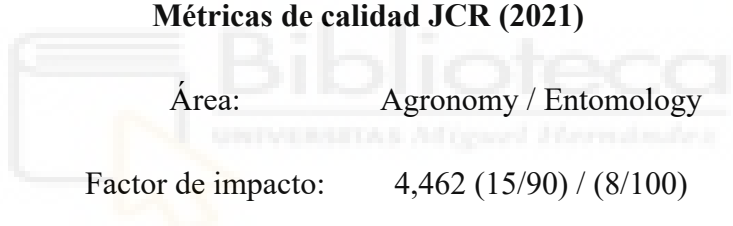
4.2. Publicación 2

Aphicidal activity of farnesol against
the green peach aphid – *Myzus persicae*

Manuel Cantó-Tejero, Pedro Guirao, María Jesús Pascual-Villalobos

Pest Management Science **78**(6):2714-2721 (2022)
[DOI:10.1002/ps.6902](https://doi.org/10.1002/ps.6902)

Métricas de calidad JCR (2021)



Área: Agronomy / Entomology
Factor de impacto: 4,462 (15/90) / (8/100)
Cuartil: Q1

Aphicidal activity of farnesol against the green peach aphid – *Myzus persicae*

Manuel Cantó-Tejero, Pedro Guirao, María Jesús Pascual-Villalobos

Abstract

BACKGROUND: *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) is considered one of the most important agricultural pests in the world. It is one of the main pests in protected pepper crops under glasshouse conditions in Southeastern Spain, but its control is limited as a consequence of the few available authorized insecticides and their incompatibility with the natural enemies. Some essential oils and pure compounds such as anise (*Pimpinella anisum*) or farnesol are repellent and/or toxic to aphids. Their use as botanical insecticides can be an alternative for aphid control in pepper.

RESULTS: The effect of farnesol was evaluated against *M. persicae* in a new bioassay developed to test the contact effect (aqueous formulation of the products) on aphids in laboratory conditions. Aniseed essential oil, geraniol and (*Z*)-jasnone at 0.6% causes an aphid mortality of >50%; and farnesol was the most effective (93.67% of mortality). Farnesol nanoemulsions between 0.2-0.6% were formulated with an IKA-Labor Pilot dispersing machine (7940 rpm for 10 min) using Tween 80 as a surfactant. These formulations were tested on field experiments (glasshouse conditions) on pepper crops for 2 years. Foliar applications of farnesol at a concentration of 0.4% on field conditions causes a high reduction in aphid populations, with efficacies between ≈70-80% with respect to the control, similar to or even higher than the efficacy of the reference pyrethrin insecticide.

CONCLUSION: Farnesol showed a great aphicidal effect against *M. persicae*. The use of this molecule in integrated pest management programs combined with natural enemies is a good option for the future control of *M. persicae*.

Keywords: *Capsicum annuum*, botanical insecticide, aphids, farnesol, essential oils, integrated pest management

1. Introduction

Myzus persicae (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) is considered one of the 15 aphid species of most agricultural importance in the world. It is cosmopolitan, polyphagous and a greatly efficient virus vector (persistent and nonpersistent viruses)¹. *Myzus persicae* has developed resistance to different insecticide groups (carbamates, nicotine, neonicotinoids, organochlorines, organophosphates, pyrethroids and benzoylphenyl ureas) making its control difficult².

This aphid is one of the main pests in protected pepper crops under glasshouse conditions in Southeastern Spain³. On pepper crops, aphids are managed with biological control (parasitoids and predators) and chemical treatments³⁻⁵. The use of chemicals is limited as a consequence of the few available authorized insecticides and uncertain compatibility with natural enemies⁶.

Essential oils (EOs) and their pure compounds are a potential source for the development of botanical insecticides against pests. The literature shows the repellent and/or insecticidal effects of EOs against different insects such as aphids,⁷⁻⁹ whiteflies,¹⁰ caterpillars,^{11, 12} stored product pests,^{13, 14} among others.

In previous works, we studied the repellent and/or insecticidal effects of different EOs and pure compounds on various aphid species: *Rhopalosiphum padi* (L.), *Nasonovia ribisnigri* (Mosley), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) and *M. persicae*.¹⁵⁻¹⁹ The results of these works show a different response in some cases (repellent and/or aphicidal effect) among these aphids species for a same product.

In this work, we studied the toxic effect of three EOs (aniseed, fennel, and coriander) and seven pure compounds [(*E*)-anethole, D-Carvone, citral, farnesol, geraniol, linalool and (*Z*)-jasmone] nanoformulations against *M. persicae* with a contact toxicity laboratory bioassay. (*E*)-anethole is the main compound of aniseed (96.9%) and fennel (30.9%) EOs and linalool (69.9%) of coriander EO. Essential oils and pure compounds were selected based on the repellent effect on *M. persicae* and *M. euphorbiae* determined previously¹⁸. The aphicidal effect of farnesol nanoemulsions were tested against *M. persicae* in pepper crops grown in pots (two experiments) and soil (three experiment) in glasshouse conditions during 2020 and 2021. The phytotoxic effect of farnesol nanoemulsions on the pepper plants also was assessed in all the experiments.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Insects

Myzus persicae (red clone) was collected in Campo de Cartagena (Murcia, Spain) from pepper plants in 2016. The aphids were reared in a growth chamber (25±1 °C, 65% RH and 16 h:8 h, light:dark photoperiod) on pepper plants (*Capsicum annuum* L., cv Herminio; Syngenta US, Greensboro, NC, USA) for several generations. All the aphids used in the experiments from laboratory cultures were female adults.

2.2. Essential oils and pure compounds nanoemulsions

Aniseed (*Pimpinella anisum* L.), fennel (*Foeniculum vulgare* Miller) and coriander (*Coriandrum sativum* L.) (Apiaceae) EOs were obtained from Distilleries Muñoz Gálvez S.A. Company (Murcia, Spain). Essential oils compositions were analyzed in a previous work¹⁵.

Seven pure compounds were tested: (*E*)-anethole 99% (phenylpropanoid), D-Carvone (monoterpenic ketone), citral 95% (monoterpenic aldehyde), farnesol 95% (alcohol), geraniol, linalool (monoterpenic alcohols) and (*Z*)-jasmone. Pure compounds were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, Mo, USA).

Essential oils and pure compounds were formulated in an oil in water (O/W) nanoemulsion with Tween80™ (Polysorbate 80) as a nonionic surfactant (Panreac, Barcelona, Spain) at a 1:2 ratio (Essential oil: surfactant). The components were emulsified using a laboratory dispersing machine (IKA-Labor Pilot 2000/4, IKA-Werke GmbH, and Co., Staufen, Germany) at 7940 rpm for 10 min.

2.3. Contact toxicity bioassay

Aphids were treated using a computer-controlled spraying apparatus (CCSA) (Burkard Manufacturing Co. Ltd., Rickmansworth, UK) operating at 5 psi and 6v (2 µL cm⁻²) (equivalent application of 200 L ha⁻¹). Essential oils and pure compounds were applied at a concentration of 0.6% (v/v) (0.6% EO+ 1.2% of Tween™ 80) for the initial screening. Groups of five Petri dishes (nine cm² diameter) were replicated three times (on different days) for each concentration and each product. Aphids (20 wingless female adults) were released on pepper leaf discs (nine cm² diameter) placed on agar at 1% (w/v)

before the treatments. Tween™ 80 at a concentration of 1.2% (with the same number of aphids used for each product) was used as the control. Mortality was assessed with a fine brush at 24 and 48 hours.

For the products that resulted in a mortality >70% in the initially screening (only farnesol did), four concentrations ranging from 0.2 to 0.6% (v/v) were selected to calculate lethal concentrations killing 50% and 90% (LC₅₀ and LC₉₀).

2.4. Glasshouse experiments

2.4.1 Glasshouse experiments in pots

Semi-field experiments were conducted during spring on two consecutive years (2020 and 2021) in a glasshouse at the Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA) (37° 56' 18.1'' N, 1° 08' 01.1'' W) (Murcia, Spain). Plants of the *Capsicum annuum* cultivar Herminio (Syngenta US) were grown in 2.5-L pots filled with a mixture of peat (Klasmann TS3, Klasmann-Deilmann GmbH, Saterland, Germany) and perlite (Projar, S.A. Co., Valencia, Spain) (3:1). Plants were watered twice a week and fertilized with NPK (15-15-15).

In the first experiment (2020), aniseed EO, (*E*)-anethole and farnesol were tested at 0.6% (v/v). In the second experiment (2021), only farnesol at concentrations of 0.4 and 0.6% (v/v) was evaluated. In each experiment, pyrethrins (Pirecris®, Seipasa Co., Valencia, Spain) at 0.4% were used as a reference insecticide, and Tween™ 80 (at the same concentration as the highest dose of EO nanoemulsions in each experiment), as a control.

Essential oil nanoemulsions were prepared at a concentration of 2% (v/v) and then diluted to the test concentrations. Nanoemulsions were sprayed using a hand sprayer (Polita7, Matabi, Goizper Group, Gipuzkoa, Spain) at a rate of ~80 mL plant⁻¹.

A randomized block design with three replications (10 plants/treatment each) was used. Ten female adults of *M. persicae* were released on each plant one week before the first count. The number of aphids were counted one day before the first treatment (D -1), and then at D1, D2, D3 and D6.

2.4.2 Glasshouse experiments in soil

Three field experiments were conducted in two consecutive years (2020 and 2021) at the Torreblanca experimental station (37° 46' 36.8" N, 0° 53' 49.7" W) (Torrepacheco, Murcia, Spain). The *C. annuum* cultivar Herminio (Syngenta US) was used. Pepper plants were cultivated in two 40-m² glasshouses at a density of 5 plants m⁻². A randomized block design with two replications was performed (one in each glasshouse). Each experiment included three treatments: pyrethrins as a reference product (Pirecris®, Seipasa Co.) at 0.4%, and two different concentrations of farnesol. Tween™ 80 was used as a control. Each treatment was evaluated on 32 pepper plants (16 plants in each replication). Farnesol nanoemulsions were evaluated at concentrations of 0.2% (experiments 2 and 3), 0.4% (all experiments) and 0.6% (v/v) (experiment 1).

Farnesol nanoemulsions were prepared at 2% (v/v) and diluted to the test dose just before the treatment. A backpack sprayer (Super 16, Matabi, Goizper Group) at a rate of 250 mL plant⁻¹ was used to treat the plants.

One pepper leaf with aphids (~20 female adults) from a laboratory colony was placed on each plant one week before the first count. The number of aphids were counted one day before the first treatment (D-1), and then D1, D2 and D7 post-treatment. Natural enemies of aphids were observed on the pepper plants before and after the treatments.

2.5. Statistical analysis

The data from the contact toxicity bioassay were analyzed using Polo Plus (LeOra Software, Berkeley, CA, USA). The data were subjected to logit analysis corrected with control mortality.

The data from glasshouse experiments were analyzed using “R” software, v4.0.5.²⁰ The data were adjusted to a negative binomial model, using the `glm.nb` function of the MASS package,²¹ where the number of aphids per plant was the variable response, and the treatment and the block, the factors. The significance of the treatment factor was verified by comparing this model with the restricted model (without the treatment factor), using the `anova.negbin` function of the same package. Pairwise comparisons of estimated marginal means among treatments were made for each experiment date using the `emmeans` package,²² fitting the *P* values with Tukey’s test.

Efficacies were calculated with respect to the control (efficacy means from different blocks) using Henderson-Tilton formula²³:

$$Efficacy (\%) = \left(1 - \frac{T_a \times C_b}{T_b \times C_a}\right) \times 100$$

Where T_b and T_a are the insects in the treated group before and after the treatment. C_b and C_a are the number of insects in the control group before and after the treatment.

3. RESULTS

3.1. Topical toxicity

The aniseed EO treatment was the most active to aphids (58.35% of mortality) whilst fennel (14.48%) and coriander (7.98%) had no aphicidal effect at a concentration of 0.6% (v/v). The pure compounds geraniol (52.51%) and (Z)-jasmone (50.34%) caused a mortality similar to aniseed EO. Farnesol at a concentration of 0.6% (v/v) was the most active product for aphids, with a mortality of 94.07% at 48 h (Fig. 1). The LC_{50} and LC_{90} of farnesol were 0.394 and 0.575 %, respectively, at 48 h (Table 1).

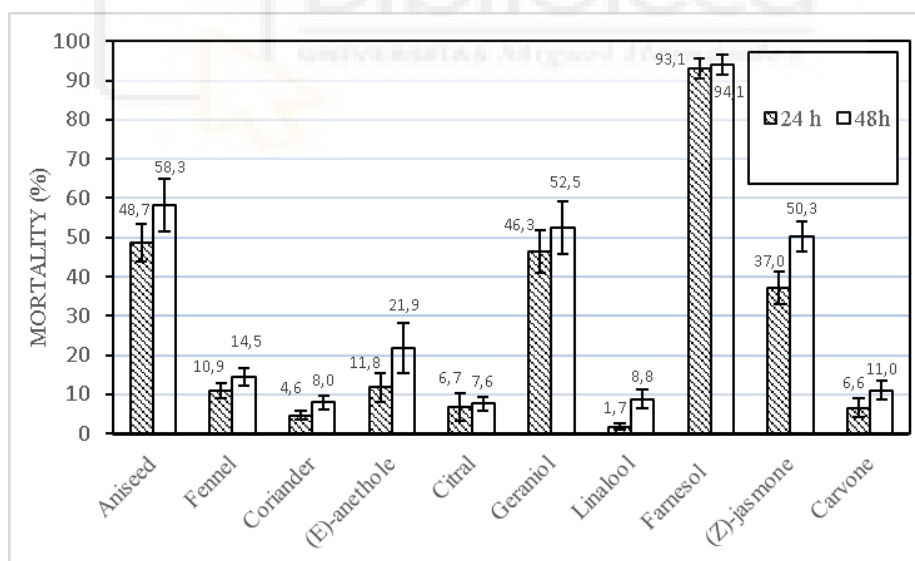


Figure 1. Mortality (%) after spraying EO nanoemulsions at 0.6% (v/v) (24 and 48 h at 25 °C) on *M. persicae* Sulzer on contact toxicity bioassay. Insects were tested in three replications (three different days) with five pseudo replications (n=20 aphids each one) per concentration and formulation (n total = 300 aphids per concentration). Control mortalities were in the range 0.33-7.25% at 24 h and 0.65-11.81 at 48 h.

Table 1. Mortality and lethal concentrations of farnesol nanoemulsions against *M. persicae* at 24 and 48 h on contact toxicity bioassay.

Concentration (%)	Mortality (%) *	
	24 hours	48 hours
0	1.75	3.42
0.2	3.33	5.33
0.3	21.38	39.39
0.4	35.81	45.27
0.6	90.33	93.67
LC ₅₀ (95% CI) †	0.436 (0.398-0.480)	0.394 (0.346-0.451)
LC ₉₀ (95% CI) †	0.603 (0.554-0.682)	0.575 (0.504-0.630)

*Average of mortality for each concentration (n=300).

†All calculations made using Polo Plus software with a Logit model.

3.2. Glasshouse experiments

3.2.1. Glasshouse experiments in pots

Farnesol then was selected for testing in glasshouse experiments, given the aphicidal effect observed on *M. persicae* in the laboratory bioassay. Aniseed EO and its main compound (*E*)-anethole were also selected for the same reason. The products were evaluated under glasshouse conditions on pepper plants (grown in pots) for two years (April 2020 and June 2021).

3.2.1.1. Experiment 1. Products were tested at a dose of 0.6% (v/v). Initial populations were between \approx 40-60 aphids per plant, with statistical differences between farnesol and aniseed EO (LR = 11.29, $P = 0.024$). Farnesol (efficacies >93%) and pyrethrins (efficacies >97%) were the most effective treatments, with statistically significant differences with respect to the control throughout the experiment (Table 2).

Aniseed EO and its main compound (*E*)-anethole also reduced the number of aphids per plant with respect to the control (LR= 167.94, $P < 0.001$), with efficacies of 62.47% and 70.7%, respectively, at D2 post-treatment.

However, all the products tested (except pyrethrins) caused phytotoxic effects on pepper plants. Aniseed EO and its main compound (*E*)-anethole were the most phytotoxic treatments on the crop, and the least effective against aphids than farnesol. For this reason, only farnesol was selected for the posterior glasshouse experiments.

3.2.1.2. Experiment 2. Initial populations of *M. persicae* were homogeneous, with ≈ 90 -100 aphids per plant (LR= 1.99, $P=0.574$) (Table 2). Pyrethrins were the most effective treatment (efficacies $>80\%$). High reductions in the aphid populations treated with farnesol at a concentration of 0.4 and 0.6% (v/v) were produced in comparison with the control at D1 post-treatment (LR = 97.28, $P<0.001$).

The farnesol treatment efficacies were similar at both concentrations ($\approx 65\%$), without significant differences found between them during the experiment. However, no phytotoxic effects were produced at a concentration of 0.4% on the crop, whereas some effects were found with the 0.6% one.

3.2.2. Glasshouse experiments in soil

Farnesol nanoformulations at concentrations of 0.2, 0.4 and 0.6% (v/v) were tested under glasshouse conditions on pepper plants grown on soil for two years (in July 2020 and in April 2021).

3.2.2.1. Experiment 3. The initial aphid populations were high (>140 aphids per plant) without statistical differences between them (LR = 4.56, $P=0.207$) (Table 3). Farnesol treatments caused a significant reduction on aphid populations, with statistical differences found with respect to the control during the experiment ($P<0.001$) (Table 3).

Two days after the treatments, no statistical differences were found between farnesol concentrations, with similar efficacies ($\approx 65\%$) obtained. Pyrethrins were the most effective treatment, with efficacies $\approx 80\%$ throughout the entire experiment (Table 3).

Natural enemies of aphids were observed on the pepper plants before and after the treatments. Mummies of parasitoids (between 1.06-2.88 mummies per plant) and *Aphidoletes sp.* (Diptera: Cecidomyiidae) larvae (between 1.13-4.13 larvae per plant) were present in every pepper plant at D2 post-treatments. Farnesol at a concentration of 0.6% (v/v) did produce phytotoxic effects on leaves, flowers, and fruits. However, no phytotoxic effects were produced by farnesol at a concentration of 0.4%, except for a slight deformation in some leaves of the apical shoot.

Table 2. Aphid populations of *M. persicae* in pepper plants (in pots) before (D-1) and after (D1,2,3,6) spraying with nanoemulsions in glasshouse experiments.

	Treatments	Aphids per plant ^a					Efficacy (%) [†]			
		-1	1	2	3	6	1	2	3	6
Experiment 1 (2020)	(E)-anethole 0.6%	48.13±6.45ab	31.27±5.22b	43.77±8.03b	65.93±9.75b	175.90±23.55b	57.96±4.61	62.09±2.82	60.05±1.61	38.09±4.63
	Aniseed 0.6%	41.23±3.94b	19.97±2.41b	29.9±3.12b	52.13±4.55b	176.90±14.99b	68.07±4.91	68.71±5.30	63.23±2.89	28.74±16.16
	Farnesol 0.6%	66.20±6.72a	5.57±1.95c	6.00±1.95c	3.80±1.26c	2.67±1.18c	93.2±4.14	95.52±2.27	98.29±0.44	99.39±0.22
	Pyrethrin 0.4%	45.33±5.07ab	1.67±0.43d	0.70±0.31d	0.80±0.38d	2.03±1.01c	97.41±0.95	99.34±0.08	99.48±0.12	99.23±0.24
	Control ‡	61.53±7.97ab	98.97±14.29a	149.07±19.34a	210.97±20.87a	349.33±12.60a	--	--	--	--
	LR/ <i>P</i> [§]	11.29/0.024	138.8/<0.001	167.94/<0.001	178.86/<0.001	26792/<0.001				
Experiment 2 (2021)	Farnesol 0.4%	91.67±5.74a	43.00±6.15b	62.07±7.19b	80.87±8.10b	--	66.96±7.11	65.12±5.24	61.33±4.91	--
	Farnesol 0.6%	93.77±4.64a	47.03±5.33b	64.30±6.69b	84.37±10.73b	--	65.71±4.95	64.98±4.63	61.15±7.00	--
	Pyrethrin 0.4%	96.27±6.23a	26.00±3.84c	32.17±4.89c	38.20±4.62c	--	81.48±1.05	83.17±1.00	82.91±0.51	--
	Control ‡	102.30±4.37a	148.97±6.40a	202.13±10.76a	238.07±10.99a	--	--	--	--	--
	LR/ <i>P</i> [§]	1.99/0.528	97.28/<0.001	109.53/<0.001	113.87/<0.001					

* Means (± SE) of aphids per plant followed by different letters within the column indicate significant differences among the treatments. Data were analyzed using R software with GLM negative binomial model, calculated with function `glm.nb` (package MASS) (n=30), and differences between treatments were separated by Tukey's test of Estimated marginal means (`emmeans`-package).

