



Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias,  
Agroambientales y Alimentarias

**Propiedades repelentes, antialimentarias e  
insecticidas de nanoemulsiones de bioactivos  
volátiles sobre pulgones (Hemiptera: Aphididae)  
en cultivos hortícolas**

---

**Félix Martín Pérez**

Directora:

**Dra. Dña. María Jesús Pascual Villalobos**

Codirector:

**Dr. D. Pedro Luis Guirao Moya**

---

Universidad Miguel Hernández de Elche

La presente Tesis Doctoral, titulada “Propiedades repelentes, antialimentarias e insecticidas de nanoemulsiones de bioactivos volátiles sobre pulgones (Hemiptera: Aphididae) en cultivos hortícolas”, se presenta bajo la modalidad de **tesis por compendio** de las siguientes publicaciones:

- Pascual-Villalobos, M.J., Díaz, I., Martín, F., Cantó-Tejero, M., Villora, G., Guirao, P. (2022). Plant bioactive volatile products and their efficiency in aphid control. *Industrial Crops & Products*, 183, 114975. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114975>
- Martín, F., Garzo, E., Guirao, P., Pascual-Villalobos, M.J., Fereres, A., Moreno, A. (2024). Persistence of nanoemulsions of bioactive volatiles and their impact on aphid feeding behaviour. *Journal of Pest Science*. <https://doi.org/10.1007/s10340-024-01746-5>
- Martín, F., Guirao, P., Pascual-Villalobos, M.J. Repellent effects of coconut fatty acid methyl esters and their blends with bioactive volatiles on winged *Myzus persicae* (Sulzer) Aphids (Hemiptera: Aphididae). *Insects* 2024, 15, 731. <https://doi.org/10.3390/insects15090731>



La Dra. Dña. María Jesús Pascual Villalobos, directora, y el Dr. D. Pedro Luis Guirao Moya, codirector de la tesis doctoral

**INFORMAN:**

Que D. Félix Martín Pérez ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado **“Propiedades repelentes, antialimentarias e insecticidas de nanoemulsiones de bioactivos volátiles sobre pulgones (Hemiptera: Aphididae) en cultivos hortícolas”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en Orihuela a ..... de ..... de 2025.

Director/a de la tesis

Dra. Dña. María Jesús Pascual Villalobos

Codirector/a de la tesis

Dr. D. Pedro Luis Guirao Moya



La Dra. Dña. Juana Fernández López, Coordinadora del Programa de Doctorado en **Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias**

**INFORMA:**

Que D. Félix Martín Pérez ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado **“Propiedades repelentes, antialimentarias e insecticidas de nanoemulsiones de bioactivos volátiles sobre pulgones (Hemiptera: Aphididae) en cultivos hortícolas”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en Orihuela a ..... de ..... de 2025

Profa. Dra. Dña. Juana Fernández López

Coordinador/a del Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias,  
Agroambientales y Alimentarias

La Resolución de 3 de octubre de 2018, de la Presidencia de la Agencia Estatal de Investigación aprobó la convocatoria, correspondiente al año 2018, de las ayudas para contratos predoctorales para la formación de doctores contemplada en el Subprograma Estatal de Formación, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2017-2020 (extracto publicado en el BOE el 9 de octubre de 2018, identificador Base de Datos Nacional de Subvenciones: 418444).

Cumplidos los requisitos establecidos en la citada Orden de bases y de acuerdo con lo dispuesto en el artículo 15 de la resolución de convocatoria, la Agencia Estatal de Investigación, resolvió conceder la ayuda (FPI-PRE2018-084296) a Félix Martín Pérez, para la contratación laboral durante cuatro años, bajo la modalidad de contrato predoctoral, de personal investigador en formación a tiempo completo en el proyecto de investigación (RTA2017-00022-00-00) titulado “Optimización de nanoemulsiones de insecticidas de origen botánico”.



## **AGRADECIMIENTOS**

Sin duda, este ha sido el apartado de la tesis más difícil de escribir. Echando la vista atrás me vienen innumerables recuerdos que, aunque no proceda detallarlos aquí, los llevaré conmigo para siempre puesto que han formado parte de una etapa muy importante de mi vida. Al igual que toda la gente con la que me he cruzado en estos años, que ha sido tanta que no tengo espacio suficiente en este papel para dedicarle unas líneas, pero basta con una palabra de 7 letras sincera y que sale directamente desde el corazón, GRACIAS. A todas esas personas con las que haya coincidido en algún momento y que por breve e insignificante que fuera la conversación, de todas y cada una de ellas estoy seguro de que algo he aprendido y algo me llevo.

Hay otras personas que merecen una mención especial ya que sin ellas hoy no estaría escribiendo esto. Pedro, mi codirector de tesis, anteriormente mi profesor de Protección de Cultivos y mi director de los Trabajos Fin de Grado y Máster. Tu faceta docente y personal aumentaron mi interés en la protección de cultivos y la sanidad vegetal. No hay gambas suficientes en el océano para agradecerte todo lo que has hecho por mí en estos años. María Jesús, mi directora de tesis, gracias por darme la oportunidad de iniciarme en el duro pero gratificante camino de la investigación, sin tus sabios consejos y tu supervisión no hubiera sido posible. He aprendido mucho de los dos y os doy las gracias por vuestra atención, dedicación y por la confianza que siempre habéis depositado en mí.

También tengo palabras de agradecimiento para Alberto Fereres, Arantxa Moreno y Elisa Garzo, fue todo un placer trabajar con vosotros y aprender la técnica EPG ha sido una gran experiencia. De la estancia recuerdo también las conversaciones con Inmaculada Ferriol durante las comidas en la cafetería y a mis compañeras de laboratorio a las que guardo un cariño especial. Gracias a todo el grupo IVPP del ICA-CSIC por vuestra acogida y el buen recibimiento que tuvisteis conmigo y por facilitar mi integración en el grupo. Espero que sigan surgiendo más colaboraciones de trabajo y que sigamos en contacto y viéndonos en los congresos.

Gracias también a todas las personas que forman la gran familia IMIDA, en especial a mis compañeros del departamento de protección de cultivos y más concretamente a mis compañeros del equipo de fitoquímicos naturales, Miguel por su ayuda siempre que se le ha necesitado y por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias de la vida y sus dichos murcianos. María, por acompañarme en este último tramo de la tesis haciendo más ameno el día a día y contagiarme tu energía y entusiasmo por las cosas. También quisiera acordarme de otras personas que han pasado por el equipo como Isabel con su delicadeza y precisión para hacer las cosas y su sentido del humor y Manuel por ser mi lazarillo cuando daba mis primeros pasos por el IMIDA y ser el espejo en el que mirarme ya que admiro tu forma de trabajar, de verdad que gracias por todo. Te mereces todo lo bueno en esta vida y me alegro mucho de la familia que has formado con Carmen. Echo de menos nuestros viernes entomológicos, deberíamos retomarlos y añadir la variante fitopatológica. Otras personas que merecen unas líneas son Lola y Mauricio, puro amor y derroche de alegría y positividad, presenciasteis el punto y final de esta Tesis y me transmitisteis tanto en tan poco tiempo que os guardo un cariño especial, cuando supere mi miedo a volar iré a Chile a visitarlos.

Por último y no menos importante, mi familia y amigos. Abuelos, tíos, primos, cuñados, suegros y como no, mis padres y hermana, gracias a vosotros soy la persona que soy a día de hoy, con los principios y valores que me habéis enseñado. Gracias a vuestro esfuerzo he podido estudiar lo que quería, eso me hace sentir orgulloso y afortunado de tener la familia que tengo.

También me siento un privilegiado de tener en mi vida a la mujer que tengo, Paula, mi amiga y confidente, todo esto también es gracias a ti porque tú lo haces todo más fácil, saber que siempre estás ahí y poder contar contigo para todo y que siempre encuentres la mejor solución a las cosas hace que seas la mayor suerte de mi vida. Gracias por mantenerme con los pies en la tierra, por hacerme mejor persona, por tener tanta paciencia conmigo y por quererme.

# INDICE

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introducción.....                                               | 10 |
| 1.1. Sustancias de origen botánico para el control de plagas. .... | 11 |
| 1.1.1. Antecedentes.....                                           | 11 |
| 1.1.2. Composición química. ....                                   | 13 |
| 1.1.3. Modo de acción. ....                                        | 16 |
| 1.1.4. Formulación de bioactivos volátiles como nanoemulsión.....  | 20 |
| 1.2. Pulgones (Hemiptera: Aphididae). ....                         | 24 |
| 1.2.1. Morfología. ....                                            | 24 |
| 1.2.2. Biología y desarrollo. ....                                 | 27 |
| 1.2.3. Selección y alimentación de plantas hospedantes. ....       | 29 |
| 1.2.4. Daños y síntomas.....                                       | 32 |
| 1.2.5. Control. ....                                               | 33 |
| 1.2.6. <i>Myzus persicae</i> (Sulzer).....                         | 35 |
| 1.2.7. <i>Aphis gossypii</i> Glover. ....                          | 36 |
| 1.3. Pimiento ( <i>Capsicum annuum</i> L.).....                    | 38 |
| 1.3.1. Origen y difusión. ....                                     | 38 |
| 1.3.2. Importancia económica y distribución geográfica.....        | 39 |
| 1.3.3. El cultivo del pimiento en la Región de Murcia. ....        | 39 |
| 1.4. Melón ( <i>Cucumis melo</i> L.).....                          | 41 |

|        |                                                                              |    |
|--------|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.4.1. | Origen y difusión.....                                                       | 41 |
| 1.4.2. | Importancia económica y distribución geográfica.....                         | 42 |
| 1.4.3. | El cultivo del melón en la Región de Murcia. ....                            | 42 |
| 1.5.   | Enfermedades y plagas en pimiento y melón y métodos de control. ....         | 43 |
| 1.5.1. | Enfermedades. ....                                                           | 43 |
| 1.5.2. | Plagas.....                                                                  | 51 |
| 2.     | Objetivos.....                                                               | 57 |
| 3.     | Materiales y métodos.....                                                    | 59 |
| 3.1.   | Preparación y caracterización de nanoemulsiones de bioactivos volátiles..... | 60 |
| 3.2.   | Análisis estadístico. ....                                                   | 62 |
| 3.3.   | Estudio de la actividad insecticida.....                                     | 62 |
| 3.3.1. | Condiciones de laboratorio.....                                              | 62 |
| 3.3.2. | Condiciones de campo.....                                                    | 63 |
| 3.4.   | Estudio de la persistencia del efecto insecticida.....                       | 64 |
| 3.5.   | Estudio de efectos antialimentarios. ....                                    | 66 |
| 3.6.   | Estudio de efectos sistémicos. ....                                          | 70 |
| 3.7.   | Estudio de efectos repelentes e inhibidores de la reproducción. ....         | 72 |
| 4.     | Publicaciones.....                                                           | 75 |
| 4.1.   | Publicación 1.....                                                           | 77 |
| 4.2.   | Publicación 2.....                                                           | 97 |

|                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3. Publicación 3.....                                                                                                                  | 130 |
| 5. Resultados generales.....                                                                                                             | 143 |
| 5.1. Efecto insecticida. ....                                                                                                            | 144 |
| 5.2. Efecto repelente. ....                                                                                                              | 155 |
| 5.3. Efecto antialimentario. ....                                                                                                        | 164 |
| 6. Discusión .....                                                                                                                       | 172 |
| 7. Conclusiones.....                                                                                                                     | 189 |
| 8. Referencias bibliográficas .....                                                                                                      | 193 |
| 9. Anejos .....                                                                                                                          | 213 |
| Anejo 1. Número medio de eventos de forma de onda para cada pulgón en su planta.<br>Variables EPG secuenciales y no secuenciales. ....   | 214 |
| Anejo 2. Duración total promedio de la forma de onda (tiempo en minutos) para cada<br>insecto. Variables EPG no secuenciales. ....       | 215 |
| Anejo 3. Duración media de la forma de onda (tiempo en minutos) para cada insecto.<br>Variables EPG no secuenciales. ....                | 216 |
| Anejo 4. Porcentaje medio del tiempo de prueba en cada evento de forma de onda para<br>cada insecto. Variables EPG no secuenciales. .... | 217 |
| Anejo 5. Duración media de cada evento (minutos). Variables EPG secuenciales. .                                                          | 218 |

## Resumen

Los pulgones (Hemiptera: Aphididae) son una de las plagas que mayores pérdidas económicas ocasionan en los cultivos a nivel mundial. En los últimos años, en las principales zonas productoras del sureste español, la incidencia de daños producidos por pulgones, concretamente las especies *Myzus persicae* (Sulzer) y *Aphis gossypii* Glover, se ha visto incrementada sobre todo en los cultivos ecológicos de pimiento y melón. El control químico de pulgones resulta complicado debido a la aparición de poblaciones resistentes a numerosas materias activas, lo que unido a las iniciativas promovidas por la Unión Europea como *El Pacto Verde Europeo* y la estrategia *De la Granja a la Mesa*, que buscan reducir el uso de plaguicidas, han propiciado un escenario muy complejo para el sector agrícola, dadas las dificultades que encuentran para llevar a cabo un buen manejo de las herramientas de gestión integrada de plagas para la protección de cultivos.

Ante la falta de alternativas a los productos fitosanitarios convencionales tan problemáticos, surge la necesidad de buscar en la naturaleza aquellas sustancias que sean capaces de controlar las plagas sin comprometer la integridad del medio ambiente, la salud humana y que además sean compatibles con la fauna auxiliar. Se sabe que los aceites esenciales de algunas plantas y los compuestos puros que se pueden extraer de ellas tienen propiedades repelentes, insecticidas, antialimentarias e inhibidoras de la reproducción, entre otras. Pero tienen la particularidad de que son inmiscibles en agua, muy volátiles y se degradan fácilmente.

Por ello, el objetivo de esta tesis doctoral es desarrollar emulsiones de aceite en agua, empleando surfactantes y/o estabilizantes y aplicando la energía necesaria para obtener una mezcla homogénea y estable en el tiempo, con tamaños de partícula del ingrediente activo a una escala nanométrica y evitar así su rápida degradación, volatilización y mejorar la persistencia de su efecto insecticida, con la finalidad de que estos formulados sean una herramienta más de control químico para la protección de cultivos.

Las nanoemulsiones se han elaborado empleando tanto un homogeneizador de alta velocidad como la técnica de ultrasonidos y se han caracterizado para conocer el tamaño de partícula del ingrediente activo y la estabilidad de la mezcla. En este aspecto, los

resultados indican que con la técnica de ultrasonidos se consiguen nanoemulsiones con tamaños de partícula pequeños y buena estabilidad. Además, se ha evaluado el efecto insecticida y su persistencia sobre *M. persicae* tanto en condiciones de laboratorio como en condiciones de campo en invernadero con plantas de pimiento y se ha obtenido que un 1% de la mezcla de citral, (E)-anetol, farnesol, (Z)-jasmona y aceite de limón, a partes iguales, en combinación con lecitina de soja y aceite de girasol en formulación 1:1:1, produce a los 4 días de la pulverización una mortalidad del 73% que se mantiene hasta los 14 días en condiciones de laboratorio y del 30% en condiciones de campo sin causar fitotoxicidad al cultivo del pimiento. Por otro lado, la (Z)-jasmona al 0,25% hace buena emulsión con Tween80® (1:2) y en condiciones de campo produce un 83% de mortalidad a los 4 días de la pulverización. En el caso del aceite de semillas de algodón al 3%, formulado al 1:1 con jabón potásico como surfactante en agua, da como resultado una mortalidad del 82% a los 4 días de la aplicación en campo. En cuanto al farnesol, la nanoemulsión al 0,2% con Tween80® (1:2), reduce la tasa de crecimiento poblacional de *M. persicae* con un efecto que persiste hasta 7 días después de la pulverización de las plantas de pimiento.

También se ha estudiado el comportamiento alimentario de los pulgones mediante la técnica de Gráficos de Penetración Eléctrica (EPG) y se ha comprobado por un lado que tanto el aceite esencial de anís como el (E)-anetol, formulados individualmente al 0,2% con Tween80® (1:2), causan deshidratación sobre las formas ápteras de *M. persicae* y, por otro lado, que el aceite destilado de limón al 0,2% con Tween80® (1:2), altera el comportamiento alimentario de los individuos ápteros de *M. persicae*, ya que estos estuvieron más tiempo sin mostrar actividad que los que fueron alimentados de plantas control y además, la duración total de la ingestión de floema fue significativamente menor para los individuos alimentados con plantas tratadas con aceite destilado de limón en relación al control.