† Efficacy calculated against the control using the Henderson and Tilton (1955) formula.

‡ Tween 80 1.2%.

§ Likelihood ratio statistic (LR) and probability (*P*) by χ^2 .

3.2.2.2. Experiment 4. The initial populations were high ($\approx 250-340$ aphids per plant), with significant differences between them ($LR = 463.30, P < 0.01$), and with the highest populations found for farnesol (≈ 340 aphids per plant). At D2 post-treatments, the aphid populations were reduced with respect to the initial populations, with no significant differences between the final populations. The farnesol treatment at concentration of 0.4% (v/v) reduced initial populations by more than half (122 aphids per plant) at D2 post-treatments, with a greater efficacy than the pyrethrin treatment (efficacies of 69.97 and 50.30%, respectively) (Table 3).

Larvae of *Aphidoletes sp.* were found on the pepper plants before and after the treatments. At D2 post-treatments, larvae were present in all the pepper plants (between 0.25-0.88 larvae). No phytotoxic effects were produced by farnesol treatments on the crop, except for a slight deformation found in some leaves of the apical shoot of plants treated at a concentration of 0.4%.

3.2.2.3. Experiment 5. Before the treatments, the aphid populations were homogeneous (≈ 50 aphids per plant) ($LR = 1.26, P = 0.739$) (Table 3). Treatments reduced the aphid populations with respect to the control during the experiment ($P < 0.001$). Pyrethrins and farnesol, at a concentration of 0.4% (v/v), were the most effective treatments (efficacies of >90 and $>70\%$ respectively). Farnesol at 0.2% (v/v) reduced the initial aphid populations (44 aphids per plant) to half (23 aphids per plant) two days after the treatment (efficacy $> 40\%$) (Table 3).

No phytotoxic effects were produced on the crop with the use of the farnesol nanoemulsion at concentrations of 0.2 and 0.4%.

Table 3. Aphid populations of *Myzus persicae* in pepper plants (in soil) before (D-1) and after (D1,2,7) spraying with nanoemulsions in glasshouse experiments.

	Treatments	Aphids per plant [¶]				Efficacy (%) [*]		
		-1	1	2	7	1	2	7
Experiment 3 (2020)	Farnesol 0.4%	149.00±28.10a	38.50±8.10bc	29.50±6.44b	43.19±10.53b	65.71±3.35	69.48±4.15	72.75±1.29
	Farnesol 0.6%	283.56±30.54a	74.19±21.31ab	50.06±12.97ab	90.56±30.45ab	66.48±13.56	72.92±6.43	72.31±4.73
	Pyrethrin 0.4%	141.06±29.86a	23.81±6.81c	17.31±6.55b	26.19±7.59b	78.44±6.09	80.75±2.00	77.84±11.86
	Control [†]	180.69±62.72a	138.38±34.54a	114.94±29.96a	192.06±65.13a	--	--	--
	LR/ <i>P</i> [§]	4.56/0.207	19.85/<0.001	22.44/<0.001	15.66/0.001			
Experiment 4 (2020)	Farnesol 0.2%	342.50±74.65a	215.25±45.68a	237.69±49.42ab	422.06±81.62a	34.04±4.65	46.19±0.50	40.68±0.38
	Farnesol 0.4%	341.25±68.96a	133.38±37.37a	122.31±36.92a	229.44±82.04a	56.10±13.70	69.97±10.26	58.19±27.63
	Pyrethrin 0.4%	232.19±42.61c	100.69±24.78a	141.75±37.66a	295.88±82.97a	53.22±7.16	50.30±16.02	31.57±23.70
	Control [‡]	282.31±62.29b	260.63±65.04a	351.25±90.98a	541.00±110.21a	--	--	--
	LR/ <i>P</i> [§]	463.30/<0.001	4.85/0.183	6.19/0.103	4.11/0.249			
Experiment 5 (2021)	Farnesol 0.2%	44.31±4.30a	23.88±5.68b	23.63±7.22b	33.31±11.53b	41.11±18.92	42.38±17.85	56.37±3.71
	Farnesol 0.4%	48.44±3.49a	11.00±2.13c	9.56±2.05c	22.31±6.48bc	75.98±0.21	78.99±1.32	73.73±3.65
	Pyrethrin 0.4%	48.75±4.43a	3.06±0.77d	1.25±0.48d	2.06±0.92c	93.35±1.10	97.24±1.43	96.48±2.87
	Control [‡]	50.44±2.87a	47.75±5.09a	47.56±5.40a	84.56±16.76a	--	--	--
	LR/ <i>P</i> [§]	1.26/0.739	57.81/<0.001	67.99/<0.001	45.88/<0.001			

* Efficacy calculated against the control using the Henderson and Tilton (1955) formula.

[†] Tween 80 1.2%.

[‡] Tween 80 0.8%.

[§] Likelihood ratio statistic (LR) and probability (*P*) by χ^2 .

[¶] Means (± SE) of aphids/plant followed by different letters within the column indicate significant differences among the treatments. Data were analyzed using R software with GLM negative binomial model, calculated with function glm.nb (package MASS) (n=32), and differences between treatments were separated by Tukey's test of Estimated marginal means (R/EMMEANS).

4. DISCUSSION

The bioassay developed in this work assessed the aphicidal effect of products on aphids upon contact. A reference standardized bioassay to study the effect of contact products, such as pyrethroids, is the described by the Action Committee against Insecticide Resistance (IRAC n.019),²⁴ however, it only assesses the residual toxicity. The bioassay designed in this work assessed the contact and residual aphicidal potential of products such as EOs. As a consequence of the high volatility of EOs, a residual toxicity bioassay cannot show the real mortality produced by the product. Therefore, to study the topical effect of EOs or natural products such as pyrethrins, an adequate toxicity bioassay must be taken into account to obtain the optimal concentration of the product.

The results showed a great aphicidal effect of the sesquiterpenoid farnesol against the green peach aphid *M. persicae*. However, the application of this pure compound was difficult owing to its insolubility in water,²⁵ and its phytotoxicity on lettuce and pepper crops.^{19, 26} Aniseed EO and its main compound (*E*)-anethole at 0.6% (v/v) were active against *M. persicae* but produce phytotoxic effects on pepper plants as well. Digilio et al.²⁷ also observed the phytotoxic effect of the vapors of anise and fennel EOs on pepper plants. By contrast, other works showed the insecticidal effect of anise EO and its main compound (*E*)-anethole on other aphid species using similar concentrations (0.2-0.55% v/v), without negative effects on lettuce or cabbage plants.^{12,19}

The literature shows the antifeedant and/or aphicidal effect of farnesol against *Myzus persicae*, *Nasonovia ribisnigri*, *Macrosiphum euphorbiae* and *Aphis fabae*.^{18, 26, 28-30} However, the application of farnesol in these studies was carried out under laboratory conditions, and in the present work, we provide new results obtained from the crop under real-world cultivation conditions. In this work, we tested aqueous nanoformulations of farnesol compatible with pepper cultivation. The application of farnesol nanoemulsions at 0.4% (v/v) produced high mortalities in aphid populations, without causing damage to the crop. However, a better efficacy of the treatments (>70%) was obtained when the aphid populations were lower (glasshouse experiments 1 and 5 with \approx 50 aphids per plant before the treatments), in comparison with other experiments (> 100 aphids/ plant).

Farnesol has multiple uses, such as in the perfume or food industries.^{31, 32} In insects, it was discovered as a juvenile hormone of the mealworm *Tenebrio*.³³ It also known as a mite pheromone,³⁴ ant and aphid repellent^{18, 35} or attractant of bees.³⁶ Also,

the attractant effect of farnesol on the syrphid *S. rueppellii*, the parasitoids *Aphidius colemani* Viereck and *A. gifuensis* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), and the mirid *Campylomma chinensis* (Schuch) (Hemiptera: Miridae) was demonstrated in two-way olfactometer experiments.^{18, 37, 38} Applications of farnesol are compatible with some aphid's natural enemies. In a previous work Cantó-Tejero et al.¹⁸ did not observe negative adverse effects when larvae of the hoverfly *Sphaerophoria rueppellii* (Wiedemann) (Diptera: Syrphidae) were exposed to residual treatments of farnesol nanoemulsions at 0.3% (v/v) in laboratory conditions (mortality of 2.5%). Also, cecidomyiid larvae (aphid predators) were observed in plants treated with farnesol during glasshouse experiments. The use of farnesol in integrated pest management (IPM) programs is a good option, as it is compatible with some natural enemies of aphids. In this sense, this product could be included on an IPM program using a push-pull strategy³⁹ (spraying aphid colonies causes mortality and helps to establish parasitoid populations in the glasshouse).

Farnesol belongs to the farnesene family, such as (*E*)- β -farnesene, and they are structurally similar. In fact, farnesol can be used to synthesize (*E*)- β -farnesene.⁴⁰ Cantó-Tejero et al.¹⁸ concluded that farnesol acted in a similar manner as the aphid's alarm pheromone, (*E*)- β -farnesene (repellent to aphids and attractant to parasitoids). Many authors report the attractant effect exerted by (*E*)- β -farnesene on parasitoids^{41, 42} and predators⁴³ of aphids. Gut and Van Oosten⁴⁴ indicated that (*E*)- β -farnesene exerted a toxic effect when it was applied topically on aphids. Again, these results show a similar effect of farnesol as the alarm pheromone when it was applied on aphids.

Farnesol is present as the main compound in different EOs of flowers⁴⁵⁻⁴⁷ or stems and leaves⁴⁸⁻⁵⁰ of plants of different botanical families. Nanoformulations of farnesol or EOs rich in this sesquiterpenoid are a good option for the control of aphids. Current prices of pyrethrum dry flowers (with 50% pyrethrin content) before processing are expensive (€175 kg⁻¹).⁵¹ The price of 25 g of farnesol (€45, CAS number: 4602-84-0, Sigma-Aldrich) is less than half the same mass of pyrethrum extract (with 50% pyrethrin content) (€105, CAS number: 8003-34-7, Sigma-Aldrich).

The formulations presented in this work showed a great aphicidal effect (similar to the reference insecticide). When EOs are formulated as nanoemulsions the particle size is lower increasing their solubility and biological activity.¹⁶ In previous works, different farnesol nanoemulsions, using Tween 80™ as a surfactant at a 1: 2 ratio (prepared using ultrasound or high speed rotor) at different concentrations, were characterized. Farnesol

nanoemulsions were formulated at 1 and 2% (v/v) and then diluted to 0.25%. These had particle sizes of 100 nm, Z-potential of -15 mv and a polydispersity index (PDI) between 0.1-0.5¹⁵, ¹⁶(unpublished data). In fact, in the aforementioned works, farnesol formulations at the same concentrations, but using soy lecithin as the surfactant, also were characterized, resulting in larger particle sizes (150-500 nm), PDI (0.4-0.6) and greater stability, with Z-potential values between -40 and -50 mV.

The mode of action (MoA) of farnesol on aphids is unclear. It acts as a precursor of the juvenile hormones of holometabolous insects and its absence in the larval stage induces metamorphosis.⁵² Knowing the MoA of farnesol would allow for an improved effectiveness in the formulations, because if its activity is the result of a hormonal effect, its application should be performed during the nymphal stages of aphids. This could explain why it is more effective when applied to smaller colonies (with a greater number of nymphs).

These results are promising, yet the farnesol nanoemulsions used in this work need to be improved. The physical properties of these nanoemulsions were not adequate because during their application on pepper plants, the drops of the treatments had a lower surface tension, coalescing into larger drops as compared to the reference pyrethrin-based insecticide. This may be one of the causes of the phytotoxicity (apart from concentration). Surfactants are a fundamental part in the formulation, and their proper selection is essential to obtain a stable and effective nanoemulsion.⁵³ As mentioned previously, in previous studies, we verified how the use of different surfactants influenced the different characterization parameters of nanoemulsions. Further research is needed to obtain an aphicidal product at concentrations of <0.4% and compatible with the pepper crop.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MC-T: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data Curation, Writing-Original Draft, Writing-Review & Editing, Visualization.; **PG:** Conceptualization, Methodology, Software, Formal analysis, Writing-Review & Editing, Visualization.; **MJP-V:** Conceptualization, Methodology, Writing-Review & Editing, Visualization, Funding acquisition. All authors contributed critically to the drafts and gave final approval for publication.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the research projects (RTA2014-00001 and RTA2017-00001) supported by the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA, Spain). MC-T acknowledges financial support from his pre-doctoral research fellowship CDP2016-0092 (funded by INIA).

REFERENCES

1. Blackman RL, Eastop FE, Taxonomic Issues, In Aphids as crop pests, ed. by Van Emden HF, Harrington R. Wallingford: CABI, pp. 1-36 (2017).
2. Foster SP, Devine G, Devonshire A, Insecticide Resistance. In Aphids as crop pests, ed. by Van Emden HF, Harrington R. Wallingford: CABI, pp. 426-447 (2017).
3. Sanchez JA, La-Spina M, Michelena JM, Lacasa A, Hermoso de Mendoza A, Ecology of the aphid pests of protected pepper crops and their parasitoids. *Biocontrol Sci Technol* **21**(2):171-188 (2011). [DOI:10.1080/09583157.2010.530641](https://doi.org/10.1080/09583157.2010.530641)
4. Weintraub PG, Integrated control of pests in tropical and subtropical sweet pepper production. *Pest Manag Sci* **63**(8):753-760 (2007). [DOI:10.1002/ps.1366](https://doi.org/10.1002/ps.1366)
5. Payton Miller TL, Rebek EJ, Banker plants for aphid biological control in greenhouses. *J Integr Pest Manag* **9**(1):9 (2018). [DOI:10.1093/jipm/pmy002](https://doi.org/10.1093/jipm/pmy002)
6. Rodrigues ARS, Ruberson JR, Torres JB, Siqueira HÁA, Scott JG, Pyrethroid resistance and its inheritance in a field population of *Hippodamia convergens* (Guérin-Ménéville) (Coleoptera: Coccinellidae). *Pestic Biochem Physiol* **105**(2):135-143 (2013). [DOI:10.1016/j.pestbp.2013.01.003](https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.01.003)
7. Bruce TJ, Birkett MA, Blande J, Hooper AM, Martin JL, Khambay B, Prosser I, Smart LE, Wadhams LJ, Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. *Pest Manag Sci* **61**(11):1115-1121 (2005).
8. Smith GH, Roberts JM, Pope TW, Terpene based biopesticides as potential alternatives to synthetic insecticides for control of aphid pests on protected ornamentals. *J Crop Prot* **110**:125-130 (2018). [DOI:10.1016/j.cropro.2018.04.011](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.04.011)
9. Heydari M, Amirjani A, Bagheri M, Sharifian I, Sabahi Q, Eco-friendly pesticide based on peppermint oil nanoemulsion: Preparation, physicochemical properties, and its aphicidal activity against cotton aphid. *Environ Sci Pollut Res* **27**(6):6667-6679 (2020). [DOI:10.1007/s11356-019-07332-y](https://doi.org/10.1007/s11356-019-07332-y)

10. Deletre E, Chandre F, Barkman B, Menut C, Martin T, Naturally occurring bioactive compounds from four repellent essential oils against *Bemisia tabaci* whiteflies. *Pest Manag Sci* **72**(1):179-189 (2016). [DOI:10.1002/ps.3987](https://doi.org/10.1002/ps.3987)
11. Abdelgaleil SA, Abou-Taleb HK, Al-Nagar NM, Shawir MS, Antifeedant, growth regulatory and biochemical effects of terpenes and phenylpropenes on *Spodoptera littoralis* Boisduval. *International J Trop Insect Sci* **40**(2):423-433 (2020). [DOI:10.1007/s42690-019-00093-8](https://doi.org/10.1007/s42690-019-00093-8)
12. Benelli G, Pavela R, Petrelli R, Cappellacci L, Canale A, Senthil-Nathan S, Maggi F, Not just popular spices! Essential oils from *Cuminum cyminum* and *Pimpinella anisum* are toxic to insect pests and vectors without affecting non-target invertebrates. *Ind Crops Prod* **124**:236-243 (2018). [DOI:10.1016/j.indcrop.2018.07.048](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.048)
13. Hashem AS, Awadalla SS, Zayed GM, Maggi F, Benelli G, *Pimpinella anisum* essential oil nanoemulsions against *Tribolium castaneum*-insecticidal activity and mode of action. *Environ Sci Pollut Res* **25**(19):18802-18812 (2018). [DOI:10.1007/s11356-018-2068-1](https://doi.org/10.1007/s11356-018-2068-1)
14. Pascual-Villalobos MJ, Castañé C, Martín F, López MD, Guirao P, Riudavets J, (*E*)-Anethole microspheres as an alternative insecticide in funnel traps. *J Stored Prod Res* **93**:101862 (2021). [DOI:10.1016/j.jspr.2021.101862](https://doi.org/10.1016/j.jspr.2021.101862)
15. Pascual-Villalobos MJ, Cantó-Tejero M, Vallejo R, Guirao P, Rodríguez-Rojo S, Cocero MJ, Use of nanoemulsions of plant essential oils as aphid repellents. *Ind Crops Prod* **110**:45-57 (2017). [DOI:10.1016/j.indcrop.2017.05.019](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.019)
16. Pascual-Villalobos MJ, Guirao P, Díaz-Baños FG, Cantó-Tejero M, Villora G, Oil in water nanoemulsion formulations of botanical active substances. In *Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives*, ed. by Opende Koul. Cambridge: Academic Press, pp.223-247 (2019). [DOI:10.1016/j.jspr.2021.101862](https://doi.org/10.1016/j.jspr.2021.101862)
17. Pascual-Villalobos MJ, Cantó-Tejero M, Guirao P, López MD, Fumigant Toxicity in *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae): Controlled Release of (*E*)-anethole from Microspheres. *Plants* **9**(1):124 (2020). [DOI:10.3390/plants9010124](https://doi.org/10.3390/plants9010124)
18. Cantó-Tejero M, Casas JL, Marcos-García MÁ, Pascual-Villalobos MJ, Florencio-Ortiz V, Guirao P, Essential oils-based repellents for the management of *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*. *J Pest Sci* **95**:365–379 (2022). [DOI:10.1007/s10340-021-01380-5](https://doi.org/10.1007/s10340-021-01380-5)

19. Cantó-Tejero M, Pascual-Villalobos, MJ, Guirao, P, Aniseed essential oil botanical insecticides for the management of the currant-lettuce aphid. *Ind Crops Prod* 181, 114804 (2022). DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.114804
20. R Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria (2019). <https://www.r-project.org/>
21. Venables WN, Ripley BD, Modern Applied Statistics with S. Springer, New York, pp 111 (2003).
22. Length RV, emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.7.0. (2021). <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
23. Henderson CF, Tilton EW, Tests with acaricides against the brown wheat mite. *J Econ Entomol* 48(2):157-161 (1955).
24. IRAC Susceptibility Test Methods Series., 2016. Method No. 019. https://irac-online.org/content/uploads/Method_019- v3.2_May12_aphid.pdf [accessed 2 January 2021].
25. Nowacka M, Kowalewska A, Kręgiel D, Farnesol-Containing Macromolecular Systems for Antibiofilm Strategies. *Surfaces* 3(2):197-210 (2020). DOI:10.3390/surfaces3020015
26. Gutiérrez C, Fereres A, Reina M, Cabrera R, González-Coloma A, Behavioral and sublethal effects of structurally related lower terpenes on *Myzus persicae*. *J Chem Ecol* 23(6):1641-1650 (1997). DOI:10.1023/B:JOEC.0000006428.00568.c5
27. Digilio MC, Mancini E, Voto E, De Feo V, Insecticide activity of Mediterranean essential oils. *J Plant Interact* 3(1):17-23 (2008). DOI:10.1080/17429140701843741
28. Van Oosten AM, Gut J, Harrewijn P, Piron PGM, Role of farnesene isomers and other terpenoids in the development of different morphs and forms of the aphids *Aphis fabae* and *Myzus persicae*. *Acta Phytopathol Entomol Hung* 25:331-342 (1990).
29. Dancewicz K, Gliszczynska A, Halarewicz A, Wawrzenczyk C, Gabrys B, Effect of farnesol and its synthetic derivatives on the settling behaviour of the peach potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.). *Pestycydy* (1-4) (2010).
30. Wróblewska-Kurdyk A, Dancewicz K, Gliszczyńska A, Gabryś B, New insight into the behaviour modifying activity of two natural sesquiterpenoids farnesol and nerolidol towards *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). *Bull Entomol Res* 110(2):249-258 (2020). DOI:10.1017/S0007485319000609
31. Lapczynski A, Bhatia SP, Letizia CS, Api AM, Fragrance material review on farnesol. *Food Chem Toxicol* 46(11):149-156 (2008). DOI:10.1016/j.fct.2008.06.046