En cuanto a la repelencia olfativa de las formas aladas de *M. persicae*, los resultados del bioensayo de elección con plantas de pimiento indican que los esteres metílicos de ácidos grasos de coco al 0,2%, en adelante coco, mostraron propiedades repelentes (I.R. = 28,93%), siendo el primer informe de la actividad repelente de este producto contra una plaga agrícola. Además, (E)-anetol produce repelencia olfativa sobre

las formas aladas de *M. persicae*, tanto de forma individual (I.R. = 30,85%) al 0,2% con Tween80® (1:2), como formando mezclas al 0,1% con coco + aceite destilado de limón + Tween80® (1:1:1:2) (I.R. = 30,63%) o con farnesol + aceite destilado de limón + Tween80® (1:1:1:2) (I.R. = 36,55%). Por su parte, el aceite esencial de anís al 0,25% con aceite de cártamo (1:1) también repele (I.R. = 25,87%) las formas aladas de *M. persicae*. Si bien es cierto, la nanoemulsión al 0,2% de farnesol con Tween80® (1:2) ha sido la que ha tenido un mayor efecto repelente vía olfativa (I.R. = 40,24%), además, en formulación (1:1:1:2) con aceite destilado de limón + coco + Tween80®, redujo significativamente la fertilidad (0,65 ninfas/hembra y día) de los individuos alados de *M. persicae* en comparación con el control (0,97 ninfas/hembra y día).

Por último, se ha demostrado que las nanoemulsiones de los bioactivos volátiles estudiadas no se transportan por los vasos conductores de savia de la planta, aunque no hay que descartar efectos translaminares en las hojas que tendrían que ser estudiados en futuros trabajos. Por otro lado, se puede concluir que la mortalidad que producen las nanoemulsiones de bioactivos volátiles sobre los pulgones se deben principalmente al contacto vía tópica y que los efectos sobre la alimentación ocurren cuando el estilete del pulgón entra en contacto con el producto en los tejidos foliares, mientras que la repelencia se da por la interacción olfativa con los receptores de las antenas de los pulgones.

En definitiva, los bioactivos volátiles estudiados en esta tesis doctoral son un ejemplo más de sustancias naturales con potencial a ser incluidas como materias activas de los productos fitosanitarios del futuro, no obstante, se necesita la colaboración de otros organismos e instituciones (públicas o privadas) para hacer llegar el producto final al usuario. Sin pasar por alto la evaluación de riesgos, ya que, aunque sean productos de origen natural, no están exentos de poder producir algún efecto desfavorable en los cultivos, seres humanos, animales y el medio ambiente, dada su naturaleza química.

## Abstract

Aphids (Hemiptera: Aphididae) are one of the pests that cause the greatest economic losses in crops worldwide. In recent years, in the main production areas of southeastern Spain, the incidence of damage caused by aphids, specifically the species *Myzus persicae* (Sulzer) and *Aphis gossypii* Glover, has increased especially in organic pepper and melon crops. Chemical control of aphids is complicated due to the appearance of populations resistant to numerous active ingredients, which together with the initiatives promoted by the European Union such as the *European Green Deal* and the *Farm to Fork* strategy, which seek to reduce the use of pesticides, have led to a very complex scenario for the agricultural sector, given the difficulties they encounter in carrying out a good management of integrated pest management tools for crop protection.

Given the lack of alternatives to conventional problematic phytosanitary products, there is a need to look for in nature those substances that are capable of controlling pests without compromising the integrity of the environment, human health and that are also compatible with auxiliary fauna. The essential oils of some plants and the pure compounds that can be extracted from them are known to have repellent, insecticidal, and feeding and reproductive inhibiting properties, among others. But they have the particularity that they are immiscible in water, very volatile and easily degraded.

Therefore, the objective of this doctoral thesis is to develop oil-in-water emulsions, using surfactants and/or stabilizers and applying the necessary energy to obtain a homogeneous and stable mixture over time, with particle sizes of the active ingredient at a nanometric scale and thus avoid its rapid degradation, volatilization and improve the persistence of its insecticidal effect, with the aim of making these formulations another chemical control tool for crop protection.

The nanoemulsions have been developed using both a high-speed homogenizer and the ultrasonic technique and have been characterized to know the particle size of the active ingredient and the stability of the mixture. In this regard, the results indicate that the ultrasonic technique produces nanoemulsions with small particle sizes and good stability. In addition, the insecticidal effect and its persistence on *M. persicae* have been evaluated both in laboratory conditions and in field conditions in a greenhouse with

pepper plants and it has been obtained that 1% of the mixture of citral, (E)-anethole, farnesol, (Z)-jasmones and lemon oil, in equal parts, in combination with soya lecithin and sunflower oil in a 1:1:1 formulation, it produces a mortality of 73% after 4 days of spraying, which is maintained until 14 days in laboratory conditions and 30% in field conditions without causing phytotoxicity to the pepper crop. On the other hand, 0.25% (Z)-jasmones makes a good emulsion with Tween80® (1:2) and in field conditions produces 83% mortality 4 days after spraying. In the case of 3% cottonseed oil, formulated 1:1 with potassium soap as a surfactant in water, it results in 82% mortality at 4 days after field application. As for farnesol, the 0.2% nanoemulsion with Tween80® (1:2), reduces the population growth rate of *M. persicae* with an effect that persists up to 7 days after spraying of pepper plants.

The feeding behaviour of aphids has also been studied using the Electrical Penetration Graph (EPG) technique and it has been demonstrated that on the one hand, both anise essential oil and (E)-anethole, individually formulated at 0.2% with Tween80® (1:2), cause dehydration on the apterous forms of *M. persicae* and, on the other hand, that 0.2% distilled lemon oil with Tween80® (1:2), alters the feeding behavior of apterous individuals of *M. persicae*, since they spent more time in no-probe activity than those who were fed on control plants and in addition, the total duration of phloem ingestion was significantly shorter for individuals fed with plants treated with distilled lemon oil in relation to the control.

Regarding the olfactory repellency of the apterous forms of *M. persicae*, the results of the choice bioassay with pepper plants indicate that 0.2% of coconut fatty acids methyl esters, hereinafter coconut, showed repellent properties (R.I. = 28.93%), being the first report of the repellent activity of this product against an agricultural pest. In addition, (E)-anethole produces olfactory repellency on the apterous forms of *M. persicae*, both individually (R.I. = 30.85%) at 0.2% with Tween80® (1:2), and forming mixtures at 0.1% with coconut + distilled lemon oil + Tween80® (1:1:1:2) (R.I. = 30.63%) or with farnesol + distilled lemon oil + Tween80® (1:1:1:2) (R.I. = 36.55%). On the other hand, 0.25% anise essential oil with safflower oil (1:1) also repels (R.I. = 25.87%) apterous forms of *M. persicae*. Although it is true that the 0.2% nanoemulsion of farnesol with Tween80® (1:2) has had the greatest repellent effect via the olfactory pathway (R.I. = 40.24%), in

addition, in formulation (1:1:1:2) with distilled oil of lemon + coconut + Tween80®, it significantly reduced the fertility (0.65 nymphs/female and day) of the apterous individuals of *M. persicae* compared to the control (0.97 nymphs/female and day).

Finally, it has been shown that the nanoemulsions of the bioactive volatiles studied are not transported through the sap-conducting vessels of the plant, although translaminar effects on the leaves should not be ruled out and would have to be studied in future work. On the other hand, it can be concluded that the mortality produced by nanoemulsions of bioactive volatiles on aphids is mainly due to topical contact and that the effects on feeding occur when the aphid stylet comes into contact with the product in leaf tissues, while repellency occurs due to olfactory interaction with the receptors of the aphids antennae.

In short, the bioactive volatiles studied in this doctoral thesis are another example of natural substances with the potential to be included as active ingredients in future phytosanitary products, however, the collaboration of other organizations and institutions (public or private) is needed to bring the final product to the user. Without overlooking the risk assessment, since, although they are products of natural origin, they are not exempt from being able to produce some unfavorable effect on crops, humans, animals and the environment, given their chemical nature.

# **1. Introducción**

## 1.1. Sustancias de origen botánico para el control de plagas.

### 1.1.1. Antecedentes.

La evolución ha dotado a los organismos biológicos de mediadores químicos, denominados semioquímicos, implicados en las comunicaciones entre especies, con una gran variedad de efectos. En el caso de las plantas, se han identificado numerosas moléculas que presentan una acción defensiva frente a los insectos perjudiciales (Grainge y Ahmed, 1988). Según Philogène et al. (2004), el ser humano desarrolló los primeros fitosanitarios a base de productos vegetales al descubrir que determinadas plantas se protegían mejor que otras de las plagas. En los textos más antiguos (de más de 4000 años) de la cultura hindú se cita la utilización del neem (*Azadirachta indica* A. Jussieu). Se tiene constancia de que los romanos (hace más de 2000 años) utilizaban polvos preparados a partir de *Veratrum* sp., como insecticidas y rodenticidas. Sin embargo, es difícil saber exactamente dónde y en qué momento empiezan a utilizarse los extractos de plantas en la protección de cultivos.

Una de las primeras citas con carácter científico sobre la actividad insecticida de los extractos de plantas data del año 1773 en un escrito de Parmentier, en el que aconsejaba la destilación de plantas como la coquelearia (*Cochlearia officinalis* L.), el jaramago (*Sisymbrium officinale* (Linnaeus) Scopoli) o el mastuerzo (*Lepidium sativum* L.), para obtener sus aceites esenciales y aplicarlo para combatir las chinches de las plantas. También en el siglo XVIII grandes naturalistas como Buffon, Linneo o Reaumur, establecieron las bases del conocimiento científico en el campo de la fitoprotección. De esta forma, la combinación de prácticas empíricas con las primeras observaciones científicas llevó al desarrollo, con éxito más o menos notable, de la utilización de extractos vegetales desde finales del siglo XIX (Philogène et al., 2004).

Según Philogène et al. (2004), durante el siglo XIX, se identificaron algunos compuestos de origen vegetal ampliamente utilizados como repelentes o tóxicos como la nicotina, uno de los alcaloides del tabaco y otras especies del género *Nicotiana* sp.; la cuasina que se extrae de *Simarouba amara* Aublet o de la *Picrasma excelsa* (Swartz) Planchon; la rotenona que se encuentra abundantemente en fabáceas del género *Derris* sp., típicas de Malasia y otras del género *Lonchocarpus* sp., de América Latina; o las

piretrinas obtenidas a partir de las flores del piretro o pelitre de Dalmacia (*Tanacetum cinerariifolium* (Treviranus) Schultz Bipontinus).

Los productos fitosanitarios de origen vegetal fueron sustituidos por los insecticidas de síntesis durante la Segunda Guerra mundial (1939-1945) debido a que Japón, principal productor de piretro, dejó de exportar piretrinas a EEUU al mismo tiempo que Müller, descubrió en los laboratorios de Geygi en Basilea, las propiedades insecticidas del dicloro-difenil-tricloroetano o DDT, un compuesto organoclorado sintetizado por Zeidler en 1874. La compañía suiza ofreció este nuevo producto al ejército americano que buscaba reemplazar a las piretrinas japonesas para defenderse de las pulgas. Paralelamente, los alemanes ponían a punto los primeros insecticidas organofosforados como sucedáneos de la nicotina y de las armas químicas usadas en los combates de la Primera Guerra mundial (Philogène et al., 2004). La erradicación del tifus en Nápoles en 1943 o la malaria en la India durante los años 50, gracias al empleo de insecticidas orgánicos de síntesis (Regnault-Roger, 2004), acabó por orientar de forma definitiva la defensa fitosanitaria hacia el uso de compuestos organoclorados, organofosforados y carbamatos, en detrimento de los insecticidas de origen vegetal (Philogène et al., 2004).

Dos series de sucesos importantes han contribuido a renovar el interés por las moléculas presentes en los vegetales. Por un lado, los problemas de contaminación del medio ambiente, la resistencia de las poblaciones de insectos perjudiciales y los efectos nocivos sobre los organismos no diana, debido al uso indiscriminado de los insecticidas químicos de síntesis. Y, por otro lado, el estudio más detallado de las relaciones planta-insecto apoyado en una tecnología que permite un análisis más sofisticado de las moléculas fitoquímicas y un mejor conocimiento de la respuesta de los insectos perjudiciales a estas moléculas (Philogène et al., 2004).

Philogène et al. (2004) apuntan que en 1948 se obtuvo el primer piretroide de síntesis, la aletrina, a partir del ácido crisantémico, pero tenía el inconveniente de ser inestable a la exposición a la luz. La investigación sobre la mejora de su fotoestabilidad y de su actividad insecticida, así como la reducción de la toxicidad para los mamíferos, originaron compuestos como la tetrametrina, permetrina, cipermetrina o la deltametrina. Los piretroides de síntesis se comercializaron al final de los años setenta y tuvieron un

éxito muy rápido, sin embargo, resultaban perjudiciales para las abejas y aparecieron numerosos casos de resistencia entre los insectos y ácaros plaga.

Por ello, según Philogène et al. (2004), los científicos volvieron a mostrar interés por las moléculas de origen vegetal. En la década de los 90 se publicaron un gran número de trabajos y se celebraron conferencias internacionales dedicadas al neem. Como consecuencia, hoy se encuentra el neem en los mercados mundiales bajo diferentes formulaciones y nombres comerciales. El aceite de neem debe su actividad a compuestos limonoideos, principalmente la azadiractina, con actividad inhibidora de la hormona de la muda o ecdisoma impidiendo el crecimiento del insecto evitando que alcance la etapa adulta e interrumpiendo así el ciclo reproductor, además de producir efectos antialimentarios e insecticidas.

Las propiedades notables del neem han estimulado numerosos trabajos para la identificación de moléculas de interés en las plantas (Philogène et al., 2004). Se ha demostrado que las plantas pertenecientes a las familias *Myrtaceae*, *Poaceae*, *Apiaceae*, *Lauraceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae*, entre otras, poseen actividad insecticida, pero las más activas son las de la familia *Lamiaceae*. Las plantas pertenecientes a estas familias son conocidas por sus aceites esenciales. Gracias a los análisis químicos cromatográficos y espectrofotométricos se ha conseguido aislar e identificar la composición química de los aceites esenciales, lo cual es interesante para conocer la relación estructura química-actividad insecticida, así como las sinergias entre compuestos y la toxicidad de las moléculas individualmente (Philogène et al., 2004; Regnault-Roger, 2004).

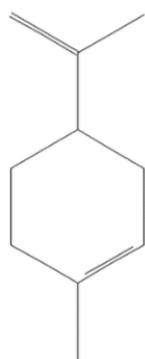
#### 1.1.2. Composición química.

Los aceites esenciales se pueden obtener a partir de hidrodestilación, destilación al vapor, destilación seca o prensado mecánico a partir de materias vegetales (raíces, tallos, cortezas, flores, frutos y semillas) (Pavoni et al., 2019). Consisten en una mezcla compleja de más de 200 compuestos químicos ligados entre sí que confieren a las plantas un aroma y un sabor peculiar y específico. Principalmente se compone de la fracción volátil (90-95%) y el residuo no volátil (5-10%). La fracción volátil está formada por hidrocarburos (compuestos básicamente a partir de moléculas de hidrógeno y carbono). Los hidrocarburos que predominan en las plantas son los isoprenos o hemiterpenos.

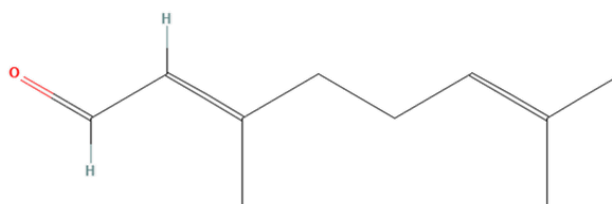
Cuando dos moléculas de un isopreno se unen, el resultado es un monoterpeno. Del mismo modo, cuando se unen tres unidades, dan lugar a un sesquiterpeno, y cuando se unen cuatro unidades, un diterpeno. También forman parte de esta fracción volátil sus derivados oxigenados como los alcoholes, las cetonas, los aldehídos, los ácidos carboxílicos, los ésteres y las lactonas. El residuo no volátil, lo forman ácidos grasos, carotenoides, esteroides y flavonoides (Rathore, 2017).