32. de Araújo Delmondes, G, Bezerra, DS, de Queiroz Dias, D, de Souza Borges, A, Araújo, IM, da Cunha, GL, Bandeira, PF, Barbosa, R, Coutinho, HDM, Felipe, CFB, Barbosa-Filho, JM, de Menezes, IR, Kerntopf, MR, Toxicological and pharmacologic effects of farnesol (C₁₅H₂₆O): a descriptive systematic review. *Food Chem Toxicol* 129: 169-200 (2019). DOI:10.1016/j.fct.2019.04.037
33. Schmialek P, Die Identifizierung zweier im Tenebriokot und in Hefe vorkommender Substanzen mit Juvenilhormonwirkung. *Z. Naturforsch. B*, 16(7):461-464 (1961).
34. Sonenshine DE, Pheromones and other semiochemicals of the acari. *Annu Rev Entomol* 30:1-28 (1985). DOI:10.1146/annurev.en.30.010185.000245
35. Shorey HH, Gaston LK, Gerber RG, Sisk CB, Phillips PA, Formulating farnesol and other ant-repellent semiochemicals for exclusion of Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae) from citrus trees. *Environ Entomol* 25(1):114-119 (1996). DOI:10.1093/ee/25.1.114
36. Schmidt JO, Attractant or pheromone: The case of Nasonov secretion and honeybee swarms. *J Chem Ecol* 25(9):2051-2056 (1999). DOI:10.1023/A:1021084706241
37. Zhang H, Huang XZ, Jing WX, Liu DF, Dhiloo KH, Hao ZM, Zhang YJ, Two farnesyl pyrophosphate synthases, GhFPS1–2, in *Gossypium hirsutum* are involved in the biosynthesis of farnesol to attract parasitoid wasps. *J Integr Agric* 19(9):2274-2285 (2020). DOI:10.1016/S2095-3119(20)63203-8
38. Ma FM, Zheng LX, Gao ZZ, Wu WJ, Farnesol, a synomone component between lantana (Lamiales: Verbenaceae) and the omnivorous predator, *Campylomma chinensis* Schuh (Hemiptera: Miridae). *Arthropod-Plant Interact* 11:703–708 (2017). DOI:10.1007/s11829-017-9523-7
39. Xu Q, Hatt S, Lopes T, Zhang Y, Bodson B, Chen J, Francis F, A push–pull strategy to control aphids combines intercropping with semiochemical releases. *J Pest Sci* 91:93–103 (2018). DOI:10.1007/s10340-017-0888-2 .
40. Tanaka S, Yasuda A, Yamamoto H, Nozaki H, General method for the synthesis of 1,3-dienes. Simple syntheses of beta and trans-alpha-farnesene from farnesol. *J Am Chem Soc* 97(11):3252-3254 (1975).
41. Heuskin S, Lorge S, Godin B, Leroy P, Frère I, Verheggen FJ, Haubruge E, Wathélet JP, Mestdagh M, Hance T, Lognay G, Optimisation of a semiochemical slow-release alginate formulation attractive towards *Aphidius ervi* Haliday parasitoids. *Pest Manage Sci* 68:127–136 (2012). <https://doi.org/10.1002/ps.2234>

42. Micha, SG, Wyss, U, Aphid alarm pheromone (*E*)- β -farnesene: A host finding kairomone for the aphid primary parasitoid *Aphidius uzbekistanicus* (Hymenoptera: Aphidiinae). *Chemoecology* 7(3):132-139 (1996). <https://doi.org/10.1007/BF01245965>
43. Francis, F., Lognay, G., & Haubruge, E, Olfactory responses to aphid and host plant volatile releases: (*E*)- β -farnesene an effective kairomone for the predator *Adalia bipunctata*. *J Chem Ecol* 30(4):741-755 (2004). <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000028429.13413.a2>
44. Gut J, Van Oosten AM, Insecticide composition, its preparation and its use. US Patent 4,505,934 (1985).
45. Suryawanshi YC, Mokat DN, Chemical composition of essential oil of *Madhuca longifolia* var. *latifolia* (Roxb.) A. Chev. flowers. *J Essent Oil-Bear Plants* 22(4):1034-1039 (2019). [DOI:10.1080/0972060X.2019.1667879](https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1667879)
46. dos Santos ATB, Junior JSZ, Parreira LA, de Abreu KMP, de Oliveira Bernardes C, de Carvalho JR, Menini L, Chemical identification and insecticidal effect of *Tephrosia vogelii* essential oil against *Cerosipha forbesi* in strawberry crop *J Crop Prot* 139:105405 (2021). [DOI:10.1016/j.cropro.2020.105405](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105405)
47. Baser KHC, Kürkçüoğlu M, Composition of the essential oil of *Morina persica* L. flowers. *J Essent Oil Res* 10(1):117-118 (1998). [DOI:10.1080/10412905.1998.9700856](https://doi.org/10.1080/10412905.1998.9700856)
48. Apel, MA, Sobral M, Schapoval EE, Henriques AT, Menut C, Bessiere JM, Essential oil composition of *Eugenia florida* and *Eugenia mansoi*. *J Essent Oil Res* 16(4):321-322 (2004). [DOI:10.1080/10412905.2004.9698732](https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698732)
49. Dob T, Dahmane D, Berramdane T, Chelghoum C, Chemical composition of the essential oil of *Artemisia campestris* L. from Algeria. *Pharm Biol* 43(6):512-514 (2005). [DOI:10.1080/13880200500220664](https://doi.org/10.1080/13880200500220664)
50. Kambiré DA, Yapi TA, Boti JB, Garcia G, Tomi P, Bighelli A, Tomi F, Chemical composition of leaf essential oil of *Piper umbellatum* and aerial part essential oil of *Piper guineense* from Côte d'Ivoire. *Nat Prod Commun* 14(6):1934578X19859124 (2019). [DOI:10.1177/1934578X19859124](https://doi.org/10.1177/1934578X19859124)
51. Jongschaap, REE, de Vos, CH, Jongsma, MA, Feasibility study plant extracts in Rwanda: Developing value chains in public private partnerships (No. 801). Wageningen Research Foundation (WR) business unit *Agrosystems Research* (2018).

52. De Loof A, Schoofs L, Intraluminal Farnesol and Farnesal in the Mealworm's Alimentary Canal: An Unusual Storage Site Uncovering Hidden Eukaryote Ca²⁺-Homeostasis-Dependent “Golgirine” Activities. *Front Endocrinol* **10**:885 (2019). [DOI:10.3389/fendo.2019.00885](https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00885)
53. Pavoni L, Perinelli DR, Bonacucina G, Cespi M, Palmieri GF, An overview of micro- and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. *Nanomaterials* **10**(1):135 (2020). [DOI:10.3390/nano10010135](https://doi.org/10.3390/nano10010135)




4.3. Publicación 3

Aniseed essential oil botanical insecticides for the management of the currant-lettuce aphid

Manuel Cantó-Tejero, María Jesús Pascual-Villalobos, Pedro Guirao

Industrial Crops and Products **181**: 114804 (2022)
[DOI:10.1016/j.indcrop.2022.114804](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114804)

Métricas de calidad JCR (2021)



Área:	Agronomy/ Agricultural engineering
Factor de impacto:	6,449 (6/90) / (2/14)
Cuartil:	Q1

Aniseed essential oil botanical insecticides for the management of the currant-lettuce aphid

M. Cantó-Tejero, M. J. Pascual-Villalobos, P. Guirao

ABSTRACT

Nasonovia ribisnigri Mosley (Hemiptera: Aphididae) is the most damaging aphid species of lettuce grown in open fields. Populations of *N. ribisnigri* are developing resistance to insecticides, making their control difficult. Botanicals are an alternative for pest control. Aniseed (*Pimpinella anisum* L.) is a relevant crop in the production of essential oils. The effect of aqueous nano-formulations of this oil and its main compound (*E*)-anethole were tested against *N. ribisnigri* in a growth chamber, a greenhouse (in spring for two years, 2019 and 2020) and in the open field in a plot in the Southeast of Spain (Torrepacheco, Murcia) in May 2019. Aniseed essential oil nanoemulsions were prepared using a laboratory dispersing machine at a high-speed regime (10 min, 7940 revs/min, 15°C) using Tween80 as a surfactant at a 1:2 ratio. Foliar applications of aniseed essential oil at concentrations of 0.2 and 0.4% (0.1 and 0.2 mL respectively) to lettuce plants infested with homogeneous populations of *N. ribisnigri* reduced the number of insects compared with the control in the laboratory (efficacies > 50%) and greenhouse (efficacies > 25%, 48 hours after treatment) experiments. During the field trial, a reduction in the aphid populations was also produced after the application of the products, without any phytotoxic effects observed on the crop. Likewise, (*E*)-anethole gave similar results as aniseed essential oil (with efficiencies of up to 47% with respect to the control) without damaging the plant.

Keywords:

Botanical insecticides, (*E*)-anethole, *Nasonovia ribisnigri*, Integrated pest management (IPM), syrphids, ladybugs, pyrethrins

1. Introduction

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) (Asteraceae) is grown in large areas of monoculture in the Mediterranean basin. In 2019, more than 4M tons were produced in the European Union. The principal producers are Spain, Italy, Belgium, and France (FAO, 2019). In Spain, most of the production takes place in the southeast, in Murcia.

The currant-lettuce aphid, *Nasonovia ribisnigri* Mosley (Hemiptera: Aphididae) is considered the most damaging species in open field lettuce crops. Crop damage is mainly due to insect feeding and the presence of aphids on lettuce during commercialization (ten Broeke et al. 2013). *N. ribisnigri* is the Lettuce necrotic leaf curl virus vector (LNLCV) as well (Verbeek et al. 2017).

The control of aphids in lettuce is mainly based on chemical control, using contact insecticides such as carbamates or pyrethroids (Barrière et al. 2014). The use of insecticides authorized is overused and very toxic to natural enemies and pollinators (Gentz et al. 2010). Lettuce cultivars resistant to *N. ribisnigri* are also used. However, resistant populations of *N. ribisnigri* to carbamates, organochlorines, and organophosphates have appeared (Rufingier et al. 1997). Since 2007 new biotypes of *N. ribisnigri* are overcome resistances of cultivars in Europe (Cid et al. 2012; Walley et al. 2017).

Some plants of the Apiaceae family contain pure compounds that repel or have toxic effects against insects (Pavela et al. 2018). Aniseed (*Pimpinella anisum* L.) (Apiaceae) is one of the most important crops for the production of essential oils (Rocha and Fernandes, 2016). It has traditionally been used in medicine and it currently has a wide range of applications in the food and beverage industry. Its oil is mainly composed of the phenylpropanoid (*E*)-anethole (Hashem et al. 2018). Formulations of essential oils in water is difficult due to their insolubility (Isman, 2020). The formulations of essential oils in nanoparticle range increases their solubility and their biological activity (Pascual-Villalobos et al., 2019).

The aim of this work was to study the toxic effect of nanoformulations of aniseed essential oil (EO) and its main compound (*E*)-anethole, and the pure compound farnesol against the currant-lettuce aphid *Nasonovia ribisnigri*. These essential oils were selected based on previous works on different aphid species (*Rhopalosiphum padi* L., *Macrosiphum euphorbiae* Thomas and *Myzus persicae* Sulzer) (Pascual-Villalobos et al. 2017, 2019; Cantó-Tejero et al. 2021). We performed laboratory, semi-field, and field experiments for two years.

2. Material and methods

2.1. Essential oils and pure compounds. Preparation of nanoemulsions.

The essential oil (EO) of aniseed (*P. anisum*) and its main compound, the phenylpropanoid (*E*)-anethole were studied. Also, the pure compound farnesol was tested. Aniseed EO was obtained from Distilleries Muñoz Gálvez S.A. (Murcia, Spain), and the pure compounds from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Aniseed essential oil composition were analyzed in a previous work where the main compounds is (*E*)-anethole (96.9%) (Pascual-Villalobos et al. 2017). Essential oils were formulated in water (O/W) as nanoemulsions with Tween80[®] (Panreac, Barcelona, Spain) as a surfactant (1:2). Nanoemulsions were prepared 2-4 days before the treatment with a high-speed rotor (IKA-Labor Pilot 2000/4, IKA-Werke GmbH and Co. Staufen, Germany) at 7940 rev/min for 10 min at 15°C, and used for this study.

2.2. Aphids

Nasonovia ribisnigri were collected from lettuce plants in Orihuela (Alicante, Spain) in 2017. The aphids were maintained on lettuce plants (*L. sativa*, cv Bondena, Syngenta Seeds, USA) for several generations in a growth chamber in our laboratory under a 14:10 (L:D) photoperiod, at 22 ± 1°C and 60 ± 10% relative humidity. All aphids used in the experiment were parthenogenetic females.

2.3. Growth chamber experiment

We studied the toxic effect against *N. ribisnigri* using the bioassay by Ribeiro et al. (2014). Ten plants per treatment were used (5-7 true leaves developed). Each group of plants was kept in different cages in the same growth chamber under a 14:10 (L:D) photoperiod, at 23 ± 1°C and 60 ± 10% relative humidity. Lettuce plants (*Lactuca sativa*, cv Bondena, Syngenta Seeds, USA) were cultivated in pots (0.33 L) filled with a mixture of peat (Klasmann TS3, Klasmann-Deilmann GmbH, Germany) and perlite (Projar, S.A. company, Valencia, Spain) in a 3:1 ratio. Plants were watered twice a week (≈70 mL/plant), one with a NPK (15-15-15) fertilizer diluted in water (10 g/L).

Ten wingless female adults of *N. ribisnigri* were released per plant two weeks before the treatment. Aqueous nanoformulations of aniseed EO, (*E*)-anethole, and

farnesol were sprayed at a concentration of 0.4% (v/v) (for 100 mL: 0.4 mL of EO, 0.8 mL of Tween80 and 98.8 mL of water) with a manual (atomizer) sprayer (Berry 1.5, Matabi, Goizper Group, Gipuzkoa, Spain) at a rate of \approx 50 mL/plant. Only Tween80[®] diluted in water (as same concentration than treatments) was used as a control. Live aphids were counted before and 1, 2, 3, and 6 days after the treatments.

2.4. Greenhouse experiments

Semi-field experiments were conducted for two consecutive years (2018-2019) between March- April in a greenhouse located at the Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA) (La Alberca, Murcia, Spain) (37°56'18.1''N 1°08'01.1''W).

Lettuce plants (*Lactuca sativa*, cv Bondena, Syngenta) were cultivated in pots (0.33L) in a mixture of peat (Klasmann TS3, Klasmann-Deilmann GmbH, Germany) and perlite (Projar, S.A. company, Valencia, Spain) (3:1). Plants were watered twice a week according to the needs of the crop, one with NPK (15-15-15) fertilizer diluted in water (10 g/L).

A randomized block was designed with four replicates of 12 plants each one. Each treatment tested in all the experiments had 48 plants and the concentrations ranged between 0.2-0.4% (v/v). Each experiment had four treatments, except in the second year, which had five treatments. Tween80[®] as a control at the same dose as the treatments (1:2 EO: Surfactant), and pyrethrins as a reference product (Pirecris[®], Seipasa company, Valencia, Spain) at 0.4% (v/v), were used in each experiment. Aniseed EO and (*E*)-anethole at 0.4% (v/v) were tested in the first experiment in the first year, whereas in the second experiment a dose of 0.2% was tested. In the second year, aniseed EO, (*E*)-anethole and farnesol were tested at 0.4% (v/v). Essential oils were formulated at a dose of 2% (v/v) and then diluted to the test concentration. Treatments were sprayed using a hand sprayer (Polita 7, Matabi, Goizper Group, Gipuzkoa, Spain) at a rate of \approx 50 mL/plant. A lettuce leaf with 5-10 wingless female adults of *N. ribisnigri* was released on each plant (\approx 9 true leaves developed) two weeks before the first count to rear the aphid colonies. After this time, the number of aphids on all plants were counted (day -1) and treated the next day with the products described above (day 0). After the treatments, aphids per plant were counted at after 1, 2, 3, and 6 days.

2.5. Open field experiment

The field experiment was conducted in 2018 between May and June at the Torreblanca Experimental Station (Torrepacheco, Murcia, Spain) (37°46'24.8"N 0°53'56.6"W) with a Mediterranean climate. In May, the average temperature was 19.5°C (minimum of 16.34 and maximum of 23.09). Average of wind intensity was 2.02 m/s and solar radiation of 297.99 w/m². The total precipitation was of 1.1 mm (on 24 may) during the experiment.

Baby Lettuce plants susceptible to aphids (*L. sativa*, cv Bondena, Syngenta) were planted on 2 May and harvested after five weeks (5 June). Plants were cultivated on ridges (with separation of 1 m) at a density of 12 plants/m² (0.12x0.10 m). Plots of 10 m² (3x3.33 m) were replicated four times in a randomized block design (1 m distance between blocks). Plants were watered thrice a week under drip irrigation, one with NPK (15-15-15 or 0-21-5) fertilizer diluted in water according to the needs of the crop (Rincon, 2008). Treatments were aniseed EO and (*E*)- anethole, each at a concentration of 0.2 and 0.3% (v/v). Only Tween80[®] diluted in water (as same concentration than treatments) was used as a control and pyrethrins as a reference product (Pirecris[®]) at 0.4% (v/v) were used. Essential oils were formulated at a dose of 2% (v/v) and then diluted to the test concentration. Treatments were sprayed with a backpack sprayer (Super 16, Matabi, Goizper Group, Gipuzkoa, Spain) at a rate of \approx 200 mL/plant 20 days after planting. The crop was sampled twice a week for monitoring aphid populations. To set up a homogeneous inoculation of the pest, lettuce leaves with aphids (10-20 aphids in each leaf) were distributed all over the field (450 leaves) before the first count, when 50% of lettuce plants sampled had aphids. Aphids per plant were counted in 30 lettuce plants from each experimental plot (120 per treatment) at -1, +1, 3, 7 days. Production (size and weight of lettuces) of each treatment was assessed (14 days after treatment). Thirty lettuce plants were sampled from each experimental unit to count the natural enemies of aphids present in the field. Exemplars of natural enemies of aphids were collected for their identification in the laboratory. Syrphid larvae were fed with aphids in laboratory conditions (24 °C and 60% RH.) to rear adults for their identification.

2.6. Statistical analysis

The data from the growth chamber experiment were analyzed using Statgraphics (Centurion 18.1.6.). The normality of the data and homogeneity of variance were assessed with the Shapiro–Wilk and Levene’s tests, respectively. The data were analyzed with by a one-way ANOVA and the means were separated by Fisher’s LSD test with the significance level set as $P \leq 0.05$.

The data from greenhouse and open field experiments were analysed with the “R” software, version 4.0.5 (R Core Team, 2021). The data were adjusted to a negative binomial model, using the `glm.nb` function from the MASS package (Venables and Ripley, 2002), where the number of aphids per plant was the variable response, and the treatment and the block, the factors. The significance of the treatment factor was verified by comparing this model with the restricted model (without the treatment factor), using the `anova.negbin` function found in the same package. Pairwise comparisons of estimated marginal means among treatments were made for each day using the `emmeans` package (Length, 2021), fitting the p-values with Tukey’s test.

The data of natural enemies from the open field experiment were fitted to a Poisson model, using the `glm` function from the Stats package (R Core Team, 2021). Multiple comparisons were made between treatments for each experiment date using the `emmeans` package (Length, 2021), fitting the p-values with Fisher’s LSD test.

Efficacy was calculated with respect the control (efficacy means from different blocks) using the Henderson-Tilton (1955) formula:

$$Efficacy (\%) = \left(1 - \frac{T_a \times C_b}{T_b \times C_a}\right) \times 100$$

Where t_b and t_a are the insects in the treated group before (T_b) and after (T_a) the treatment. C_b and C_a are the number of insects in the group control before (C_b) and after (C_a) the treatment.