Respecto a la fracción volátil, los monoterpenos están compuestos por hidrocarburos de 10 carbonos, la mayoría de los cuales son insaturados, están ampliamente distribuidos en la naturaleza (Figura 1). Se han identificado más de 400 monoterpenos naturales como el limoneno, citral, terpineno (presentes en el aceite esencial de limón y otros cítricos). Los derivados oxigenados de los monoterpenos se conocen como monoterpenoides, son las moléculas más representativas de los aceites esenciales, constituyen el 90% de su composición y presentan una gran variedad estructural y funcional. Entre ellos se encuentran los alcoholes, como el geraniol, presente en el aceite esencial de citronelas, rosas y geranios); las cetonas, como la jasmona, que es un compuesto volátil de las flores del jazmín; y los ácidos carboxílicos que incluyen a los ácidos grasos como el ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico, etc. (Rathore, 2017).

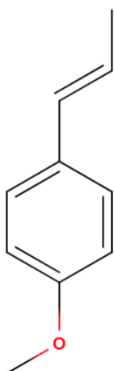
Los sesquiterpenos son compuestos muy comunes en los aceites esenciales de las plantas y constituyen un amplio grupo de metabolitos secundarios, algunos de ellos se sintetizan como respuesta a enfermedades o lesiones desempeñando roles importantes en la defensa de las plantas. Los sesquiterpenos son antiinflamatorios, antisépticos, analgésicos y antialérgicos (Rathore, 2017). Dentro de este grupo pertenece el farnesol (sesquiterpeno alcohol) que posee una estructura molecular similar al hidrocarburo sesquiterpénico (E)- $\beta$ -farneseno, el principal componente tanto de la feromona de alarma de muchos pulgones, como del aceite esencial de una especie del género *Syncolostemon petiolatus* familia Lamiaceae, que contiene más de un 70% de (E)- $\beta$  farneseno (Pickett et al., 2017).



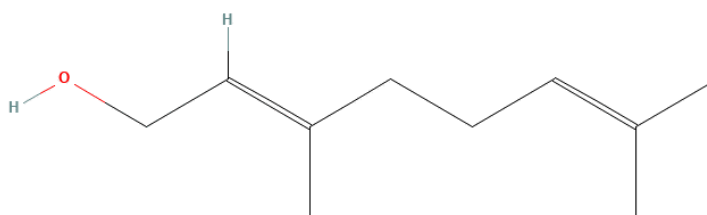
**Limoneno**



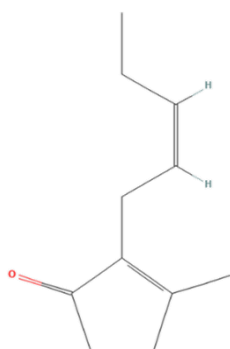
**Citral**



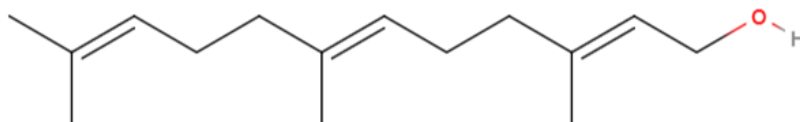
**(E)-anetol**



**Geraniol**



**(Z)-jasmona**



**Farnesol**

**Figura 1. Estructura molecular de algunos monoterpenos y derivados (PubChem, 2024).**

### 1.1.3. Modo de acción.

Los aceites esenciales poseen una amplia gama de constituyentes beneficiosos y, a menudo, se utilizan para fines terapéuticos o para proporcionar sabor y/o aromas en alimentos, bebidas, medicamentos y cosméticos (Rathore, 2017). Al ser de origen natural, se consideran ambientalmente inocuos y fáciles de obtener y de usar, lo que ha atraído la atención de la comunidad científica como ingredientes activos para el desarrollo de productos ecológicos como los insecticidas botánicos (Pavoni et al., 2019).

Existen numerosas investigaciones encaminadas a conocer el modo de acción de los aceites esenciales y sus compuestos. Se ha demostrado que afectan los procesos fisiológicos, nutricionales y de comportamiento de los insectos. Producen mortalidad por contacto y por inhalación, afectan al sistema nervioso, interfieren con los receptores olfativos, son repelentes e inhibidores del asentamiento, tienen propiedades antialimentarias, son disuasorios de la oviposición y reguladores del crecimiento, tienen propiedades ovicidas y reducen la fertilidad de los insectos, además de tener propiedades fungicidas, y de impedir la penetración de nematodos en las raíces (Nollet y Rathore, 2017).

Se sabe que los aceites esenciales y sus compuestos, al entrar en contacto con los tejidos de algunos insectos, producen citotoxicidad (destruyen células), disminuyen la permeabilidad de la membrana celular y reducen el número de mitocondrias, perjudicando a la respiración celular (Rathore, 2017). El aceite esencial de anís y los compuestos puros (E)-anetol (presente en anís e hinojo) y farnesol, presentan toxicidad por contacto frente a *Myzus persicae* (Sulzer) y *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) en pimiento (Canto-Tejero et al., 2022a; 2022b) y *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) en lechuga (Canto-Tejero et al., 2022c). Por su parte, Casas et al., (2023), demostraron la actividad insecticida de aceites esenciales de plantas aromáticas mediterráneas de la familia de las lamiáceas como son tomillo (*Thymus vulgaris* L.), cantueso (*Lavandula dentata* L.), y romero (*Salvia rosmarinus* Spenner sin. *Rosmarinus officinalis* L.), frente al pulgón del cereal *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) en cebada. Kirisik et al. (2024), también demostró que la pulverización individual o la mezcla de aceites esenciales de tomillo, naranjo (*Citrus sinensis* L.) y laurel (*Laurus nobilis* L.) producen mortalidad en adultos de *Aphis gossypii* Glover sobre discos de hoja de melón (*Cucumis melo* L.).

Por otro lado, se ha comprobado que muchos componentes de los aceites esenciales actúan sobre el sistema nervioso de los insectos, López y Pascual-Villalobos (2010), concluyeron que la fenchona (presente en el aceite esencial de hinojo), la carvona (presente en el aceite esencial de alcaravea, hierbabuena y eneldo) y el linalol (presente en lavanda, menta, cítricos o laurel), inhibieron la actividad de la acetilcolinesterasa (enzima necesaria para el funcionamiento normal del sistema nervioso) en tres coleópteros plaga de productos almacenados como *Sitophilus oryzae* (Linnaeus), *Rhizopertha dominica* (Fabricius) y *Laemophloeus minutus* (Olivier) sin. *Cryptolestes pusillus* (Schönherr).

También se ha estudiado que los aceites esenciales y sus compuestos volátiles interactúan con los receptores olfativos de los insectos, actuando como repelentes (Rathore, 2017). En el caso concreto de trabajos realizados con pulgones, se ha demostrado que los compuestos puros farnesol, geraniol y bisaboleno (presente en limón y orégano) inhiben el asentamiento de *M. persicae* en un ensayo de elección con hojas de pimienta (Gutiérrez et al., 1997). También los aceites esenciales de anís, su componente mayoritario (E)-anetol y otros compuestos puros como farnesol, geraniol, (Z)-jasmona y citral (también presente en *Cymbopogon* sp.), inhiben el asentamiento de individuos ápteros de *M. persicae* en ensayos de elección con hojas de pimienta (Pascual-Villalobos et al., 2019). Por su parte, Cantó-Tejero et al., (2022a) corroboró que los aceites esenciales de anís, albahaca y *Cymbopogon* sp., y los compuestos puros (E)-anetol, geraniol, farnesol y (Z)-jasmona, inhiben el asentamiento de individuos ápteros de *M. persicae* y *M. euphorbiae* en bioensayos de elección con hojas de pimienta, siendo farnesol y (Z)-jasmona, los más repelentes tanto para las formas ápteras como aladas de ambas especies en ensayos de olfatometría. También hay estudios con *M. persicae* sobre otras plantas hospedadoras como la col china (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis* (Loureiro) Hanelt), en los que se ha demostrado que la pulegona (compuesto mayoritario de la menta) impedía que los pulgones se asentarán sobre las hojas de esta planta (Dancewicz et al., 2008). En otras especies de pulgones como *R. padi*, el aceite esencial de hierba limón (*Cymbopogon* sp.) y el citral (compuesto mayoritario), así como el anís, la menta y la pulegona, al igual que farnesol, geraniol, (Z)-jasmona, estragol (compuesto mayoritario de la albahaca) y el cariofileno (sesquiterpeno presente en el aceite esencial de clavo), también inhibieron el asentamiento de individuos ápteros en un bioensayo de elección con hojas de cebada

(Pascual-Villalobos et al., 2017). Sobre *A. gossypii*, Koorki et al. (2018), estudiaron que los aceites esenciales de eucalipto rojo (*Eucalyptus camaldulensis*, Dehnhardt), romero y asafétida (*Ferula assa-foetida* L.) repelieron a los adultos en ensayo de olfatometría.