The Instantaneous population growth rate (r_i) was calculated for growth chamber and greenhouse experiments using the formula described in Stark and Banks (2003):

$$r_i = \frac{\ln \frac{N_f}{N_o}}{\Delta_T}$$

Where N_f is the number of aphids on each plant treated the day after treatment application, and N_o is the initial number of aphids in the same plant. Δ_T are the days between both counts. To avoid the error that occurs when $N_f=0$ or $N_o=0$ ($\ln=+-\infty$), the 0 has been replaced by 0.5, in a similar way to Berkson's adjustment (Hubert, 1992). Values of r_i were analysed using Statgraphics (Centurion 18.1.6.) and “R” software, version 4.0.5. The normality of the data and homogeneity of variance were assessed with the Shapiro–Wilk and Levene’s tests, respectively. The data were analysed with by a one-way ANOVA and the means were separated by Fisher's LSD test with the significance level set as $P \leq 0.05$. When the data are not normal were analysed with Kruskal–Wallis test ($P \leq 0.05$) followed by Dunn’s pairwise comparisons. Kruskal-Wallis and Dunn tests were carried out using the 'Dunn test' package (Dinno, 2017).

3. Results

3.1. Growth chamber experiment

The initial populations of *N. ribisnigri* were between ≈ 50 -70 aphids per plant. The initial population of the control was similar to aniseed EO but greater than in (*E*)-anethole and farnesol ($P=0.0108$) (Table 1). Farnesol at 0.4% (v/v) decreased the aphid populations in the first day ($r_i = -0.37$) but phytotoxicity was observed in the lettuce plants. Aniseed EO and (*E*)-anethole treatments reduced *N. ribisnigri* populations to a greater degree than in the control ($P < 0.001$) during the experiment. High reductions in the aphid populations of plants treated with aniseed EO ($r_i = -0.49$) or (*E*)-anethole ($r_i = -0.43$) were produced one day after treatment, while growing in the control ($r_i = 0.38$) (Table 1). Aniseed EO and (*E*)-anethole treatments at a dose of 0.4% (v/v) did not produce phytotoxicity on lettuce plants.

Table 4. Aphid populations of *Nasonovia ribisnigri* in lettuce plants before and after (in days) spraying with nanoemulsions in a growth chamber.

Product	Aphids per plant ^a					Efficacy (%) ^b				Instantaneous rate of population growth (ri) ^c			
	0	1	2	3	6	1	2	3	6	1	2	3	6
Aniseed EO 0.4%	68.8±5.2a	45.7±6.6b	45.7±6.8b	48.0±8.7b	56.9±8.7b	53.8	64.8	70.2	68.2	-0.49±0.13b	-0.24±0.08c	-0.17±0.08c	-0.05±0.03b
(E)-anethole 0.4%	47.6±3.8c	32.9±4.6b	40.3±2.4b	45.3±4.1b	95.3±12.9b	51.9	55.1	59.4	23.1	-0.43±0.09b	-0.08±0.03bc	-0.02±0.04bc	0.11±0.03a
Farnesol 0.4%	51.4±4.5bc	37.5±4.9b	54.2±5.6b	65.3±8.4b	139.7±17.4a	49.2	44.1	45.8	-4.4	-0.37±0.09b	0.02±0.04b	0.07±0.04b	0.16±0.03a
Control ^d	63.9±5.7ab	91.8±6.1a	120.5±12.3a	149.7±11.9a	166.3±13.5a					0.38±0.05a	0.31±0.08a	0.29±0.04a	0.16±0.03a
<i>F value/P value</i>	4.3/0.0108	23.2/<0.001	23.8/<0.001	32.0/<0.001	12.84/<0.001					18.7/<0.001	14.4/<0.001	13.0/<0.001	12.0/<0.001
<i>P.S. Wilk/P</i>										0.493/0.070	0.455/0.130	0.522/0.139	0.478/0.821
<i>Levene</i> ^e	0.159/0.248	0.296/0.432	0.267/0.003	0.062/0.105	0.523/0.448								

^a Means (± SE) of aphids/plant followed by different letters within the column indicate significant differences among the treatments (ANOVA followed by Fisher LSD test; $P > 0.05$; *F value d.f.* (3, 36))

^b Efficacy calculated by means of Henderson and Tilton (1955) formula.

^c Instantaneous rate of population growth (ri) = $(\ln Nf/No)/\Delta T$, where Nf is the number of aphids on each day after treatment, No is the number of aphids on the first day and ΔT are the days among them. Means (± SE) of ri followed by different letters within the column indicate significant differences between the treatments (ANOVA followed by Fisher LSD test; $P > 0.05$; *F value d.f.* (3, 36))

^d Tween 80 0.8%

^e Probability of normality (Shapiro-Wilk) and homogeneity of variance (Levene) tests.

3.2. Greenhouse experiments

The products were evaluated in three semi-field experiments under greenhouse conditions. Two experiments were conducted in March and April, 2019 at doses of 0.4 and 0.2% (v/v). In March 2020, the essential oils were evaluated again at 0.4% (v/v) to compare with the results obtained the previous year, in 2019 (Table 2).

3.2.1. Experiment 1 (Year 2019)

The initial aphid populations were homogeneous ($LR. stat = 3.3, P = 0.3411$). After one day from the application of the insecticide treatments, a lower number of aphids was counted in the treatment plots as compared with the control, with statistical differences for aniseed EO ($LR. stat = 28.8, P < 0.001$). Aniseed EO, or (*E*)-anethole at 0.4% (v/v) decreased the aphid populations after three days ($r_i = -0.08$ and -0.09 , respectively). Treatment efficacies of 40% were obtained for aniseed EO and (*E*)-anethole at 0.4% (v/v) three days post-treatment, similar to pyrethrins at 0.2% (Efficacy of 52.9%).

3.2.2. Experiment 2 (Year 2019)

The initial populations of *N. ribisnigri* were homogeneous between treatments ($\approx 44-47$ aphids/plant) ($LR. stat = 0.4, P = 0.949$). Pyrethrins were the most effective treatment, reducing the initial population throughout the entire experiment (efficacies between 68.3 and 76.4%), with better results than essential oils treatments. However, aniseed EO or (*E*)-anethole at 0.2% (v/v) also reduced aphid populations with respect to the control (Tween80 0.4%) the day after treatment application ($r_i = -0.22$ and -0.24 , respectively) ($LR. stat = 93.2, P < 0.001$) and stopped aphid development six days after ($r_i = -0.01$ and -0.03 , respectively).

3.2.3. Experiment 3 (Year 2020)

The initial aphid populations were homogeneous between pyrethrins, aniseed EO (*E*)-anethole, and the control ($\approx 14-16$ aphids/plant), whereas for the farnesol plots, the starting populations were lower in number ($LR. stat = 16.9, P = 0.002$). Again, the pyrethrins were the most effective product (efficacies between 60.5 and 73%), but aniseed

EO and (*E*)-anethole also caused a significant reduction in the population of aphids one day after the treatment ($r_i = -0.13$ and -0.10 , respectively) ($LR. stat = 92.0$, $P < 0.001$). During the experiment, the aphid populations were lower in the treatments than the control (Tween80 0.8%), almost half ($\approx 11-14$ aphids/plant) with respect to the control (25 aphids/plant) on the last day of the experiment ($LR. stat = 60.0$, $P < 0.001$).

Aniseed EO and (*E*)-anethole did not produce phytotoxic effects on the lettuce plants during the experiments. However, when farnesol was sprayed at 0.4% some leaf burns in the plants were observed.

3.3. Open field experiments

The initial populations were homogeneous, except for the control, which had a smaller number of aphids than aniseed EO ($LR. stat = 13.46$, $P = 0.019$). At one day post-treatment, significant reductions were produced by pyrethrins and essential oils than the control ($LR. stat = 56.54$, $P < 0.001$) (Table 3). Whereas no statistical differences were obtained between pyrethrins and (*E*)-anethole at 0.3% after two days, some differences were found with the other treatments (highest number of aphids). After 48 hours, all the essential oils treatments reduced the number of aphids in comparison with the control (Tween80 0.6%) ($LR. stat = 26.70$, $P < 0.001$). A similar efficacy was obtained between essential oils (efficacies of $\approx 40-50\%$), but pyrethrins were the best in reducing the aphid population (efficacy of 58.1%) at two days (Table 3). Yields of 3.28 Kg/m² were harvested from the experimental plot, without differences between treatments ($P > 0.7134$). No phytotoxic effects were observed in the crop during the experiment with aniseed EO and (*E*)-anethole treatments at 0.2 and 0.3% (v/v) doses.

Table 5. Aphid populations of *Nasonovia ribisnigri* in lettuce plants before and after (in days) spraying with nanoemulsions in greenhouse experiments.

	Product	Aphids per plant ^a					Efficacy (%) ^b				Instantaneous rate of population growth (ri) ^c				
		-1	1	2	3	6	1	2	3	6	1	2	3	6	
1st year (2019)	Experiment 1	Aniseed EO 0.4%	19.0±1.0a	15.5±0.8c	14.2±0.9b	13.8±0.8bc	20.8±1.1b	17.4	27.4	40.1	25.0	-0.11±0.03bc	-0.11±0.02b	-0.08±0.01b	0.01±0.01b
		(E)-anethole 0.4%	21.5±1.2a	19.4±1.3ab	14.7±0.9b	16.5±1.1b	25.9±1.4a	14.7	37.6	40.7	21.6	-0.07±0.03b	-0.15±0.02b	-0.09±0.02b	0.03±0.01b
		Pyrethrins 0.2 %	20.8±1.2a	15.5±0.9bc	13.2±0.9b	12.8±0.8c	18.7±1.2b	36.9	41.6	52.9	38.9	-0.17±0.03c	-0.17±0.02b	-0.13±0.02b	-0.02±0.01c
		Control ^d	21.4±1.3a	22.9±1.3a	24.1±1.3a	27.1±1.6a	31.4±1.6a	--	--	--	--	0.04±0.02a	0.05±0.02a	0.06±0.01a	0.06±0.01a
		Statistic/Pr. ^f	3.3/0.3411	28.8/<0.001	55.8/<0.001	87.8/<0.001	49.6/<0.001					30.7/<0.001	59.3/<0.001	67.4/<0.001	29.9/<0.001
	Experiment 2	Aniseed EO 0.2%	44.8±2.6a	29.3±1.8a	43.3±2.5b	39.6±2.5a	42.8±2.6b	16.3	22.7	15.0	25.9	-0.22±0.03a	-0.01±0.02a	-0.04±0.02a	-0.01±0.01b
		(E)-anethole 0.2%	45.6±2.5a	29.8±2.1a	46.3±2.9b	40.7±2.8a	40.7±3.1b	18.1	20.7	16.5	32.2	-0.24±0.03a	0.00±0.03a	-0.04±0.02a	-0.03±0.01b
		Pyrethrins 0.4%	47.5±3.2a	8.3±0.7b	14.6±0.9c	14.6±1.0b	18.3±1.1c	76.4	73.7	68.3	69.5	-0.92±0.05b	-0.39±0.03b	-0.29±0.02b	-0.13±0.01c
		Control ^e	44.5±2.4a	35.2±2.0a	57.1±3.5a	47.0±2.7a	58.2±2.9a	--	--	--	--	-0.11±0.03a	0.08±0.03a	0.02±0.02a	0.04±0.01a
		Statistic/Pr. ^f	0.4/0.949	154.8/<0.001	161.8/<0.001	120.9/<0.001	114.5/<0.001					93.2/<0.001	86.0/<0.001	81.2/<0.001	78.7/<0.001
2nd year (2020)	Experiment 3	Aniseed EO 0.4%	13.2±0.9ab	11.4±1.1b	9.5±0.8b	9.1±0.8bc	11.2±0.8bc	31.8	47.1	47.5	44.1	-0.13±0.05b	-0.13±0.04c	-0.12±0.02c	-0.02±0.01b
		(E)-anethole 0.4%	16.1±1.5a	13.7±1.1b	12.2±1.0b	12.2±1.3b	14.3±1.6b	30.0	42.2	41.8	41.9	-0.10±0.04b	-0.11±0.03bc	-0.09±0.02c	-0.04±0.02b
		Farnesol 0.4%	11.0±1.0b	12.6±1.2b	11.0±1.0b	12.4±1.2b	15.2±1.6b	12.0	26.3	17.9	20.0	0.04±0.04a	-0.04±0.03b	-0.01±0.03b	0.02±0.02a
		Pyrethrins 0.4%	14.5±0.9ab	5.0±0.7c	5.2±0.8c	6.5±0.8c	8.8±1.0c	72.4	73.0	67.8	60.5	-0.72±0.08c	-0.49±0.06d	-0.29±0.04d	-0.11±0.02c
		Control ^d	16.4±1.1a	21.0±1.4a	22.6±1.5a	22.1±1.7a	25.3±1.7a	--	--	--	--	0.12±0.03a	0.11±0.02a	0.07±0.02a	0.06±0.01a
	Statistic/Pr. ^f	16.9/0.002	83.5/<0.001	90.6/<0.001	74.9/<0.001	60.0/<0.001					92.0/<0.001	82.5/<0.001	77.7/<0.001	47.4/<0.001	

^a Means (± SE) of aphids/plant followed by different letters within the column indicate significant differences among the treatments. Data were analysed using R software with GLM negative binomial model, calculated with function glm.nb (package MASS), and differences between treatments were separated by Tukey's test of Estimated marginal means (emmeans-package).

^b Efficacy calculated by means of the Henderson and Tilton (1955) formula.

^c Instantaneous rate of population growth (ri) = (ln Nf/No)/ΔT, where Nf is the number of aphids on each day after treatment, No is the initial number of aphids and ΔT are the days between them. Means (± SE) of ri followed by different letters within the column indicate significant differences among the treatments (Kruskal Wallis followed by Dunn test; P < 0.05; d.f. =3 in 1st year and d.f. =4 in 2nd year).

^d Tween 80 0.8%

^e Tween 80 0.4%

^f Likelihood ratio statistic (LR Stat) and Chi-square probability for aphids per plant columns; and Kruskal Wallis statistic (K) Chi-square probability and probability for ri columns.

Table 6. Aphid populations of *Nasonovia ribisnigri* in lettuce plants before and after (in days) spraying with nanoemulsions in an open field experiment.

Product	Aphids per plant ^a					Efficacy (%) ^b		
	-1	1	2	7	14	1	2	7
Aniseed EO 0.2%	9.5±0.7ab	8.9±0.8bc	14.9±1.2b	3.5±0.9bc	0.02±0.0a	62.6	51.8	17.1
Aniseed EO 0.3%	10.7±0.7a	12.2±1.0ab	15.0±1.3ab	5.0±1.0ab	0.01±0.0a	47.6	52.0	-18.3
(E)-anethole 0.2%	9.0±0.6ab	10.9±1.0b	15.5±1.3ab	2.2±0.6bc	0.00±0.0a	44.2	39.8	-8.8
(E)-anethole 0.3%	9.2±0.7ab	9.5±0.9bc	10.8±1.2b	2.1±0.6c	0.01±0.0a	49.0	50.5	38.4
Pyrethrins 0.4%	9.6±0.7ab	7.3±0.8c	12.1±1.2b	7.8±1.3a	0.07±0.0a	68.2	58.1	-124.9
Control ^c	7.4±0.5b	18.3±1.3a	23.5±1.6a	3.3±0.8abc	0.01±0.0a			
<i>LR Stat / Pr. (Chi)</i> ^d	13.46/0.019	56.54/<0.001	26.70/<0.001	22.35/<0.001	9.93<0.077			

^a Means (± SE) of aphids/plant followed by different letters within the column indicate significant differences between the treatments. Data were analysed using R software with GLM negative binomial model, calculated with function glm.nb (package MASS), and differences among treatments were separated by Tukey's test of Estimated marginal means (emmeans-package).

^b Efficacy calculated by means of the Henderson and Tilton (1955) formula.

^c Tween 80 0.6%

^d Likelihood ratio statistic (*LR Stat*) and Chi-square probability.

The natural enemies of aphids present during the experiment were identified. Three species of syrphids (Diptera: Syrphidae): *Sphaerophoria rueppellii* (Wiedemann), *Sphaerophoria scripta* L., and *Episyrphus balteatus* De Geer; ladybugs *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae), and the mirid *Zelus renardii* Kolenati (Heteroptera: Reduviidae). Also, parasitoids of syrphids from the genera *Diplazon* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) and *Pachyneuron* sp. (Hymenoptera: Pteromalidae) were identified.

Natural enemies were present on the crop during the experiment (Fig. 1). The number of natural enemies per lettuce was lower in the plants treated with pyrethrins (0 ladybugs and 0.017 syrphids per plant) two days after the treatment (Fig. 1). However, the populations of natural enemies of aphids were higher in the plants treated with essential oils two days post-treatment (0.04-0.07 ladybugs and 0.07-0.12 syrphids per plant) (Fig. 1). Statistical differences were found between the essential oils and the pyrethrins treatments on syrphids populations, two days post treatment ($LR. stat = 13.73$, $P=0.017$). After seven days, the natural enemies populations were homogeneous between the pyrethrins and aniseed EO treatments for syrphids ($LR. stat = 7.59$, $P=0.18$).

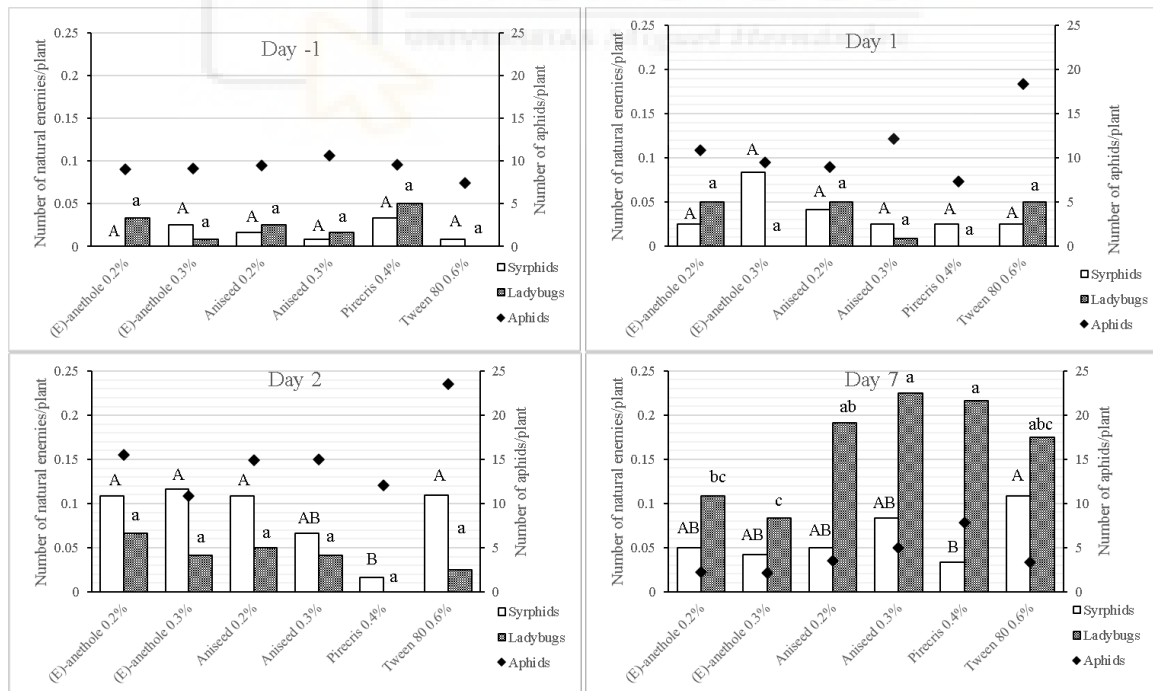


Figure 1. Natural enemies (syrphids and ladybugs) and aphid populations (insects/plant) in the lettuce crop on different days (before and after treatment) during the field experiment. Letters within the column indicate significant differences among the treatments for syrphids and ladybugs (each one separately). Data were analysed using R software with the GLM Poisson model, calculated with function `glm.nb` (package MASS), and differences between treatments were separated by Tukey's test of Estimated marginal means (`emmeans`-package).

4. Discussion

Our results confirm that there is a toxic effect of aniseed EO and its main compound (*E*)-anethole against the currant-lettuce aphid, *N. ribisnigri*. The literature reports the repellent and toxic effects of aniseed against different groups of insects (Pascual-Villalobos et al. 2021; López et al. 2008; Park et al. 2006; Spinozzi et al. 2021; Cantó-Tejero et al. 2021). Other authors have also reported the repellent or toxic effect of plant essential oils (where (*E*)-anethole is the main compound) belonging to different botanical families against insects, such as Magnoliaceae (Li et al. 2017; Ho et al. 1995), Lamiaceae (de Paula et al. 2003) or Rutaceae (Guo et al. 2017) among others. According to Cantó-Tejero et al. (2021), the toxic effect caused by aniseed EO is due to (*E*)-anethole, and the results from our greenhouse and field experiments confirm this.