Otras investigaciones indican que estas sustancias tienen un modo de acción en fase de vapor a través del sistema respiratorio de los insectos. El aceite esencial de anís y su compuesto mayoritario el (E)-anetol, así como la mentona, el mentol y la pulegona (presentes en la menta), el cariofileno y el estragol, mostraron toxicidad volátil frente a *R. padi* sobre hojas de cebada (Pascual-Villalobos et al., 2017). También la liberación prolongada de vapores de (E)-anetol procedentes de encapsulaciones en forma de microesferas, presenta actividad insecticida frente a *M. persicae* sobre pimiento (Pascual Villalobos et al., 2020). Kirisik et al. (2024), demostraron que los vapores, individualmente o combinados, de aceites esenciales de tomillo, naranja y laurel, cuyos componentes mayoritarios fueron carvacrol (93,95%), limoneno (96,87%) y 1,8-cineol (57,49%), respectivamente, fueron tóxicos para los adultos de *A. gossypii* en ensayos de laboratorio con desecadores. Por su parte, Wang et al., (2024), en un ensayo de laboratorio con *A. gossypii* sobre discos de hoja de algodón, comprobaron que los vapores de aceites esenciales de albahaca morada (*Ocimum tenuiflorum* L.), menta (*Mentha piperita* L.), menta silvestre (*M. arvensis* L.) y tagetes (*Tagetes erecta* L.), prolongaron significativamente el período de ninfa, retrasando, por tanto, el desarrollo hasta la etapa adulta. Además, los aceites esenciales de menta silvestre y tagetes, redujeron la longevidad de los adultos y la fecundidad. Koorki et al. (2018), demostraron que los vapores de aceites esenciales de eucalipto rojo, romero y asafétida tuvieron efectos tóxicos en ninfas de *A. gossypii* sobre plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.). También los vapores de los aceites esenciales de neem, eucalipto rojo y laurel, mostraron toxicidad contra *A. gossypii* en pepino (Ebrahimi et al., 2013).

También se conoce el modo de acción antialimentario de los aceites esenciales sobre los insectos. Los compuestos que interfieren en la alimentación de los insectos pueden funcionar como inhibidores preingestivos, que afectan la actividad de los receptores del gusto, ingestivos que suprimen las enzimas salivales o el transporte de alimentos, y/o inhibidores postingestivos que afectan los procesos fisiológicos después de la ingestión de dichos compuestos durante la alimentación (Frazier y Chyb, 1995).

Utilizando la técnica de gráficos de penetración eléctrica (EPG), Gutiérrez et al., (1997), demostraron que el bisaboleno reduce los tiempos de actividad del estilete de *M. persicae* sobre plantas de pimiento tratadas, así como el número de punciones intercelulares. También se ha estudiado el comportamiento alimentario de *M. persicae* sobre otras plantas hospedadoras como la col china y se ha demostrado que la pulegona ralentizó la llegada de los estiletes a los vasos conductores de floema y redujo los tiempos de ingestión en estos tejidos (Dancewicz et al., 2008), que el limoneno inhibe el número y la duración de las ingestiones de savia del floema (Halarewicz-Pacan et al., 2003) y que otros compuestos como citral y linalol reducen el número y la duración de las pruebas o sondeos (Gabrys et al., 2005). Wang et al. (2024), descubrieron que los aceites esenciales de albahaca morada, menta y tagetes tienen potencial como antialimentarios de *A. gossypii* sobre plantas de algodón.

En la siguiente tabla (Tabla 1), se recoge el modo de acción de los aceites esenciales (AE) y compuestos puros que se han encontrado en la literatura consultada.

**Tabla 1. Modos de acción de aceites esenciales (AE) y compuestos puros sobre algunos pulgones plaga.**

| Modo de acción              | Sustancia                          | Plaga                         | Referencia                     |
|-----------------------------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Inhibición del asentamiento | AE <i>Cymbopogon flexuosus</i>     | <i>Myzus persicae</i>         | Cantó-Tejero et al. 2022a      |
|                             |                                    | <i>Macrosiphum euphorbiae</i> |                                |
|                             |                                    | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Pascual-Villalobos et al. 2017 |
|                             | AE <i>Eucalyptus camaldulensis</i> | <i>Aphis gossypii</i>         | Koorki et al. 2018             |
|                             | AE <i>Ferula assa-fetida</i>       | <i>Aphis gossypii</i>         | Koorki et al. 2018             |
|                             | AE <i>Foeniculum vulgare</i>       | <i>Myzus persicae</i>         | Pascual-Villalobos et al. 2019 |
|                             |                                    | <i>Macrosiphum euphorbiae</i> | Cantó-Tejero et al. 2022a      |
|                             |                                    | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Pascual-Villalobos et al. 2017 |
|                             | AE <i>Mentha x piperita</i>        | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Pascual-Villalobos et al. 2017 |
|                             | AE <i>Ocimum basilicum</i>         | <i>Myzus persicae</i>         | Cantó-Tejero et al. 2022a      |
|                             |                                    | <i>Macrosiphum euphorbiae</i> |                                |
|                             | AE <i>Salvia rosmarinus</i>        | <i>Aphis gossypii</i>         | Koorki et al. 2018             |
|                             | Bisaboleno                         | <i>Myzus persicae</i>         | Gutiérrez et al. 1997          |
|                             | Cariofileno                        | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Pascual-Villalobos et al. 2017 |
|                             | Citral                             | <i>Myzus persicae</i>         | Pascual-Villalobos et al. 2019 |
|                             |                                    | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Pascual-Villalobos et al. 2017 |
|                             | (E)-anetol                         | <i>Myzus persicae</i>         | Pascual-Villalobos et al. 2019 |
|                             |                                    | <i>Macrosiphum euphorbiae</i> | Cantó-Tejero et al. 2022a      |
|                             | Estragol                           | <i>Macrosiphum euphorbiae</i> | Cantó-Tejero et al. 2022a      |
|                             |                                    | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Pascual-Villalobos et al. 2017 |
|                             | Farnesol                           | <i>Myzus persicae</i>         | Gutiérrez et al. 1997          |
|                             |                                    |                               | Pascual-Villalobos et al. 2019 |
|                             |                                    |                               | Cantó-Tejero et al. 2022a      |
|                             | Geraniol                           | <i>Macrosiphum euphorbiae</i> | Cantó-Tejero et al. 2022a      |
|                             |                                    | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Pascual-Villalobos et al. 2017 |
|                             |                                    |                               | Gutiérrez et al. 1997          |
|                             | Pulegona                           | <i>Myzus persicae</i>         | Pascual-Villalobos et al. 2019 |
|                             |                                    |                               | Cantó-Tejero et al. 2022a      |
|                             |                                    | <i>Macrosiphum euphorbiae</i> | Cantó-Tejero et al. 2022a      |
|                             | (Z)-jasmona                        | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Pascual-Villalobos et al. 2017 |
|                             |                                    | <i>Myzus persicae</i>         | Pascual-Villalobos et al. 2019 |