The key factors that determine the suitability of essential oils for biopesticide production are activity against the pest, availability, price, and regulatory approval (Isman, 2020). (*E*)-anethole is one of the main compounds present in the essential oils of aniseed and fennel (*Foeniculum vulgare* Miller) (Pavela, 2018). Anise is one of the most important crops in the production of essential oils due to its wide range of applications in medicine or the food industry (Hashem et al. 2018). In this sense, aniseed EO is a good option, because there is a large-scale market production with an acceptable price (7-9 €/Kg) (Lubbe and Veeporte, 2011). In addition, its use is regulated in Europe and is classified as GRAS (Generally Recognized As Safe) by the USFDA (Food and Drug Administration) and EPA (Environmental Protection Agency) in the United States (Rocha and Fernandes, 2016; Pavoni et al. 2020).

Spraying nanoemulsions of aniseed EO and (*E*)-anethole at 0.4% (v/v) on *N. ribisnigri* populations reduced and stopped colony development for one week. Other works have also studied the effect of (*E*)-anethole on other species of aphids. For instance, Benelli et al. (2018) obtained a lethal dose 50 and 90 (0.43 and 0.95% (v/v)) of aniseed EO against *M. persicae*. In a similar bioassay, they obtained a LC90=0.24% against *M. persicae* by spraying a formulation of fennel (67.9% of (*E*)-anethole) (Pavela, 2018). In our previous work on *M. persicae* and *M. euphorbiae*, we reported the mortality and reduction in the development of aphid populations sprayed with nanoemulsions of (*E*)-anethole at 0.2% (v/v) (Cantó-Tejero et al. 2021).

Chemical treatments are usually carried out preventively on lettuce crops, since aphid spots cannot be detected in large areas of monocultures (Barrière et al. 2014.). Morales et al. (2013) established economic damage thresholds for *N. ribisnigri* of 0.06 to 0.13 aphids or over per plant. Plants must be treated before forming the head of lettuce to avoid cosmetic damage in the crop. The control exerted by predators (syrphids and ladybugs) over aphids in the crop can be useful if it is combined with insecticide treatments when needed (if products are compatible). The presence of natural enemies in the early stages of lettuce crops when the pest appears can help reduce the treatments needed to manage the aphids. Fagan et al. (2010) reduced the number of treatments with the insecticide imidacloprid to control *N. ribisnigri*, combining its use with the action of natural enemies that appeared in the crop. However, neonicotinoid insecticides such as imidacloprid are known to be toxic against syrphids, ladybugs, and bees (Jansen, 1998; Youn et al. 2003; Cressey, 2017). Other authors reported that the presence of hoverflies in the crop was common, favouring their appearance using reservoir plants such as coriander (*Coriandrum sativum* L.), chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.) or sweet alyssum (*Lobularia maritima* L.) (Pascual-Villalobos et al. 2004, 2006; Gillespie et al. 2011). However, Pascual-Villalobos et al. (2006) indicated that the installation of natural enemies in the crop was conditioned by a previous establishment of aphid populations. Only the larval stages of hoverflies act as aphids' predators (Amorós-Jiménez, 2015), and due to this, their settlement in the crop is necessary to develop their biological cycle and to therefore exert aphid control.

During our field experiment, the aniseed EO and (*E*)-anethole treatments proved to be compatible with hoverflies and ladybugs. After spraying the nanoformulations, the number of natural enemies was maintained and even increased. On the other hand, pyrethrins were toxic to syrphids. Cantó-Tejero et al. (2021) reported that larvae of the hoverfly *Sphaerophoria rueppellii* (Wiedemann) (Diptera: Syrphidae) exposed to nanoemulsions of (*E*)-anethole 0.3% (v/v) were not damaged (less than 10%). In other studies, it was reported that the topical application of fennel EO (67.9% of (*E*)-anethole) at 0.37% (v/v) was not toxic against the ladybug *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) (Pavela, 2018).

4. Conclusions

The results obtained from this work are promising. The nanoemulsion of aniseed essential oil at a concentration of 0.4% was toxic to *N. ribisnigri* and compatible with their natural enemies (hoverflies and ladybugs). In the future, its use could be combined with other tools to manage aphids (natural enemies or cultivars resistant to aphids).

However, more research is necessary to improve formulations so that they are more efficient and to enhance the insecticidal properties of aniseed essential oil.

Acknowledgements

This work was funded by the research projects (INIA RTA2014-00001, INIA RTA2017-00001 and FEDER 1420-19) supported by the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology, Spain. Manuel Cantó acknowledges financial support from the predoctoral research fellowship INIA CDP2016-0092 (National Institute for Agricultural and Food Research and Technology, Spain). Syrphid species were identified by Dr. M. Ángeles Marcos-García (University of Alicante, Spain).

References

Amorós-Jiménez, R., Robert, C.A., Marcos-García, M.Á., Fereres, A., Turlings, T.C., 2015. A differential role of volatiles from conspecific and heterospecific competitors in the selection of oviposition sites by the aphidophagous hoverfly *Sphaerophoria rueppellii*. *J. Chem. Ecol.* 41(5), 493-500. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0583-9>

Barrière, V., Lecompte, F., Nicot, P.C., Maisonneuve, B., Tchamitchian, M., Lescourret, F., 2014. Lettuce cropping with less pesticides. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 34(1), 175-198. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0158-5>

Benelli, G., Pavela, R., Petrelli, R., Cappellacci, L., Canale, A., Senthil-Nathan, S., Maggi, F., 2018. Not just popular spices! Essential oils from *Cuminum cyminum* and *Pimpinella anisum* are toxic to insect pests and vectors without affecting non-target invertebrates. *Ind. Crop. Prod.* 124, 236-243. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.048>

Cantó-Tejero, M., Casas, J.L., Marcos-García, M.Á., Pascual-Villalobos, M.J., Florencio-Ortiz, V., Guirao, P., 2021. Essential oils-based repellents for the management of *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*. *J. Pest Sci.* 1-15. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01380-5>

Cid, M., Ávila, A., García, A., Abad, J., Fereres, A., 2012. New sources of resistance to lettuce aphids in *Lactuca* spp. *Arthropod Plant Interact.* 6(4), 655-669. <https://doi.org/10.1007/s11829-012-9213-4>

Cressey, D., 2017. Neonics vs bees. *Nature.* 551(7679), 156-158.

de Paula, J.P., Gomes-Carneiro, MR., Paumgarten, F.J., 2003. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. *J. Ethnopharmacol.* 88(2-3), 253-260. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00233-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00233-2)

Dinno, A., 2017. dunn.test: Dunn's Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums. R package version 1.3.5. <https://CRAN.R-project.org/package=dunn.test>

Fagan, L.L., McLachlan, A., Till, C.M., Walker, M.K., 2010. Synergy between chemical and biological control in the IPM of currant-lettuce aphid (*Nasonovia ribisnigri*) in Canterbury, New Zealand. *Bull. Entomol. Res.* 100(2), 217-223. <https://doi.org/10.1017/S0007485309990174>

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021. FAOSTAT Statistics Database. FAO, Rome. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QV>

Gentz, M.C., Murdoch, G., King, G.F., 2010. Tandem use of selective insecticides and natural enemies for effective, reduced-risk pest management. *Biol. Control.* 52(3), 208-215. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.07.012>

Gillespie, M., Wratten, S., Sedcole, R., Colfer, R., 2011. Manipulating floral resources dispersion for hoverflies (Diptera: Syrphidae) in a California lettuce agroecosystem. *Biol. Control.* 59(2), 215-220. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.07.010>

Guo, S.S., Zhang, W.J., Yang, K., Liang, J.Y., You, C.X., Wang, C.F., Li, Y.P., Geng, Z.F., Deng, Z.W. Du, S.S., 2017. Repellence of the main components from the essential oil of *Glycosmis lucida* Wall. ex Huang against two stored product insects. *Nat. Prod. Res.* 31(10), 1201-1204. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1226825>

Hashem, A.S., Awadalla, S.S., Zayed, G.M., Maggi, F., Benelli, G., 2018. *Pimpinella anisum* essential oil nanoemulsions against *Tribolium castaneum*—insecticidal activity and mode of action. Environ. Sci. Pollut. Res. 25(19), 18802-18812. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2068-1>

Henderson, C.F., Tilton, E.W., 1955. Tests with acaricides against the brown wheat mite. J. Econ. Entomol. 48(2), 157-161.

Ho, S.H., Ma, Y., Goh, P.M., Sim, K.Y., 1995. Star anise, *Illicium verum* Hook f. as a potential grain protectant against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. Postharvest Biol. Tec. 6(3-4), 341-347. [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(95\)00015-X](https://doi.org/10.1016/0925-5214(95)00015-X)

Hubert, J.J., 1992. Bioassay. Third edition, Kendall. Hunt., Dubuque, Iowa. 198pp.

Isman, M.B., 2020. Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. Phytochemistry Rev. 19(2), 235-241. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09653-9>

Jansen, J.P., 1998. Side effects of insecticides on larvae of the aphid specific predator *Episyrphus balteatus* (Degeer) (Dipt. Syrphidae) in the laboratory. Med. Fac. Landbouwwet. Univ. Gent, 63: (2b), 585-592

Length, R. V., 2021. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.7.0. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>

Li, S.G., Zhou, B.G., Li, M.Y., Liu, S., Hua, R.M., Lin, H.F., 2017. Chemical composition of *Illicium verum* fruit extract and its bioactivity against the peach–potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). Arthropod Plant Interact. 11(2), 203-212. <https://doi.org/10.1007/s11829-016-9480-6>

López, M.D., Jordán, M.J., Pascual-Villalobos, M.J., 2008. Toxic compounds in essential oils of coriander, caraway and basil active against stored rice pests. J. Stored Prod. Res. 44(3), 273-278. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.02.005>

Lubbe, A., Verpoorte, R., 2011. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. Ind. Crop. Prod. 34(1), 785-801. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.01.019>

Morales, I., Diaz, B.M., De Mendoza, A.H., Nebreda, M., Fereres, A., 2013. The development of an economic threshold for *Nasonovia ribisnigri* (Hemiptera: Aphididae) on lettuce in central Spain. J. Econ. Entomol. 106(2), 891-898. <https://doi.org/10.1603/EC12275>

Park, I.K., Choi, K.S., Kim, D.H., Choi, I.H., Kim, L.S., Bak, W.C., Choi, J.W., Shin, S.C., 2006. Fumigant activity of plant essential oils and components from horseradish (*A Armoracia rusticana*), anise (*Pimpinella anisum*) and garlic (*Allium sativum*) oils against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). Pest Manag. Sci. 62(8), 723-728. <https://doi.org/10.1002/ps.1228>

Pascual-Villalobos, M.J., Cantó-Tejero, M., Vallejo, R., Guirao, P., Rodríguez-Rojo, S., Cocero, M.J., 2017. Use of nanoemulsions of plant essential oils as aphid repellents. Ind. Crop. Prod. 110, 45-57. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.019>

Pascual-Villalobos, M.J., Castañé, C., Martín, F., López, M.D., Guirao, P., Riudavets, J. 2021. (*E*)-Anethole microspheres as an alternative insecticide in funnel traps. J. Stored Prod. Res. 93, 101862. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2021.101862>

Pascual-Villalobos, M.J., Guirao, P., Díaz-Baños, F.G., Cantó-Tejero, M., Villora, G., 2019. Oil in water nanoemulsion formulations of botanical active substances. In: Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives. Academic Press, London, pp. 223-247. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815829-6.00009-7>

Pascual-Villalobos, M.J., Lacasa, A., González, A., Varo, P., García, M.J., 2006. Effect of flowering plant strips on aphid and syrphid populations in lettuce. Eur. J. Agron. 24(2), 182-185. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2005.07.003>

Pascual-Villalobos, M.J., Sanchez, J.A., Kabaluk, T., Lacasa, A., Gonzalez, A., Varo, P., 2004. Spatial distribution of *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Hemiptera: Aphididae) in an intercropped organic lettuce plantation. Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas (España).

Pavela, R., 2018. Essential oils from *Foeniculum vulgare* Miller as a safe environmental insecticide against the aphid *Myzus persicae* Sulzer. Environ. Sci. Pollut. Res. 25(11), 10904-10910. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1398-3>

Pavela, R., Maggi, F., Cianfaglione, K., Bruno, M., Benelli, G., 2018. Larvicidal activity of essential oils of five Apiaceae taxa and some of their main constituents against *Culex quinquefasciatus*. Chem. Biodivers. 15(1), e1700382. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700382>

Pavoni, L., Perinelli, D.R., Bonacucina, G., Cespi, M., Palmieri, G.F., 2020. An overview of micro-and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. Nanomaterials. 10(1), 135. <https://doi.org/10.3390/nano10010135>

R Core Team, 2019. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

Ribeiro, L.P., Akhtar, Y., Vendramim, J.D., Isman, M.B., 2014. Comparative bioactivity of selected seed extracts from Brazilian *Annona* species and an acetogenin-based commercial bioinsecticide against *Trichoplusia ni* and *Myzus persicae*. Crop. Prot. 62, 100-106. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.013>

Rincon, L., 2008. Requerimientos de nutrientes en fertirrigación de lechugas especies y minilechugas. Vida Rural, (266), 56-60.

Rocha, L., Fernandes, C.P., 2016. Aniseed (*Pimpinella anisum*, Apiaceae) Oils, In: Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Academic Press, London, pp. 209-213 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00022-5>

Rufingier, C., Schoen, L., Martin, C., Pasteur, N., 1997. Resistance of *Nasonovia ribisnigri* (Homoptera: Aphididae) to five insecticides. J. Econ. Entomol. 90(6), 1445-1449. <https://doi.org/10.1093/jee/90.6.1445>

Spinozzi, E., Maggi, F., Bonacucina, G., Pavela, R., Boukouvala, M.C., Kavallieratos, N.G., Canale, A., Romano, D., Desneux, N., Wilke, A.B.B., Berez, J.C., Benelli, G., 2021. Apiaceae essential oils and their constituents as insecticides against mosquitoes - A review. Ind. Crop. Prod. 171, 113892. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113892>

Stark, J.D., Banks, J.E., 2003. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. Annu. Rev. Entomol. 48:505–519. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112621>

ten Broeke, C.J., Dicke, M., van Loon, J.J., 2013. Performance and feeding behaviour of two biotypes of the black currant-lettuce aphid, *Nasonovia ribisnigri*, on resistant and susceptible *Lactuca sativa* near-isogenic lines. Bull. Entomol. Res. 103(5), 511-521. <https://doi.org/10.1017/S0007485312000880>

Venables, W.N., Ripley, B.D., 2002. Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0

Verbeek, M., Dullemans, A.M., van der Vlugt, R.A.. 2017. Aphid transmission of Lettuce necrotic leaf curl virus, a member of a tentative new subgroup within the genus Torradovirus. Virus Res. 241, 125-130. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.02.008>

Walley, P.G., Hough, G., Moore, J.D., Carder, J., Elliott, M., Mead, A., Jones, J., Teakle, G., Barker, G., Buchanan-Wolleston, V., Hand, P., Pink, D., Collier, R., 2017. Towards new sources of resistance to the currant-lettuce aphid (*Nasonovia ribisnigri*). Mol. Plant Breed. 37(1), 4. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0606-4>

Youn, Y. N., Seo, M. J., Shin, J. G., Jang, C., & Yu, Y. M., 2003. Toxicity of greenhouse pesticides to multicolored Asian lady beetles, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). Biol. Control. 28(2), 164-170. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(03\)00098-7](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(03)00098-7)



5. Resultados generales y discusión

En el presente capítulo se han aunado los resultados más significativos de las publicaciones que conformar esta Tesis (Capítulo 4) para proceder a la discusión de los mismos. Se han agrupado en función del efecto que han causado sobre los pulgones (efecto repelente y/o tóxico). Se exponen al final las posibles líneas de investigación derivadas del trabajo realizado en esta Tesis doctoral.

5.1. Repelencia de aceites esenciales en pulgones y enemigos naturales.

Inicialmente se evaluó la inhibición del asentamiento mediante un bioensayo de elección, en el que se estudió el efecto de 8 aceites esenciales y 12 compuestos puros sobre *M. euphorbiae* y dos clones de *M. persicae*. Se calculó un índice de repelencia (I.R.) para cada uno de los aceites esenciales y compuestos puros, así como las dosis repelentes 50 y 90 de aquellos que resultaron activos (I.R. >70%) (Tablas 1 y 2 de la Publicación 4.1.). Los aceites esenciales de anís, albahaca y cymbopogon; y los compuestos puros (*E*)-anetol, citral, geraniol, farnesol y (*Z*)-jasmona fueron los más efectivos contra *M. euphorbiae* y ambos clones de *M. persicae* (I.R. > 70 %). El resto de los productos también resultaron activos en algunas ocasiones, produciéndose diferencias para un mismo aceite entre especies o incluso clones de *M. persicae* (como por ejemplo el lavandín que tan solo afectaba al clon verde de *M. persicae*) (Tabla 3 de la Publicación 4.1.). De todos los pulgones que se estudiaron el clon rosa de *M. persicae* fue el más resistente y al que menos afectaron los productos.

También se estudió la respuesta olfativa, mediante ensayos de olfatometría, de pulgones ápteros y alados de *M. persicae* y *M. euphorbiae* (Figuras 2 a 4 de la Publicación 4.1.) y sus enemigos naturales, *S. rueppellii* y *A. colemani* (Figuras 5 y 6 de la Publicación 4.1.) frente a algunos de los aceites esenciales y compuestos puros que resultaron más activos en el ensayo de inhibición del asentamiento. Para los pulgones, se seleccionaron el (*E*)-anetol, farnesol, mezcla de (*E*)-anetol : farnesol (1:1) y (*Z*)-jasmona. En ningún caso los volátiles de los tratamientos que contenían (*E*)-anetol mostraron una actividad repelente. Sin embargo, la (*Z*)-jasmona fue repelente para los pulgones alados de ambas especies, mientras que el farnesol fue repelente para ápteros de *M. euphorbiae* y alados de ambas especies.

En cambio, en los enemigos naturales el farnesol fue atrayente para las larvas de *S. rueppellii* y hembras adultas de *A. colemani*. Otros de los aceites testados mostraron efectos repelentes sobre *S. rueppellii* (aceite esencial de anís y (*E*)-anetol) y *A. colemani* (citral, (*Z*)-jasmona y salicilato de metilo).

Del trabajo realizado en la Publicación 4.1. se puede concluir que los aceites esenciales de anís, albahaca y cymbopogon y los compuestos puros (*E*)-anetol, farnesol, (*Z*)-jasmona, citral y geraniol inhiben el asentamiento de *M. persicae* y *M. euphorbiae*, de igual forma que observamos en un trabajo previo que realizamos con el pulgón del cereal *R. padi* (Pascual-Villalobos et al., 2017). A priori el bioensayo de inhibición del asentamiento puede considerarse útil para medir la repelencia, sin embargo, la evitación de la zona tratada con el aceite también puede deberse a que sus vapores o el contacto residual con el mismo produzcan un efecto irritante, antialimentario y/o tóxico sobre el pulgón. De hecho, este mismo bioensayo nos permitió observar los efectos tóxicos del (*E*)-anetol sobre *R. padi* (Pascual-Villalobos et al., 2017) cuando se evitó la ventilación de las placas y por tanto se produjo una mayor concentración de los volátiles en su interior.

Observando los resultados del olfatómetro se puede sugerir que los compuestos puros farnesol y (*Z*)-jasmona son repelentes contra *M. persicae* y *M. euphorbiae*. En cambio, los volátiles del (*E*)-anetol no repelen a *M. persicae* y *M. euphorbiae* por lo que quizás utilizar el término deterrente como propone Isman (2019) es más adecuado (cuando no se puede diferenciar si su naturaleza es un efecto anti alimentario, irritante u otro).

Algunos de los aceites esenciales y compuestos puros ensayados en esta Tesis han sido activos contra *M. persicae* o *M. euphorbiae* como la albahaca, coriandro, hinojo menta piperita y no afectaban a *R. padi*. Esto demuestra que el efecto que pueden ejercer los aceites puede ser diferente entre distintas especies de pulgón o incluso entre distintos clones de la misma especie como ocurre por ejemplo con el lavandin que inhibe el asentamiento del clon verde y no del rosa. Otros autores también han observado diferentes respuestas entre distintos clones de *M. persicae* y *A. pisum* frente al mismo tratamiento (Guilbaud y Khudr, 2020; Yan et al., 2020).

5.2. Efectos insecticidas de aceites esenciales en pulgón y toxicidad residual en enemigos naturales.

Se estudió el efecto insecticida de algunos de los aceites esenciales y compuestos puros más activos en el ensayo de inhibición del asentamiento. Los aceites se prepararon en nanoemulsiones líquidas y se evaluó su toxicidad sobre *M. persicae*, *M. euphorbiae* (Publicaciones 4.1. y 4.2.) y *N. ribisnigri* (Publicación 4.3.) sobre plantas de pimiento y lechuga.

Los tratamientos con nanoemulsiones de farnesol al 0,2 % (v/v) y (*E*)-anetol + farnesol (0,2 : 0,2 % v/v) redujeron las poblaciones de *M. persicae* y *M. euphorbiae* a más de la mitad (eficacias superiores al 50%) sin causar fitotoxicidad a las plantas de pimiento. Los tratamientos con (*E*)-anetol y (*Z*)-jasmona al 0,2 % (v/v) redujeron ligeramente las poblaciones de pulgón después de 1 día del tratamiento siendo mayor en *M. persicae* (eficacias < 25 %) (Tabla 4 de la Publicación 4.1.).

También se diseñó un bioensayo de laboratorio en placa Petri con hojas de pimiento para poder testar un mayor número de formulaciones líquidas de aceites esenciales de forma tópica sobre pulgones que se probaron sobre el clon rosa de *M. persicae*. En una batería inicial se evaluaron 3 aceites esenciales y 7 compuestos puros formulados al 0,6 % (v/v). De los aceites esenciales el anís causó una mayor mortalidad (58,3 %), mientras que de los compuestos puros fueron (*Z*)-jasmona (50,3 %), geraniol (52,5 %) y farnesol (94,1 %) (Figura 1 de la Publicación 4.2.). Las dosis letales 50 y 90 calculadas para el farnesol fueron de 0,394 y 0,575 %, respectivamente (Tabla 1 de Publicación 4.2.).

Para *N. ribisnigri* se evaluaron tratamientos de aceite esencial de anís, su compuesto mayoritario el (*E*)-anetol y el farnesol al 0,4 % (v/v) reduciendo las poblaciones de pulgón significativamente respecto del control con eficacias superiores al 50 % durante todo el ensayo, siendo el aceite esencial de anís el tratamiento más efectivo (eficacia del 70 %, tres días después del tratamiento) (Tabla 1 de Publicación 4.3.). A pesar de que el farnesol mostró buenos resultados se produjeron daños en la planta de lechuga, mientras que el resto de los aceites no lo hicieron.

Los compuestos puros más activos testados en los ensayos de olfatometría también se formularon como nanoemulsiones para estudiar su efecto residual sobre los enemigos naturales de los pulgones *S. rueppellii* y *A. colemani*. Se evaluaron nanoemulsiones de (*E*)-anetol, farnesol, (*E*)-anetol + farnesol (1 : 1) y (*Z*)-jasmona en un rango de dosis entre 0,1 – 0,3 % (v/v), sin causar efectos secundarios relevantes sobre las larvas de *S. rueppellii*. Los adultos de *A. colemani* fueron más susceptibles a los tratamientos de los compuestos puros al 0,1 % (v/v) mortalidad (> 50 %), y en torno al 100% a la dosis del 0,2 % (v/v), probablemente causado por el surfactante utilizado (Tween80) en los controles que también causaron una mortalidad elevada (35 y 87,2 %). En cuanto a los controles solo con agua la mortalidad fue inferior al 10 % en todos los casos (Tabla 5 de la Publicación 4.1).

De los aceites esenciales testados, ha sido el de anís uno de los más activos junto a su compuesto mayoritario el (*E*)-anetol en el bioensayo de inhibición del asentamiento. A pesar de no mostrar efectos repelentes en el ensayo de olfatometría si fueron tóxicos en los ensayos con planta de pimiento y lechuga sobre *M. persicae*, *M. euphorbiae* y *N. ribisnigri*. Otros autores también hablan del efecto insecticida por contacto (Benelli et al., 2018; Pavela, 2018) o actividad fumigante (Tunç y Şahinkaya, 1998; Digilio et al., 2008) de los aceites esenciales de anís e hinojo (compuesto mayoritario (*E*)-anetol) sobre pulgones. También se ha documentado su potencial insecticida en otros grupos de insectos (Park et al., 2006; Spinozzi et al., 2021; Pascual-Villalobos et al., 2021).

En trabajos previos también se observó que los vapores del (*E*)-anetol producen mortalidad sobre hembras adultas de *R. padi* y *M. persicae* (Pascual-Villalobos et al., 2017, 2020). Los resultados obtenidos durante esta Tesis indican que el efecto tóxico producido por el aceite esencial de anís se debe a su compuesto mayoritario el (*E*)-anetol (96,9 % de su composición), aunque el hinojo (30,9 % de (*E*)-anetol) no produzca mortalidad o repelencia. Los efectos producidos por estos aceites en todos los ensayos realizados durante la Tesis y otros trabajos realizados en el grupo de investigación sugieren que se produce un efecto tóxico y una inhibición del asentamiento sin que se pueda atribuir a una repelencia olfativa.

Durante todos los ensayos de esta Tesis la actividad ha sido mayor para los compuestos puros que para los aceites esenciales. Esto se debe a que son los compuestos puros mayoritarios los que causan principalmente los efectos del aceite (Deletre et al., 2016). Sin embargo, los distintos compuestos que conforman los aceites (mayoritario/s y

minoritarios) pueden actuar como sinergistas o antagonistas entre sí (Regnault-Roger et al., 2004). Algo similar ocurre con el aceite esencial de anís, que es más efectivo contra *N. ribisnigri* que el (*E*)-anetol puro a la misma dosis, por lo que es posible que algún compuesto minoritario del aceite esencial este generando un efecto de adición o sinergia. El caso contrario ocurre con el (*E*)- β -farnesano (compuesto mayoritario del aceite esencial de *Hemizygia petiolata* Ashby) que produce un fuerte efecto repelente sobre *M. persicae*, mientras que el aceite esencial no lo produce (a consecuencia de la presencia de otros compuestos minoritarios (+)-bicyclogermacreno y (-)-germacreno D) (Bruce et al., 2005).

Del resto de los compuestos puros ensayados el farnesol, geraniol, citral y la (*Z*)-jasmona fueron los más efectivos mostrando efectos repelentes y/o tóxicos. Birkett et al., (2000) observó que aplicaciones de 1 μg de (*Z*)-jasmona producía un efecto repelente contra *N. ribisnigri* en ensayos de olfatometría de 4 brazos. Otros autores han realizados tratamientos de (*Z*)-jasmona para que actúen como elicitores de señales de defensa en plantas de trigo, produciéndose una repelencia sobre el pulgón *Sitobion avenae* (Fabricius) (Hemiptera: Aphididae) (Bruce et al., 2003), mientras que su aplicación sobre plantas de pimiento no tuvo ningún efecto sobre *M. persicae* (Dewhurst et al., 2012). Sin embargo, la respuesta que puedan inducir estos tratamientos sobre la planta está limitada a una cantidad máxima de metabolitos de defensa que es capaz de liberar la planta y muchas veces no es suficiente para el control de la plaga. En los ensayos de laboratorio que se han realizado, se ha visto que los tratamientos tópicos con (*Z*)-jasmona al 0,6 % (v/v) también resultan tóxicos contra *M. persicae* (50,3 % de mortalidad).

El citral y el geraniol también se mostraron muy activos en los ensayos de laboratorio. El citral es una mezcla de dos isómeros (geranial + neral) que se ha calificado como repelente y deterrente de insectos (Leal y Uchida, 1998; Lü y Liu, 2016; Plata-Rueda et al. 2020). El geraniol ha mostrado un mayor efecto repelente. Gutiérrez et al., (1997) también observaron el mismo efecto sobre *M. persicae* utilizando el mismo bioensayo obteniendo una DR50 similar a la obtenida en este trabajo (0,0531 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) o que hemos obtenido en trabajos previos con *R. padi* (0.044 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) (Pascual-Villalobos et al., 2017).

5.3. Optimización de las aplicaciones con nanoemulsiones de aceites esenciales en cultivos de pimiento y lechuga (en semicampo y campo).

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de laboratorio se seleccionaron el aceite esencial de anís y su compuesto mayoritario (*E*)-anetol y el farnesol para medir la eficacia de los tratamientos foliares en semicampo y campo que se realizaron en plantas de pimiento sobre *M. persicae* (Publicación 4.2.) y plantas de lechuga sobre *N. ribisnigri* (Publicación 4.3) durante varios años. Además de los aceites seleccionados también se utilizó un insecticida de referencia comercial a base de piretrinas y los controles oportunos (agua + surfactante).

El farnesol fue el compuesto puro que mejores resultados mostró en los experimentos de laboratorio. En semicampo se probó inicialmente a la dosis del 0,6 % (v/v) reduciendo significativamente las poblaciones de *M. persicae* (eficacias de hasta el 99%), similares a las eficacias del insecticida a base de piretrinas. Sin embargo, el tratamiento también produjo efectos fitotóxicos sobre las plantas de pimiento. El segundo año de semicampo se volvió a realizar tratamientos de farnesol a las dosis de 0,4 y 0,6 % (v/v) reduciendo las poblaciones significativamente después del control con eficacias similares (en torno al 65 %) dos días después del tratamiento. En cuanto a la fitotoxicidad, la dosis de 0,6 % (v/v) volvió a causar daños en la planta, mientras que a la dosis de 0,4 % (v/v) fue compatible con el cultivo (Tabla 2 de la Publicación 4.2.).

También se realizaron tratamientos con nanoemulsiones de farnesol al 0,4 % (v/v) contra *N. ribisnigri* en semicampo, aunque tuvo peor resultado que con *M. persicae*. El tratamiento no redujo las poblaciones de pulgón, pero sí frenó su desarrollo durante todo el ensayo respecto del control (Tabla 2 de la Publicación 4.3.). Además, el tratamiento con farnesol al 0,4 % (v/v) resultó fitotóxico en las plantas de lechuga por lo que no se evaluó en el ensayo de campo.

Durante dos campañas se evaluó el efecto de diferentes nanoemulsiones de farnesol (en tres ensayos) en un rango entre 0,2 y 0,6 % (v/v) en condiciones reales de cultivo en invernaderos de pimiento (Tabla 3 de la Publicación 4.2.). Inicialmente se evaluó el efecto insecticida del farnesol al 0,6% (v/v), causando reducciones significativas en el número de pulgones por planta iniciales (283,56 pulgones por planta) respecto de dos días después del tratamiento (50,06 pulgones por planta) con una eficacia del 72,92 %. Sin embargo, al igual que en los ensayos de semicampo causó daños sobre el cultivo por lo que para el resto de los experimentos se redujo la dosis de tratamiento.

La dosis de farnesol al 0,4% (v/v) se evaluó en los tres experimentos realizados durante las dos campañas, produciéndose reducciones significativas en el número de pulgones por planta en los 3 casos (menos de la mitad inicial). En los dos primeros ensayos de campo las eficacias fueron similares dos días después del tratamiento (aproximadamente el 70 %) mientras que en el tercero la eficacia fue del 78,99 % cuando las densidades de pulgones por planta eran menores. A diferencia de la dosis del 0,6 % (v/v) los tratamientos no causaron daños sobre el cultivo. También se evaluaron nanoemulsiones de farnesol al 0,2 % (v/v), resultando menos efectivas. Redujeron las poblaciones de *M. persicae* significativamente con eficacias superiores al 40 % dos días después del tratamiento y sin causar daños sobre el cultivo, aunque al final del ensayo el número de pulgones por planta era similar que al inicio.

Durante los ensayos de campo no se observó una gran abundancia de enemigos naturales de los pulgones (incluidos los controles con agua) debido a que la duración de los ensayos fueron periodos cortos en los que no dio tiempo que se instalase la fauna auxiliar. Pero si se observaron momias y larvas de cecidómidos después de los tratamientos en los controles y en las plantas tratadas con farnesol.

Las nanoemulsiones del aceite esencial de anís y su compuesto mayoritario el (*E*)-anetol se evaluaron sobre *M. persicae* a la dosis de 0,6 % (v/v) durante el primer ensayo de semicampo realizado sobre pimiento. Los tratamientos redujeron significativamente las poblaciones iniciales de pulgón durante los dos primeros días después del tratamiento siendo más efectivo el anís que el (*E*)-anetol (eficacias del 68 y 62 % respectivamente) (Tabla 2 de la Publicación 2). Sin embargo, produjo daños en la planta y fue menos efectivo que el farnesol y por ese motivo se descartó para los sucesivos experimentos con pimiento. Sobre lechuga se evaluaron las nanoemulsiones de anís y (*E*)-anetol al 0,2 y 0,4 % cada una de ellas en los ensayos de semicampo (Tabla 2 de la Publicación 4.3.). Los tratamientos de anís y (*E*)-anetol redujeron las poblaciones de *N. ribisnigri* significativamente con eficacias de tratamiento entre el 40,1 y 47,5 % tres días después del tratamiento frenando el crecimiento de las colonias de pulgón durante una semana. Al contrario que el farnesol, los tratamientos de anís (*E*)-anetol al 0,4 % (v/v) no causaron daños sobre las plantas de lechuga. Los tratamientos del anís y (*E*)-anetol al 0,2 % (v/v) fueron menos efectivos dos días después del tratamiento (22,7 y 20,7 % respectivamente) pero frenaron el crecimiento de las colonias de pulgones durante 6 días respecto del

control, acabando el ensayo con el mismo número de pulgones que al inicio del ensayo (entre 40 y 45 pulgones por planta).

En condiciones reales del cultivo en una parcela de lechuga al aire libre se evaluaron las nanoemulsiones de anís y (*E*)-anetol al 0,2 y 0,3 % (v/v) cada una. Los tratamientos de los aceites esenciales redujeron el número de pulgones por planta de *N. ribisnigri* en comparación del control dos días después de los tratamientos (eficacias entre el 40-50 %) siendo el insecticida de piretrinas el más efectivo (Eficacia del 58,1 %) (Tabla 3 de la Publicación 3). En ninguno de los tratamientos se observaron daños sobre el cultivo, siendo homogéneas las producciones de todas las parcelas elementales del ensayo. Durante todo el ensayo se observaron enemigos naturales (sírpidos y mariquitas principalmente) en las plantas de todos los tratamientos, siendo las poblaciones de insectos beneficiosos superiores en las plantas tratadas con aceites esenciales dos días después de los tratamientos (Figura 1 de Publicación 3). En cambio, en las plantas tratadas con piretrinas si se observaron mortalidad de mariquitas a causa del tratamiento.

En los ensayos de semicampo con pimiento y lechuga el aceite esencial de anís y el (*E*)-anetol han producido reducciones significativas en las poblaciones de pulgones, pero en el caso del pimiento han producido daños sobre el cultivo. Digilio et al., (2008) también observaron en su estudio que los vapores de los aceites esenciales de anís e hinojo producían efectos fitotóxicos sobre las plantas de pimiento. En cambio, en el presente trabajo no se observaron daño sobre las plantas de lechuga, al igual que en los ensayos de Benelli et al., (2018) sobre repollo utilizando dosis similares. A pesar de que las nanoemulsiones de anís y (*E*)-anetol evaluadas no mostraron eficacias lo suficientemente altas como para controlar las colonias de *N. ribisnigri* por si solas en campo, también se han mostrado respetuosas con la fauna auxiliar, especialmente con sírpidos y mariquitas. De hecho, en los ensayos de toxicidad residual las nanoemulsiones de (*E*)-anetol a las dosis entre 0,1 y 0,3 % (v/v) no produjeron mortalidad sobre las larvas del sírfido *S. rueppellii* (menos del 10%), también presente en los ensayos de campo. Otros trabajos también reportan que la aplicación tópica del aceite esencial de anís (67,9% de (*E*)-anetol) a la dosis del 0,37 % (v/v) no es tóxico contra el coccinélido *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) (Pavela, 2018). En este sentido se puede integrar el uso de nanoemulsiones de anís y/o (*E*)-anetol dentro de programas de Gestión Integrada de Plagas (GIP), reduciendo el número de tratamientos químicos para el control de pulgones compatibilizándose con el control biológico de plagas y el uso de variedades de lechuga

resistentes a *N. ribisnigri*. Fagan et al., (2010) consiguieron reducir el número de tratamientos con imidacloprid para el control de *N. ribisnigri* gracias a la acción de los enemigos naturales que aparecían de forma espontánea en el cultivo. Otros autores reportan que la reducción de tratamientos fitosanitarios o instalación de plantas reservorios en el cultivo como el coriandro, crisantemo (*Chrysanthemum coronarium* L.) o *Lobularia maritima* L. favorecen la aparición e instalación de sírfidos en el cultivo (Pascual-Villalobos et al., 2004; Gillespie et al., 2011), siendo necesaria la presencia de pulgones para que se asienten (Pascual-Villalobos et al., 2006), debido a que son las larvas del sírfido las que depredan al pulgón (Amorós-Jiménez et al., 2015). Sin embargo, para poder depender menos de los tratamientos fitosanitarios en los sistemas de producción de lechuga es necesario reducir algunos de los requisitos actuales impuestos por las cadenas de distribución alimentarias europeas, poco realistas, en los que se exige residuo cero, pero con productos finales sin ningún tipo de daño estético o presencia de algún insecto.

El farnesol ha sido el compuesto puro que ha mostrado mayores efectos tóxicos y repelentes frente a todas las especies de pulgón ensayadas en esta Tesis. En los ensayos de elección se produjo una inhibición del asentamiento en *M. persicae* y *M. euphorbiae*, al igual que los trabajos previos realizados con *R. padi* (Pascual-Villalobos et al., 2017). Gutiérrez et al., (1996) también observó el mismo efecto del farnesol sobre *M. persicae* utilizando el mismo bioensayo, al igual Dancewick et al., (2010) que ensayó el farnesol y algunos de sus derivados utilizando un bioensayo de elección similar. En los ensayos de olfatometría de dos vías la aplicación de 10 µl de farnesol también causó un efecto repelente sobre *M. persicae* (alados) y *M. euphorbiae* (alados y ápteros).

En los ensayos de toxicidad tópica el farnesol ha sido el compuesto con un mayor efecto insecticida. Hay pocos trabajos que describan su efecto tóxico sobre insectos. Van Oosten et al., (1990) observaron que era tóxico sobre *Aphis fabae* Scopoli, mientras que Gutiérrez et al (1997) lo describió sobre *M. persicae* mediante un bioensayo de no elección (toxicidad residual) (20% de mortalidad sobre hembras adultas). Sin embargo, todos estos trabajos se han desarrollado en condiciones de laboratorio, aplicándose el compuesto puro sin formularlo y muy lejos de poder predecir los efectos sobre plantas en condiciones de cultivo. La mortalidad que se ha observado con el farnesol en los ensayos que se han desarrollado en esta Tesis se ha producido cuando se aplica por contacto tópico, aunque la mortalidad residual que produce es baja. Su formulación y aplicación es difícil debido a su insolubilidad en agua (Nowacka et al., 2020) y su fitotoxicidad sobre

las plantas. En los ensayos de laboratorio y semicampo con *N. ribisnigri* se descartó su uso por los efectos fitotóxicos producidos sobre las plantas de lechuga. Sobre pimiento también ha producido daños en algunos tratamientos (a la dosis de 0,6 % v/v) al igual que observó Gutiérrez et al., (1996). En cambio, las nanoemulsiones de farnesol al 0,2 y 0,4 % (v/v) no han resultado fitotóxicas sobre el pimiento en las condiciones que nosotros hemos utilizado. Las nanoemulsiones de farnesol al 0,4 % (v/v) han resultado muy eficaces reduciendo las poblaciones de *M. persicae* a más de la mitad (eficacias de hasta el 75% en algunos casos).

Además, los volátiles de farnesol causaron un efecto atrayente sobre las larvas de *S. rueppellii* y los adultos de *A. colemani* en los ensayos de olfatometría. También ha resultado atrayente, en trabajos de otros autores, en ensayos de olfatometría de dos vías sobre el parasitoide *Aphidius gifuensis* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) y sobre el depredador omnívoro generalista *Campylomma chinensis* Schuch (Hemiptera: Miridae) un que puede depredar pulgones (Ma et al., 2017; Zhang et al., 2020).