|                                          |                                    |                               |                                  |
|------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
|                                          |                                    |                               | Cantó-Tejero et al. 2022a        |
|                                          |                                    | <i>Macrosiphum euphorbiae</i> | Cantó-Tejero et al. 2022a        |
|                                          |                                    | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Pascual-Villalobos et al. 2017   |
| Toxicidad por inhalación                 | Aceite de Neem                     | <i>Aphis gossypii</i>         | Ebrahimi et al. 2013             |
|                                          | AE <i>Citrus sinensis</i>          | <i>Aphis gossypii</i>         | Kirisik et al. 2024              |
|                                          | AE <i>Eucalyptus camaldulensis</i> | <i>Aphis gossypii</i>         | Koorki et al. 2018               |
|                                          | AE <i>Ferula assa-fetida</i>       | <i>Aphis gossypii</i>         | Ebrahimi et al. 2013             |
|                                          | AE <i>Foeniculum vulgare</i>       | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Koorki et al. 2018               |
|                                          | AE <i>Laurus nobilis</i>           | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Pascual-Villalobos et al. 2017   |
|                                          | AE <i>Salvia rosmarinus</i>        | <i>Aphis gossypii</i>         | Kirisik et al. 2024              |
|                                          | AE <i>Thymus vulgaris</i>          | <i>Aphis gossypii</i>         | Ebrahimi et al. 2013             |
|                                          | Cariofileno                        | <i>Aphis gossypii</i>         | Koorki et al. 2018               |
|                                          | (E)-anetol                         | <i>Aphis gossypii</i>         | Kirisik et al. 2024              |
|                                          | Estragol                           | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Pascual-Villalobos et al. 2017   |
|                                          | Mentol                             | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Pascual-Villalobos et al. 2017   |
|                                          | Mentona                            | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Pascual-Villalobos et al. 2017   |
|                                          | Pulegona                           | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Pascual-Villalobos et al. 2017   |
| Toxicidad por contacto                   | AE <i>Citrus sinensis</i>          | <i>Aphis gossypii</i>         | Kirisik et al. 2024              |
|                                          | AE <i>Foeniculum vulgare</i>       | <i>Myzus persicae</i>         | Cantó-Tejero et al. 2022a; 2022b |
|                                          |                                    | <i>Macrosiphum euphorbiae</i> |                                  |
|                                          |                                    | <i>Nasonovia ribisnigri</i>   |                                  |
|                                          | AE <i>Laurus nobilis</i>           | <i>Aphis gossypii</i>         | Cantó-Tejero et al. 2022c        |
|                                          | AE <i>Lavandula dentata</i>        | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Kirisik et al. 2024              |
|                                          | AE <i>Salvia rosmarinus</i>        | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Casas et al. 2023                |
|                                          | AE <i>Thymus vulgaris</i>          | <i>Rhopalosiphum padi</i>     | Casas et al. 2023                |
|                                          |                                    | <i>Aphis gossypii</i>         | Kirisik et al. 2024              |
|                                          | (E)-anetol                         | <i>Myzus persicae</i>         | Cantó-Tejero et al. 2022a; 2022b |
|                                          |                                    | <i>Macrosiphum euphorbiae</i> |                                  |
|                                          |                                    | <i>Nasonovia ribisnigri</i>   |                                  |
| Antialimentario                          | Farnesol                           | <i>Myzus persicae</i>         | Cantó-Tejero et al. 2022c        |
|                                          |                                    | <i>Macrosiphum euphorbiae</i> |                                  |
|                                          |                                    | <i>Nasonovia ribisnigri</i>   |                                  |
|                                          | AE <i>Ocimum tenuiflorum</i>       | <i>Aphis gossypii</i>         | Cantó-Tejero et al. 2022a        |
|                                          | AE <i>Mentha arvensis</i>          | <i>Aphis gossypii</i>         | Cantó-Tejero et al. 2022b        |
|                                          | AE <i>Mentha x piperita</i>        | <i>Aphis gossypii</i>         | Cantó-Tejero et al. 2022c        |
|                                          | AE <i>Tagetes erecta</i>           | <i>Aphis gossypii</i>         | Cantó-Tejero et al. 2022d        |
|                                          | Bisaboleno                         | <i>Myzus persicae</i>         | Wang et al. 2024                 |
|                                          | Citral                             | <i>Myzus persicae</i>         | Wang et al. 2024                 |
|                                          | Limoneno                           | <i>Myzus persicae</i>         | Wang et al. 2024                 |
| Sistema nervioso                         | Linalol                            | <i>Myzus persicae</i>         | Wang et al. 2024                 |
|                                          | Pulegona                           | <i>Myzus persicae</i>         | Wang et al. 2024                 |
|                                          | Carvona                            | <i>Myzus persicae</i>         | Wang et al. 2024                 |
|                                          | Fenchona                           | <i>Myzus persicae</i>         | Wang et al. 2024                 |
| Crecimiento/desarrollo/muda/reproducción | AE <i>Ocimum tenuiflorum</i>       | <i>Myzus persicae</i>         | Wang et al. 2024                 |
|                                          | AE <i>Mentha arvensis</i>          | <i>Myzus persicae</i>         | Wang et al. 2024                 |
|                                          | AE <i>Mentha x piperita</i>        | <i>Myzus persicae</i>         | Wang et al. 2024                 |
|                                          | AE <i>Tagetes erecta</i>           | <i>Myzus persicae</i>         | Wang et al. 2024                 |

#### 1.1.4. Formulación de bioactivos volátiles como nanoemulsión.

Una emulsión es una dispersión de un líquido en otro no miscible con él y que en presencia de un agente emulsionante (tensoactivo o surfactante) forman una mezcla homogénea. El emulgente reduce la tensión superficial poniendo en contacto a las dos sustancias, actuando de estabilizador y permitiendo así la dispersión de un líquido (fase dispersa) en otro (fase continua o dispersante). En la naturaleza encontramos ejemplos como la leche, que es una emulsión de aceite en agua (O/W; oil in water) en la que las

partículas de grasa (sustancias oleosas que forman la fase dispersa) están recubiertas por una membrana o micelio de proteínas (caseína y otras) que actúan como emulsificantes, quedando dispersas de manera estable en el medio acuoso (fase continua o dispersante). Los aceites esenciales y sus compuestos, al ser sustancias oleosas, son insolubles en agua, por lo que necesitan de otras sustancias que actúan como surfactantes los cuales, en su estructura molecular, presentan un extremo lipofílico que se asocia a la fase oleosa y otro hidrofílico que se asocia a la fase acuosa, para que esto ocurra se necesita el aporte de energía externa como rotores de alta velocidad o mediante ultrasonidos, de tal manera que el ingrediente activo queda recubierto en su superficie por micelas del tensoactivo, en partículas de tamaño a una escala nanométrica ( $< 10^{-9}$  m), lo que se conoce como nanoemulsión, consiguiendo así una mezcla homogénea y estable en el tiempo (Pascual-Villalobos et al., 2019).

La estabilidad de la mezcla también depende del tamaño de partícula, además de su composición. En una emulsión inestable se pueden apreciar claramente a simple vista las dos fases separadas. Las partículas de más de 1  $\mu\text{m}$  ( $>1000$  nm) son atraídas gravitacionalmente, lo que favorece la disociación del aceite y la separación de las fases, mientras que si las partículas están dentro del rango nanométrico predominan en ellas el movimiento browniano y la estabilidad depende de las fuerzas repulsivas entre las partículas. En general, la agregación es menos frecuente y, aunque las nanoemulsiones pueden experimentar problemas de estabilidad, como floculación, sedimentación y coalescencia, éstos son reversibles mediante agitación (McClements, 2012).

Los aceites esenciales y otras sustancias de origen botánico presentan una rápida degradación ambiental y/o evaporación debido a su mala estabilidad fisicoquímica, alta volatilidad y descomposición térmica, que son propiedades que disminuyen significativamente su eficacia insecticida (Isman, 2000; Koul et al., 2008; Turek y Stintzing, 2013; Benelli y Lukehart, 2017). Gracias al efecto de los tensoactivos existe una mayor protección del ingrediente activo contra una rápida degradación o volatilización, lo que mejorara la biodisponibilidad (persistencia) durante periodos de tiempo más largos (Tadros et al., 2004). Por otro lado, los tamaños de partículas más pequeños (dentro de una escala nanométrica) presentan una ventaja en cuanto a la actividad insecticida debido a una mayor facilidad de penetración a través de las

membranas celulares de las plantas y los insectos. Además, el hecho de conseguir una mezcla homogénea aumenta la uniformidad de la dispersión ya que permite conseguir un mejor reparto del ingrediente activo por superficie tratada y volumen de caldo aplicado (Pascual-Villalobos et al., 2019).