El farnesol pertenece a la familia del farneseno, al igual que la feromona de alarma de los pulgones el (*E*)- β -farnesano, ambos de similares estructuralmente (Tesh et al., 1992). Los efectos que ha mostrado el farnesol durante los experimentos realizados en esta Tesis son muy similares a los de la feromona de alarma de los pulgones (repelentes para pulgones y atrayentes para algunos de sus enemigos naturales) (Micha y Wyss, 1996). Bruce et al., (2005) comprobaron que los tratamientos con 7 μ l de (*E*)- β -farnesano sintético era repelente contra hembras aladas adultas de *M. persicae* en olfatómetro de 4 brazos, produciéndose el mismo efecto contra *S. avenae* en olfatómetro de 2 vías (Micha y Wyss, 1996). Otros autores citan el efecto atrayente del (*E*)- β -farnesano sobre los parasitoides *Aphidius uzbekistanicus* Luzhetskii, *Aphidius ervi* Haliday, y el coccinélido depredador *Adalia bipunctata* Linnaeus (Heuskin et al., 2012; Micha y Wyss, 1996; Francis et al., 2004). Gut y Van Oosten (1985) también indicaron que el (*E*)- β -farnesano ejerce un efecto tóxico cuando se aplica tópicamente sobre pulgones.

Las nanoemulsiones de farnesol pueden integrarse dentro de los programas de GIP del pimiento en invernadero para el control de pulgones, ya que ejerce un efecto tóxico y repelente sobre los pulgones y un efecto atrayente sobre algunos de sus enemigos naturales. Estas nanoemulsiones también han sido compatibles con las larvas de *S. rueppellii* en el ensayo de toxicidad residual (mortalidad del 2,5%) al igual que se han

observado la presencia de cecidómidos en las plantas de pimiento tratadas con farnesol en los ensayos de campo.

5.4. Investigaciones futuras

Los productos a base de farnesol, (*E*)-anetol y anís presentados en esta Tesis han sido satisfactorios para el control de *M. persicae* en pimiento y *N. ribisnigri* en lechuga (con resultados similares al insecticida de referencia en ciertas ocasiones). La utilización de estos aceites resulta difícil debido a su insolubilidad en agua y gran volatilidad. Al formularlos como nanoemulsiones, se reduce el tamaño de partícula aumentando su solubilidad (con la ayuda del surfactante) y aumenta la actividad biológica (Pascual-Villalobos et al., 2019). Una de las ventajas que poseen estos aceites es su fácil disponibilidad en el mercado, por lo que se puede garantizar un suministro adecuado y constante de los mismos. El anís es uno de los cultivos que presenta una mayor producción para la obtención de aceites esenciales debido al amplio rango de aplicaciones que posee en la industria alimentaria o farmacéutica (Hashem et al., 2018) siendo su precio muy asequible (7-9 €/kg) (Lubbe y Veeporte, 2011). En cuanto al farnesol también existe una gran disponibilidad debido a los múltiples usos que presenta para las industrias alimentarias o cosmética (Lapczynski et al., 2008; de Araújo Delmondes et al., 2019). Sin embargo, en un futuro sería interesante estudiar algunos de los aceites ricos en farnesol y ver si ejercen también los mismos efectos sobre los pulgones y enemigos naturales a fin de buscar nuevas fuentes de material vegetal que facilite su producción a gran escala aún más. En la literatura se citan diferentes aceites esenciales con un alto contenido de farnesol en su perfil cromatográfico como por ejemplo *Morina persica* Linnaeus (Dipsacales: Caprifoliaceae) (58.79 %), *Tephrosia vogelii* Hooker (Fabales: Fabaceae) (32,3 %) o *Madhuca longifolia* var. *latifolia* (Roxburgh) Chevalier (Ericales: Sapotaceae) (29,56 %) (Baser y Kürkçüoğlu, 1998; dos Santos et al., 2021; Suryawanshi y Mokat, 2019).

Los resultados que se han mostrado en esta Tesis son prometedores, sin embargo las formulaciones todavía deben mejorarse. En otros trabajos que hemos realizado en el grupo se han caracterizado algunos parámetros de las nanoemulsiones de farnesol (con Tween80) con tamaños de partícula en torno a 100 nm, índice de polidispersidad (PDI) de 0,1-0,5 y valores de potencial Z de -15 mV, por lo que son bastante estables (datos no publicados). También se ha observado que la utilización de otros surfactantes como la

lecitina de soja cambian las características (tamaños de partículas de 100-150 nm, PDI 0,4- 0,6 y potencial Z -40 - -50) y la actividad biológica de las nanoemulsiones (Pascual-Villalobos et al., 2019). Sin embargo, las propiedades físicas que presentan no son adecuadas porque durante su aplicación en la planta tienen poca tensión superficial y se forman grandes gotas sobre la planta. Este puede ser uno de los motivos por los que se genere una mayor fitotoxicidad. En trabajos futuros sería necesario investigar nuevos surfactantes para conseguir formulaciones iguales o más activas a menores dosis y se comporten mejor en las aplicaciones foliares si causar daños en la planta. Sobre todo, es necesario mejorar la actividad insecticida de las nanoemulsiones de anís y (*E*)-anetol.

El modo de acción de estos aceites sobre los pulgones no está claro. Estas moléculas pueden actuar de distinta forma en distintos insectos, ya que su presencia es habitual en las distintas rutas metabólicas de los seres vivos. Por ejemplo, el farnesol actúa como precursor de distintas hormonas juveniles de insectos holometábolos, induciendo la metamorfosis en su ausencia en los últimos estadios larvarios (De Loof y Schoofs, 2019). Investigar en el futuro el modo de acción y su efecto en los distintos estadios del pulgón del (*E*)-anetol y farnesol es necesario para mejorar la eficacia de las formulaciones y hacer un mejor manejo de ellas.



6. Conclusiones

Del trabajo realizado en esta Tesis doctoral se puede concluir:

- Los aceites esenciales de anís, albahaca y cymbopogon; y los compuestos puros (*E*)-anetol, geraniol, farnesol y (*Z*)-jasmona son repelentes inhibiendo el asentamiento de *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae* cuando se exponen de forma residual a la aplicación de los productos en hoja de pimiento.
- Los volátiles de los compuestos puros farnesol y (*Z*)-jasmona son repelentes de los pulgones *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae* en ensayos de olfatometría.
- El aceite esencial de anís y los compuestos puros (*E*)-anetol y farnesol son tóxicos contra *Myzus persicae*, *M. euphorbiae* y *Nasonovia ribisnigri*.
- El bioensayo de toxicidad por contacto puesto a punto en esta Tesis es más adecuado para evaluar el potencial tóxico de productos que actúan por contacto y son muy volátiles, como los aceites esenciales o piretrinas, que los ensayos de toxicidad residual que están estandarizados y se utilizan actualmente.
- Las nanoemulsiones de farnesol al 0,6 % (v/v) han sido tan eficaces como el insecticida de referencia a base de piretrinas para el control de *Myzus persicae* en pimiento (con eficacias superiores al 90 % en algunos casos).
- Las nanoemulsiones de farnesol al 0,4 % (v/v) han mostrado un gran efecto aficida cuando se pulveriza al cultivo de pimiento frente a *Myzus persicae* en condiciones de semicampo con eficacias entre el 56 y 79 %.
- El farnesol atrae a los enemigos naturales de los pulgones, *Aphidius colemani* y *Sphaerophoria rueppellii* (en ensayos de olfatometría). No es tóxico contra las larvas de *Sphaerophoria rueppellii* expuestas residualmente en los ensayos de laboratorio ni en otros enemigos naturales (cecidómidos y parasitoides) que aparecen de forma espontánea en los ensayos de campo, tampoco.

- Las nanoemulsiones de farnesol a la dosis de 0,4 % (v/v) o menor, no resultan fitotóxicas en las plantas de pimiento en las condiciones y volúmenes de aplicación empleados en los experimentos de esta Tesis, mientras que si lo son en lechuga.
- Los tratamientos con nanoemulsiones de anís y (*E*)-anetol a la dosis de 0,3 y 0,4 % (v/v) redujeron o frenaron el crecimiento de las poblaciones de *Nasonovia ribisnigri* en los experimentos de campo con lechuga al aire libre.
- El (*E*)-anetol no es tóxico contra las larvas de *Sphaerophoria rueppellii* expuestas residualmente en los ensayos de laboratorio y tampoco afecta junto al aceite esencial de anís a los sírfidos y mariquitas que aparecen de forma espontánea en el campo, por lo que es compatible usar estos enemigos naturales en el control biológico de *Nasonovia ribisnigri* en lechuga.
- Las nanoemulsiones de anís y (*E*)-anetol no causaron efectos fitotóxicos cuando se pulverizaron sobre el cultivo de lechuga a las dosis de 0,2 – 0,4 % (v/v).
- Los resultados obtenidos son prometedores, sin embargo, es necesario mejorar la formulación de las nanoemulsiones y seleccionar los surfactantes más adecuados que le confieran mejores propiedades fisicoquímicas y mejoren su eficacia.
- El uso del farnesol dentro de programas de control integrado de plagas junto con el control biológico en invernaderos de pimiento es una buena opción para el control de *Myzus persicae* en un futuro.
- El uso del aceite esencial de anís y su compuesto mayoritario el (*E*)-anetol en una buena opción para complementar el control de *Nasonovia ribisnigri* en lechuga junto con otras técnicas (cultivares resistentes, control biológico y otros productos fitosanitarios).



7. Referencias bibliográficas

Abdelgaleil, S. A., Abou-Taleb, H. K., Al-Nagar, N., Shawir, M. S. (2020). Antifeedant, growth regulatory and biochemical effects of terpenes and phenylpropenes on *Spodoptera littoralis* Boisduval. International Journal of Tropical Insect Science, 40(2), 423-433. <https://doi.org/10.1007/s42690-019-00093-8>

Al-Antary, T. M., Belghasem, I. H. (2017). Effect of mint oil against the green peach aphid *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae) using four solvents. Advances in Environmental Biology, 11(1), 61-68.

Amorós-Jiménez, R., Robert, C. A., Marcos-García, M., Fereres, A., Turlings, T. C. (2015). A differential role of volatiles from conspecific and heterospecific competitors in the selection of oviposition sites by the aphidophagous hoverfly *Sphaerophoria rueppellii*. Journal of Chemical Ecology, 41(5), 493-500. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0583-9>

Aslan, İ., Özbek, H., Çalmaşur, Ö., Şahin, F. (2004). Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. Industrial Crops and Products, 19(2), 167-173. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2003.09.003>

Barrière, V., Lecompte, F., Nicot, P. C., Maisonneuve, B., Tchamitchian, M., Lescourret, F. (2014). Lettuce cropping with less pesticides. A review. Agronomy for sustainable development, 34(1), 175-198. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0158-5>

Baser, K. H. C., Kürkçüoğlu, M. (1998). Composition of the essential oil of *Morina persica* L. flowers. Journal of Essential Oil Research, 10(1), 117-118. <https://doi.org/10.1080/10412905.1998.9700856>

Behi, F., Bachrouch, O., Fekih, I. B., Boukhris-Bouhachem, S. (2017). Insecticidal and synergistic activities of two essential oils from *Pistacia lentiscus* and *Mentha pulegium* against the green peach aphid *Myzus persicae*. Tunisian Journal of Plant Protection, 12, 53-65.

Benavente-García, A. G., Marín, J. L. (2003). La lechuga en la Región de Murcia y otras Comunidades Autónomas. Serie Técnica y de Estudios nº 24. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Murcia.

Benelli, G., Pavela, R., Petrelli, R., Cappellacci, L., Canale, A., Senthil-Nathan, S., Maggi, F. (2018). Not just popular spices! Essential oils from *Cuminum cyminum* and *Pimpinella anisum* are toxic to insect pests and vectors without affecting non-target invertebrates. *Industrial crops and products*, 124, 236-243. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.048>

Bielza, P. (2008). Insecticide resistance management strategies against the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(11), 1131-1138. <https://doi.org/10.1002/ps.1620>

Birkett, M. A., Campbell, C. A., Chamberlain, K., Guerrieri, E., Hick, A. J., Martin, J. L., Matthes, M., Napier, J. A., Pettersson, J., Pickett, J. A., Poppy, G. M., Pow, E.M., Pye, B.J., Smart, L. E., Wadhams, G. H., Wadhams, L. J., Woodcock, C. M. (2000). New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. *PNAS*, 97:9329–9334. <https://doi.org/10.1073/pnas.160241697>

Birkett, M. A., Bruce, T. J., Pickett, J. A. (2010). Repellent activity of *Nepeta grandiflora* and *Nepeta clarkei* (Lamiaceae) against the cereal aphid, *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae). *Phytochemistry Letters*, 3(3), 139-142. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2010.05.001>

Blackman, R. L., Eastop, V. F. (2000). *Aphids on the World's Crops: An Identification and Information Guide*. Second Edition. John Wiley Sons, England. 466 pp

Blackman R. L., Eastop F. E. (2017). Taxonomic issues, in *Aphids as Crop Pests*, ed. by Van Emden HF and Harrington R. CABI, Wallingford, pp. 1–36. <https://doi.org/10.1079/9780851998190.0000>

Bouagga, S., Urbaneja, A., Pérez-Hedo, M. (2018). Combined use of predatory mirids with *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae) to enhance pest management in sweet pepper. *Journal of Economic Entomology*, 111(3), 1112-1120. <https://doi.org/10.1093/jee/toy072>

Bruce, T. J., Martin, J. L., Pickett, J. A., Pye, B. J., Smart, L. E., Wadhams, L. J. (2003). cis-Jasmone treatment induces resistance in wheat plants against the grain aphid, *Sitobion avenae* (Fabricius) (Homoptera: Aphididae). *Pest Management Science*, 59:1031–1036. <https://doi.org/10.1002/ps.730>

Bruce, T. J., Birkett, M.A., Blande, J., Hooper, A. M., Martin, J. L., Khambay, B., Prosser, I., Smart, L. E., Wadhams, L.J. (2005). Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. *Pest Management Science*, 61:1115–1121. <https://doi.org/10.1002/ps.1102>

C.A.R.M. 2021. Estadística Agraria de Murcia 2019/20. Consejería de Agua, Agricultura, Ganadería, Pesca y Medio Ambiente

Calvo, F. J., Bolckmans, K., Belda, J. E. (2009). Development of a biological control-based Integrated Pest Management method for *Bemisia tabaci* for protected sweet pepper crops. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 133(1), 9-18. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00896.x>

Calvo, F. J., Knapp, M., van Houten, Y. M., Hoogerbrugge, H., Belda, J. E. (2015). *Amblyseius swirskii*: what made this predatory mite such a successful biocontrol agent?. *Experimental and Applied Acarology*, 65(4), 419-433. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9873-0>

Cid, M., Ávila, A., García, A., Abad, J., Fereres, A. (2012). New sources of resistance to lettuce aphids in *Lactuca* spp. *Arthropod-Plant Interactions*, 6(4), 655-669. <https://doi.org/10.1007/s11829-012-9213-4>

Condés Rodríguez, L.F. (2017) Pimiento. Características botánicas (morfología, anatomía, fisiología y taxonomía). En: Maroto Borrego, J. V., Baixauli Soria, C. Cultivos hortícolas al aire libre (pp. 471-507). Cajamar Caja Rural.

Coscollá, R. (2004). Introducción a la Protección Integrada. Phytoma- España, Valencia, España, 50 pp.

Dancewicz, K., Gliszczynska, A., Halarewicz, A., Wawrzeczyk, C., Gabrys, B. (2010). Effect of farnesol and its synthetic derivatives on the settling behaviour of the peach potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.). *Pesticides*, 1–4:51–57

De Araújo Delmondes, G., Bezerra, D. S., de Queiroz Dias, D., de Souza Borges, A., Araújo, I. M., da Cunha, G. L., et al. (2019). Toxicological and pharmacologic effects of farnesol (C₁₅H₂₆O): a descriptive systematic review. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 169-200. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.037>

De Loof, A., Schoofs, L. (2019). Mode of action of farnesol, the “Noble Unknown” in particular in Ca²⁺ homeostasis, and its juvenile hormone-esters in evolutionary retrospect. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 141. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00141>

De Vries, I. M. (1997). Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44(2), 165-174. <https://doi.org/10.1023/A:1008611200727>

Dedryver, C. A., Le Ralec, A., Fabre, F. (2010). The conflicting relationships between aphids and men: a review of aphid damage and control strategies. *Comptes Rendus Biologies*, 333(6-7), 539-553. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.03.009>

Deletre, E., Chandre, F., Barkman, B., Menut, C., Martin, T. (2016). Naturally occurring bioactive compounds from four repellent essential oils against *Bemisia tabaci* whiteflies. *Pest Management Science*, 72(1), 179-189. <https://doi.org/10.1002/ps.3987>

Dewhurst, S. Y., Birkett, M. A., Loza-Reyes, E., Martin, J. L., Pye, B. J., Smart, L. E., Hardie, J., Pickett, J. A. (2012). Activation of defence in sweet pepper, *Capsicum annuum*, by cis-jasmone, and its impact on aphid and aphid parasitoid behaviour. *Pest Management Science*, 68:1419–1429. <https://doi.org/10.1002/ps.3326>

Diaz, B. M., Fereres, A. (2005). Life table and population parameters of *Nasonovia ribisnigri* (Homoptera: Aphididae) at different constant temperatures. *Environmental Entomology*, 34(3), 527-534. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-34.3.527>

Digilio, M. C., Mancini, E., Voto, E., De Feo, V. (2008). Insecticide activity of Mediterranean essential oils. *Journal of Plant Interactions*, 3(1), 17-23. <https://doi.org/10.1080/17429140701843741>

dos Santos, A. T. B., Junior, J. S. Z., Parreira, L. A., de Abreu, K. M. P., de Oliveira Bernardes, C., de Carvalho, J. R., Menini, L. (2021). Chemical identification and insecticidal effect of *Tephrosia vogelii* essential oil against *Cerosipha forbesi* in strawberry crop. *Crop Protection*, 139, 105405. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105405>

EPPO. 2022. *Capsicum annuum* (disponible online). <https://gd.eppo.int/taxon/CPSAN>

Erler, F., Tunç, İ. (2005). Monoterpenoids as fumigants against greenhouse pests: toxic, development and reproduction-inhibiting effects. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 181-192.

Fagan, L. L., McLachlan, A., Till, C. M., Walker, M. K. (2010). Synergy between chemical and biological control in the IPM of currant-lettuce aphid (*Nasonovia ribisnigri*) in Canterbury, New Zealand. *Bulletin of Entomological Research*, 100(2), 217-223. <https://doi.org/10.1017/S0007485309990174>

FAO. (1998). World Reference Base for Soil Resources. FAO-ISRIC-I. Soil survey Staff. Roma.

FAOSTAT. (2022). Estadísticas de la FAO. Consultada en abril de 2022. <https://www.fao.org/faostat/es/#data>

Foster S. P., Devine G., Devonshire A. (2017). Insecticide resistance. En: *Aphids as Crop Pests*, ed. by Van Emden, H.F. and Harrington, R. CABI, Wallingford, pp. 426–447.

Francis, F., Lognay, G., Haubruge, E. (2004). Olfactory responses to aphid and host plant volatile releases: (*E*)- β -farnesene an effective kairomone for the predator *Adalia bipunctata*. *Journal of Chemical Ecology*. 30:741–755. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000028429.13413.a2>

García García, J. (2020) .Estructura de costes de las orientaciones productivas agrícolas de la Región de Murcia: horticultura al aire libre y bajo invernadero. Ed. Consejería de Agricultura y Agua, Región de Murcia. Murcia, 138 pp.

García, M. G., Ruiz-García, L., Martínez, A. S., Janssen, D., de la Peña, A. M. (2014). Uso de cultivares de pimiento resistentes a virus en la horticultura protegida de Andalucía oriental. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (257), 32-35.

Gillespie, M., Wratten, S., Sedcole, R., Colfer, R. (2011). Manipulating floral resources dispersion for hoverflies (Diptera: Syrphidae) in a California lettuce agroecosystem. *Biological Control*, 59(2), 215-220. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.07.010>

Gorski, R., Tomczak, M. (2010). Usefulness of natural essential oils in the control of foxglove aphid (*Aulacorthum solani* Kalt.) occurring on eggplant (*Solanum melongena* L.). *Ecological Chemistry and Engineering*, 17(3), 345-349.

Górski, R., Sobieralski, K., Siwulski, M. (2016). The effect of hemp essential oil on mortality *Aulacorthum solani* Kalt. and *Tetranychus urticae* Koch. *Ecological Chemistry and Engineering*, 23(3), 505. <https://doi.org/10.1515/eces-2016-0037>

Guilbaud, C. S. E., Khudr, M. S. (2020). Disturbance and competition drive diversity effects in cabbage–aphid–onion systems with intra-specific genetic variation. *Bulletin of Entomological Research*, 110(1), 123-135. <https://doi.org/10.1017/S0007485319000373>

Guirao Moya, P. (2002). Caracterización y variabilidad de poblaciones españolas de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) (Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia).

Gut, J., Van Oosten, A. M. (1985). U.S. Patent No. 4,505,934. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Gutiérrez, C., Fereres, A., Reina, M., Cabrera, R., González-Coloma, A. (1997). Behavioral and Sublethal Effects of Structurally Related Lower Terpenes on *Myzus persicae*. *Journal of Chemical Ecology*, 23(6), 1641-1650. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006428.00568.c5>

Halbert, S. E., Corsini, D., Wiebe, M., Vaughn, S. F. (2009). Plant-derived compounds and extracts with potential as aphid repellents. *Annals of Applied Biology*, 154(2), 303-307. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00300.x>

Hanssen, I. M., Lapidot, M., Thomma, B. (2010). Emerging viral diseases of tomato crops. *Mol Plant-Microbe Interact* 23:539–548. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-5-0539>

Hashem, A. S., Awadalla, S. S., Zayed, G. M., Maggi, F., Benelli, G. (2018). *Pimpinella anisum* essential oil nanoemulsions against *Tribolium castaneum*—insecticidal activity and mode of action. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(19), 18802-18812. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2068-1>

Hernández-García, M., Acosta, M. C., Carnero, A. (1999). Eficacia de la utilización de microtúnel de malla frente a la aplicación de los insecticidas abamectina y ciromazina en el control del minador *Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880) (Diptera: Agromyzidae) en cultivo de lechuga. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid (España).

Heuskin, S., Lorge, S., Godin, B., Leroy, P., Frère, I., Verheggen, F. J., Haubruge, E., Wathelet, J. P., Mestdagh, M., Hance, T., Lognay, G. (2012). Optimisation of a semiochemical slow-release alginate formulation attractive towards *Aphidius ervi* Haliday parasitoids. *Pest Management Science* 68:127–136. <https://doi.org/10.1002/ps.2234>

Heydari, M., Amirjani, A., Bagheri, M., Sharifian, I., Sabahi, Q. (2020). Eco-friendly pesticide based on peppermint oil nanoemulsion: Preparation, physicochemical properties, and its aphicidal activity against cotton aphid. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(6), 6667-6679. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07332-y>

Holman, J. (2009). Host Plant Catalog of Aphids. Palaearctic Region, Springer Science and Business Media B.V, Dordrecht, The Netherlands, 1140 pp. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8286-3>

Hori, M. (1996). Settling inhibition and insecticidal activity of garlic and onion oils against *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). *Applied Entomology and Zoology*, 31(4), 605-612. <https://doi.org/10.1303/aez.31.605>

Hori, M. (1998). Repellency of rosemary oil against *Myzus persicae* in a laboratory and in a screenhouse. *Journal of Chemical Ecology*, 24(9), 1425-1432. <https://doi.org/10.1023/A:1020947414051>

Hori, M. (1999a). Antifeeding, settling inhibitory and toxic activities of labiate essential oils against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). *Applied Entomology and Zoology*, 34(1), 113-118. <https://doi.org/10.1303/aez.34.113>

Hori, M. (1999b). The effects of rosemary and ginger oils on the alighting behavior of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) and on the incidence of yellow spotted streak. *Applied Entomology and Zoology*, 34(3), 351-358. <https://doi.org/10.1303/aez.34.351>

Hullé, M., Chaubet, B., Turpeau, E., Simon, J.C. (2020). Encyclop' Aphid: a website on aphids and their natural enemies. *Entomologia Generalis*: <https://doi.org/10.1127/entomologia/2019/0867>

Ikbal, C., Pavela, R. (2019). Essential oils as active ingredients of botanical insecticides against aphids. *Journal of Pest Science*, 92(3), 971-986. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01089-6>

IRAC. (2022a). Tobacco whitefly. *Bemisia tabaci*. Insecticide Resistance Action Committee. <https://irac-online.org/pests/bemisia-tabaci/>

IRAC. (2022b). Two spotted spider mite. *Tetranychus urticae*. Insecticide Resistance Action Committee. <https://irac-online.org/pests/tetranychus-urticae/>

Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51, 45-66. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>

Isman, M. B. (2008). Botanical insecticides: for richer, for poorer. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(1), 8-11. <https://doi.org/10.1002/ps.1470>

Isman, M. B. (2017). Bridging the gap: moving botanical insecticides from the laboratory to the farm. *Industrial Crops and Products*, 110, 10-14. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.012>

Isman, M. B. (2019) Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. *Phytochemistry Reviews*, 19:235–241. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09653-9>

Isman, M.B. (2020). Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. *Phytochemistry Reviews*, 19, 235–241. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09653-9>

Jalaei, Z., Fattahi, M., Aramideh, S. (2015). Allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. from Iran: A new chemotype with highest limonene-10-al and limonene. *Industrial Crops and Products*, 73, 109-117. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.020>

Jiang, H., Wang, J., Song, L., Cao, X., Yao, X., Tang, F., Yue, Y. (2016). GC×GC-TOFMS analysis of essential oils composition from leaves, twigs and seeds of *Cinnamomum camphora* L. Presl and their insecticidal and repellent activities. *Molecules*, 21(4), 423. <https://doi.org/10.3390/molecules21040423>

Junior, R. S. (1998). Enfermedades fúngicas del pimiento en España. *Vida Rural*, 68, 56-58.

Khaled-Gasmi, W., Hamouda, A. B., Chaieb, I., Souissi, R., Ascrizzi, R., Flamini, G., Boukhris-Bouhachem, S. (2021). Natural repellents based on three botanical species essential oils as an eco-friendly approach against aphids. *South African Journal of Botany*, 141, 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.05.001>

Kimbaris, A. C., Papachristos, D. P., Michaelakis, A., Martinou, A. F., Polissiou, M. G. (2010). Toxicity of plant essential oil vapours to aphid pests and their coccinellid predators. *Biocontrol Science and Technology*, 20(4), 411-422. <https://doi.org/10.1080/09583150903569407>

La Spina, M. (2013). Ecología de los áfidos de pimiento y sus parasitoides en el sureste de la península Ibérica (Tesis Doctoral, Universidad Miguel Hernández).

Lacasa, A., Llorens, J. M. (1996). *Trips y su control biológico (I)*. Ed. Pisa Ediciones. Alicante, 218pp.

Lacasa, A., Villalobos, M. J.P., Sánchez, J.A., Guerrero, M. M. (2003). Los pulgones en los cultivos de lechuga y métodos de control. *Agrícola vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura*, 22(263), 579-589.

Lacasa Plasencia, A., Camacho Ferre, F., Tello Marquina, J., Miranda Enamorado, L., Guirao Moya, P., Bielza Lino, P. (2018). *Agricultura intensiva, nematodos y 1,3 dicloropropeno*, 1 ed. Murcia, España, ISBN: 978-84-17619-82-4

Lacasa, A. (2021). Factores que motivaron el desarrollo del control biológico en el cultivo de pimiento en invernadero de la Región de Murcia. *Phytoma*, 327:

Lapczynski, A., Bhatia, S. P., Letizia, C. S., Api, A. M. (2008). Fragrance material review on farnesol. *Food and chemical toxicology*, 46(11), S149-S156. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.046>

Leal, W. S., Uchida, K. (1998). Application of GC-EAD to the determination of mosquito repellents derived from a plant, *Cymbopogon citratus*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 1(2), 217-221. [https://doi.org/10.1016/S1226-8615\(08\)60022-9](https://doi.org/10.1016/S1226-8615(08)60022-9)

López, M. D., Jordán, M. J., Pascual-Villalobos, M. J. (2008). Toxic compounds in essential oils of coriander, caraway and basil active against stored rice pests. *Journal of Stored Products Research*, 44(3), 273-278. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.02.005>

Lü, J., Liu, S. (2016). The behavioral response of *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae) to citronellal, citral, and rutin. *Springer Plus*, 5(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2553-2>

Lubbe, A., Verpoorte, R. (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 785-801. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.01.019>

M.A.P.A. (2021). Anuario de Estadística Agraria. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. <https://www.mapa.gob.es/estadistica/pags/anuario/2020/ANUARIO/AE20.pdf>

M.A.P.A. (2022). Registro oficial de productos fitosanitarios. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro-productos/>

Ma, F. M., Zheng, L. X., Gao, Z. Z., Wu, W. J. (2017). Farnesol, a synomone component between lantana (Lamiales: Verbenaceae) and the omnivorous predator, *Campylomma chinensis* Schuh (Hemiptera: Miridae). *Arthropod-Plant Interactions* 11:703–708. <https://doi.org/10.1007/s11829-017-9523-7>

Marhuenda Berenguer, J.A., García Vergara, J. (2017). Lechuga. En: Maroto Borrego, J. V., Baixauli Soria, C. *Cultivos hortícolas al aire libre* (pp. 239-273). Cajamar Caja Rural.

Mead-Briggs, M. A., Brown, K., Candolfi, M. P., Coulson, M. J. M., Miles, M., Moll, M., Nienstedt, K., Schuld, M., Ufer, A., McIndoe, E. (2000). A laboratory test for evaluating the effects of plant protection products on the parasitic wasp, *Aphidius rhopalosiphi* (DeStephani-Perez) (Hymenoptera: Braconidae). En Candolfi, M. P., Blümel, S., Foster, R., Bakker, F. M., Grimm, C., Hassan, S. A., Heimbach, U., Mead-Briggs, M. A., Reber, B., Schmuck, R., Vogt, H. (eds) *Guidelines to evaluate side-effects of plant protection products to non-target arthropods*, IOBC/WPRS, Gent, pp.13-25

Melgarejo, P., García-Jiménez, J., Jordá, M. C., López, M. M., Andrés, M. F., Duran-Vila, N. (2010). Patógenos de plantas descritos en España, 2º ed. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

Micha, S. G., Wyss, U. (1996). Aphid alarm pheromone (*E*)- β -farnesene: A host finding kairomone for the aphid primary parasitoid *Aphidius uzbekistanicus* (Hymenoptera: Aphidiinae). *Chemoecology*, 7(3), 132-139. <https://doi.org/10.1007/BF01245965>

Monserrat Delgado, A. (2012). Recomendaciones fitosanitarias para las plantaciones de pimiento de invernadero. Consejería de Agricultura y Agua, Región de Murcia. Murcia, 60 pp.

Morales, I. (2008). Bases para el control integrado de pulgones en el cultivo de lechuga. (Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid).

Nowacka, M., Kowalewska, A., Kręgiel, D. (2020). Farnesol-Containing Macromolecular Systems for Antibiofilm Strategies. *Surfaces*, 3(2), 197-210. <https://doi.org/10.3390/surfaces3020015>

Ortiz, V. F. (2019). Physiological and biochemical insights into pepper (*Capsicum annuum* L.) responses to green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) (Tesis Doctoral, Universidad de Alicante).

Palumbo, J. C., Horowitz, A. R., Prabhaker, N. (2001). Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection*, 20(9), 739-765. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00117-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00117-X)

Park, I.K., Choi, K.S., Kim, D.H., Choi, I. H., Kim, L. S., Bak, W. C., Choi, J.W., Shin, S. C. (2006). Fumigant activity of plant essential oils and components from horseradish (*A Armoracia rusticana*), anise (*Pimpinella anisum*) and garlic (*Allium sativum*) oils against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 62(8), 723-728. <https://doi.org/10.1002/ps.1228>

Pascual-Villalobos, M.J. (1996). Plaguicidas de origen vegetal: Estado actual de la investigación. Monografías INIA.

Pascual-Villalobos, M. J., Sánchez, J. A., Kabaluk, T., Lacasa, A., González, A., Varo, P. (2004). Distribución espacial del pulgón *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Hemiptera: Aphididae) en un cultivo intercalado de lechuga ecológica. Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas, 30: 615, 621.

Pascual-Villalobos, M. J., Lacasa, A., González, A., Varo, P., García, M. J. (2006). Effect of flowering plant strips on aphid and syrphid populations in lettuce. European Journal of agronomy, 24(2), 182-185. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2005.07.003>

Pascual-Villalobos, M. J., Cantó-Tejero, M., Vallejo, R., Guirao, P., Rodríguez-Rojo, S., Cocero, M. J. (2017). Use of nanoemulsions of plant essential oils as aphid repellents. Industrial Crops and Products, 110, 45-57. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.019>

Pascual-Villalobos, M. J., Guirao, P., Díaz-Baños, F. G., Cantó-Tejero, M., Villora, G. (2019). Oil in water nanoemulsion formulations of botanical active substances. In Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives (pp. 223-247). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815829-6.00009-7>

Pascual-Villalobos, M. J., Cantó-Tejero, M., Guirao, P., López, M. D. (2020). Fumigant toxicity in *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae): controlled release of (*E*)-anethole from microspheres. Plants, 9(1), 124. <https://doi.org/10.3390/plants9010124>

Pascual-Villalobos, M. J., Castañé, C., Martín, F., López, M. D., Guirao, P., Riudavets, J. (2021). (*E*)-Anethole microspheres as an alternative insecticide in funnel traps. Journal of Stored Products Research, 93, 101862. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2021.101862>

Pavela R (2018) Essential oils from *Foeniculum vulgare* Miller as a safe environmental insecticide against the aphid *Myzus persicae* Sulzer. Environmental Science and Pollution Research, 25:10904–10910. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1398-3>

Pavoni, L., Perinelli, D. R., Bonacucina, G., Cespi, M., Palmieri, G. F. (2020). An overview of micro-and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. Nanomaterials, 10(1), 135. <https://doi.org/10.3390/nano10010135>

Payton Miller, T. L., Rebek, E. J. (2018). Banker plants for aphid biological control in greenhouses. *Journal of Integrated Pest Management*, 9(1), 9. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmy002>

Philogene, B. J., Regnault-Roger, C., Terrón, P. U., Vincent, C. (2004). Biopesticidas de origen vegetal (No. 04; SB951. 145. B68, B5.).

Plata-Rueda, A., Martínez, L. C., da Silva Rolim, G., Coelho, R. P., Santos, M. H., de Souza Tavares, et al., (2020). Insecticidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its terpenoids (citral and geranyl acetate) against *Ulomoides dermestoides*. *Crop Protection*, 137, 105299. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105299>

Regnault-Roger, C., Philogene, B. J., Terrón, P. U., Vincent, C. (2004). Biopesticidas de origen vegetal (No. 04; SB951. 145. B68, B5.).

Regnault-Roger, C., Vincent, C., Arnason, J. T. (2012). Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annual Review of Entomology*, 57, 405-424. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120710-100554>

Ribeiro, L. P., Akhtar, Y., Vendramim, J. D.; Isman, M. B. (2014). Comparative bioactivity of selected seed extracts from Brazilian *Annona* species and an acetogenin-based commercial bioinsecticide against *Trichoplusia ni* and *Myzus persicae*. *Crop Protection*, 62, 100-106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.013>

Rincón, L. 2005. La fertirrigación de la lechuga iceberg. Editor INIA-IMIDA, 183 pp.

Rodilla, J. M., Tinoco, M. T., Morais, J. C., Giménez, C., Cabrera, R., Martín-Benito, D., Castillo, L., .González-Coloma, A. (2008). *Laurus novocanariensis* essential oil: Seasonal variation and valorization. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(3), 167-176. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.09.001>

Romero Díaz, A., Belmonte Serrato, F. (2011). El Campo de Cartagena una visión global. Recorridos por el Campo de Cartagena. Control de la degradación y uso sostenible del suelo. Murcia, Instituto Mediterráneo del Agua, 17-48.

Sampson, B. J., Tabanca, N., Kirimer, N. E., Demirci, B., Baser, K. H. C., Khan, I. A., Spiers, J.M., Wedge, D. E. (2005). Insecticidal activity of 23 essential oils and their major compounds against adult *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Aphididae: Homoptera). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 61(11), 1122-1128. <https://doi.org/10.1002/ps.1100>

Sánchez, J. A., J. Contreras, A. Lacasa, Lorca, M. (1995). Datos preliminares sobre la utilización de *Orius laevigatus* (Fieber) en el control de *Frankiniella occidentalis* (Pergande) en pimiento en invernadero. *Phytoma*. 68: 32–38.

Sánchez, J. A., García, F., Lacasa, A., Gutiérrez, L., Oncina, M., Contreras, J., Gómez, Y. J. (1997). Response of the anthocorids *Orius laevigatus* and *Orius albidipennis* and the phytoseiid *Amblyseius cucumeris* for the control of *Frankiniella occidentalis* in commercial crops of sweet pepper in plastic houses in Murcia (Spain). *IOBC WPRS Bulletin*, 20, 177-185.

Sánchez, J. A., Lacasa, A. (2002). Modelling population dynamics of *Orius laevigatus* and *O. albidipennis* (Hemiptera: Anthocoridae) to optimize their use as biological control agents of *Frankiniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Bulletin of Entomological Research*, 92(1), 77-88. <https://doi.org/10.1079/BER2001136>

Sánchez, J. A., La-Spina, M., Michelena, J. M., Lacasa, A., Hermoso de Mendoza, A. (2011). Ecology of the aphid pests of protected pepper crops and their parasitoids. *Biocontrol Science and Technology*, 21(2), 171-188. <https://doi.org/10.1080/09583157.2010.530641>

Simon, J. C., Peccoud, J. (2018). Rapid evolution of aphid pests in agricultural environments. *Current opinion in insect science*, 26, 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.12.00>

Smith, G. H., Roberts, J. M., Pope, T. W. (2018). Terpene based biopesticides as potential alternatives to synthetic insecticides for control of aphid pests on protected ornamentals. *Crop Protection*, 110, 125-130. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.04.011>

Spinozzi, E., Maggi, F., Bonacucina, G., Pavela, R., Boukouvala, M. C., Kavallieratos, N. G., Canale, A., Romano, D., Desneux, N., Wilke, A.B.B., Berev, J.C., Benelli, G. (2021). Apiaceae essential oils and their constituents as insecticides against mosquitoes—A review. *Industrial Crops and Products*, 171, 113892. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113892>

Stansly, P. A., Calvo, F. J., Urbaneja, A. (2005). Augmentative biological control of *Bemisia tabaci* biotype “Q” in Spanish greenhouse pepper production using *Eretmocerus spp.* *Crop Protection*, 24(9), 829-835. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.010>

Stark, JD, Banks, JE. (2003). Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annual Review of Entomology*, 48(1), 505-519. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112621>

Stevenson, P. C., Isman, M. B., Belmain, S. R. (2017). Pesticidal plants in Africa: a global vision of new biological control products from local uses. *Industrial Crops and Products*, 110, 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.034>

Suryawanshi, Y. C., Mokhat, D. N. (2019). Chemical composition of essential oil of *Madhuca longifolia* var. *latifolia* (Roxb.) A. Chev. flowers. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22(4), 1034-1039. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1667879>

Tesh, R.B., Guzman, H., Wilson, M. L. (1992). Trans-beta-farnesene as a feeding stimulant for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 29:226–231. <https://doi.org/10.1093/jmedent/29.2.226>

Tunç, I., Şahinkaya, Ş. (1998). Sensitivity of two greenhouse pests to vapours of essential oils. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 86:183–187. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00279.x>

Van Helden, M., Thijssen, M. H., Tjallingii, W. F. (1992). The behaviour of *Nasonovia ribisnigri* on resistant and susceptible lettuce lines. In *Proceedings of the 8th International Symposium on Insect-Plant relationships* (pp. 286-288). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1654-1_89

Van Oosten, A. M., Gut, J., Harrewijn, P., Piron, P. G. M. (1990). Role of farnesene isomers and other terpenoids in the development of different morphs and forms of the aphids *Aphis fabae* and *Myzus persicae*. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 25 (1-4): 331-342.

Weintraub, P. G. (2007). Integrated control of pests in tropical and subtropical sweet pepper production. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 63(8), 753-760. <https://doi.org/10.1002/ps.1366>

Yan, H. Y., Guo, H. G., Sun, Y. C., Ge, F. (2020). Plant phenolics mediated bottom-up effects of elevated CO₂ on *Acyrtosiphon pisum* and its parasitoid *Aphidius avenae*. *Insect science*, 27(1), 170-184. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12627>

Zhang, H., Huang, X. Z., Jing, W. X., Liu, D. F., Dhiloo, K. H., Hao, Z.M., Zhang, Y. J. (2020). Two farnesyl pyrophosphate synthases, GhFPS1–2, in *Gossypium hirsutum* are involved in the biosynthesis of farnesol to attract parasitoid wasps. *Journal of Integrative Agriculture*, 19:2274–2285. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63203-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63203-8)