Según Donsi y Ferrari (2016), la fabricación de nanoemulsiones de aceites esenciales implica: (i) seleccionar la fase oleosa y la cantidad a mezclar en agua; (ii) seleccionar el método de emulsificación y las condiciones para obtener partículas de tamaños de 200 nm o menores y no más de 1000 nm y (iii) seleccionar el tensioactivo o emulsionante y su proporción en comparación con el aceite. Esto último es fundamental debido a la asociación del tensioactivo con la cobertura superficial de la gota de aceite, la proporción aceite:surfactante determinará el tamaño de las partículas. Otro factor a tener en cuenta es el equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB, Hydrophilic-Lipophilic Balance) del emulsionante, éste debe ser cercano al del aceite para producir partículas pequeñas. El HLB es sólo un número empírico sobre las propiedades físicas de las moléculas de tensioactivos y a menudo se utiliza como guía para seleccionar tensioactivos. Cuanto mayor sea el (HLB), más hidrófilo (afinidad con el agua) será el tensioactivo. Los valores en el rango de 8 a 18 proporcionarán una buena emulsión de aceite en agua, evitando la floculación, formación de crema y coalescencia de las gotas de aceite. Sin embargo, hay otros factores importantes a considerar. En particular, la geometría molecular de un surfactante juega un papel crítico en el empaquetamiento de las moléculas en la unión aceite-agua, determinando la formación y estabilidad de nanoemulsiones (Chang y McClements, 2014). En definitiva, encontrar la mezcla y/o proporción adecuada de tensioactivo-aceite-agua es lo más importante para definir el proceso de elaboración, a pesar de que otros parámetros, como el método, la velocidad de agitación, el tiempo, etc., también juegan un papel relevante (Pascual-Villalobos et al., 2019).

Las nanoemulsiones de sustancias de origen botánico suelen presentar una apariencia lechosa o blanquecina debido a que el tamaño de las partículas, de aceite (normalmente entre 0,2-1  $\mu\text{m}$ ) dispersas en el agua, hace que la luz no pueda atravesarlas, sino que esta se difunde en todas direcciones. Constan de tres componentes: agua (85%-99,4%), sustancia oleosa (ingrediente activo) que supone entre el 0,2%-5% del total y elementos emulsionantes (0,4%-10%). Las nanoemulsiones se pueden formar por

emulsificación espontánea mezclando primero el aceite junto con el tensioactivo y añadiendo agua lentamente a la vez que se emplean medios mecánicos como la agitación en todo el conjunto, aunque generalmente se necesita homogeneizar la mezcla mediante ultrasonidos o rotor de alta velocidad. Las nanoemulsiones son termodinámicamente inestables, es decir que pueden destruirse al congelarse o calentarse, sin embargo, pueden ser cinéticamente estables durante mucho tiempo, sin separación de fases, debido a las fuerzas repulsivas electrostáticas entre las partículas (Anton y Vandamme, 2011).

El principal obstáculo para la estabilidad física de una nanoemulsión está relacionado con la maduración de Ostwald, que surge de la polidispersidad de la emulsión y la diferencia de solubilidad entre gotas pequeñas y grandes (Tadros et al., 2004). La maduración de Ostwald puede describirse como el crecimiento y agregación de pequeñas gotas en otras más grandes; este proceso espontáneo impulsado termodinámicamente ocurre porque las partículas más grandes se ven más favorecidas energéticamente que las partículas más pequeñas (Wooster et al., 2008). Este fenómeno aparece, por ejemplo, cuando se intenta disolver aceite en agua. El proceso puede ralentizarse añadiendo triglicéridos de cadena media o larga, como son los aceites vegetales, los denominados “inhibidores de la maduración de Ostwald” que incluyen sustancias altamente apolares, como el aceite de maíz, el aceite de girasol o el aceite de sésamo, entre otros. Sin embargo, la presencia de inhibidores de la maduración de Ostwald y la modificación relativa de la composición de la fase oleosa podrían influir en la actividad de los aceites esenciales. Por lo tanto, en la formulación de una nanoemulsión adecuada, se debe optimizar la presencia de inhibidores de la maduración de Ostwald para maximizar tanto la estabilidad física como la eficacia (Pavoni et al., 2019).

En los últimos años, las emulsiones O/W están captando mucha atención debido a la necesidad de reducir los disolventes tóxicos e inflamables, de los formulados fitosanitarios convencionales, y sustituirlos por sustancias de origen natural. Las sustancias de origen vegetal han sido utilizadas desde la antigüedad en forma de emulsiones como insecticidas, pero también actúan como adyuvantes para las moléculas liposolubles debido a sus propiedades físicas y químicas. La mayoría son ésteres de ácidos grasos (saturados e insaturados) de elevado peso molecular, con cadenas carbonadas medias o largas. Además, también pueden aportar sus propios modos de acción

insecticida: por inhalación, provocada por su riqueza en compuestos volátiles; por contacto, como consecuencia de la formación de una película impermeable que aísla al insecto del aire y provoca su asfixia; y por penetración profunda, gracias a la capacidad de algunos de sus compuestos de intervenir en las rutas metabólicas de los organismos. La toxicidad de los ácidos grasos se produce por ruptura de las membranas celulares, por alteración de la fosforilación oxidativa y por afectación de la cutícula de los insectos. Existe una ventaja en el empleo de tensioactivos de uso alimentario, debido a las restricciones actuales en la legislación fitosanitaria, ya que se consideran no tóxicos para los mamíferos en una utilización normal y razonada (Philogène et al., 2004). Además, en las emulsiones con sustancias de origen botánico, es probable que el desarrollo de resistencias sea más lento, al estar formadas por mezclas complejas de compuestos pertenecientes a diferentes grupos funcionales (Rathore, 2017).

En definitiva, los insecticidas a base de sustancias de origen botánico deben estar rigurosamente estandarizados hasta tal punto que se asegure un cierto nivel de eficacia en el uso final para que puedan competir con sus análogos, los fitosanitarios de síntesis, además deben ofrecer una ventaja en la especificidad de las plagas objetivo, optimizando la acción de los ingredientes activos, reduciendo el riesgo de desarrollo de resistencias y minimizando el impacto residual en el medio ambiente. La aplicación de la nanotecnología en el desarrollo de nuevas formulaciones insecticidas es uno de los mayores desafíos y, al mismo tiempo, una de las mayores promesas de futuro para mejorar la estabilidad, eficacia y seguridad de los productos naturales.

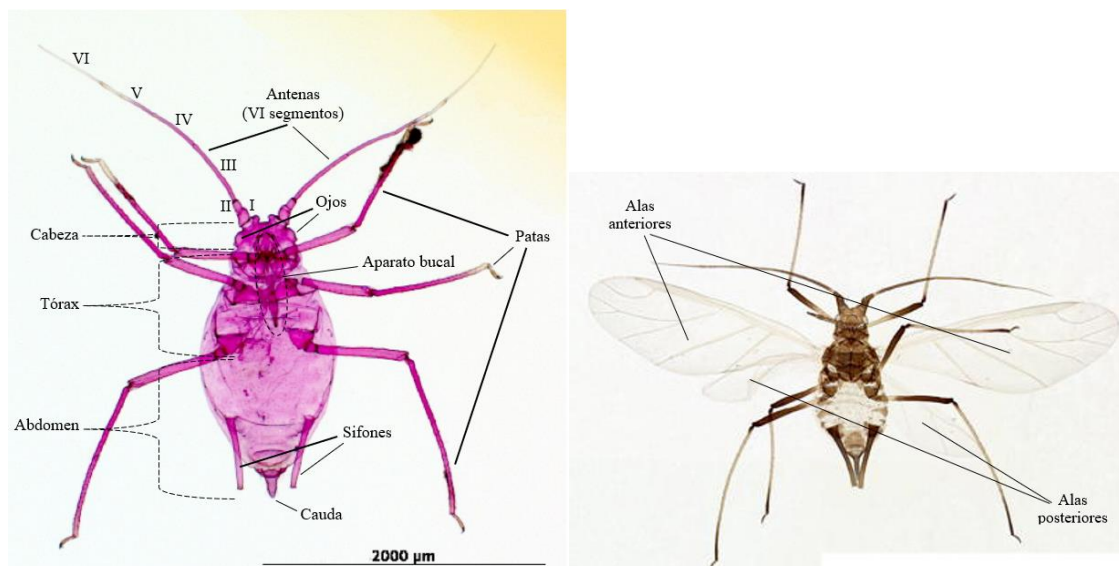
## **1.2. Pulgones (Hemiptera: Aphididae).**

Por ser la plaga principal objeto de estudio de esta tesis, se ha dedicado un apartado especial a los pulgones (Hemiptera: Aphididae).

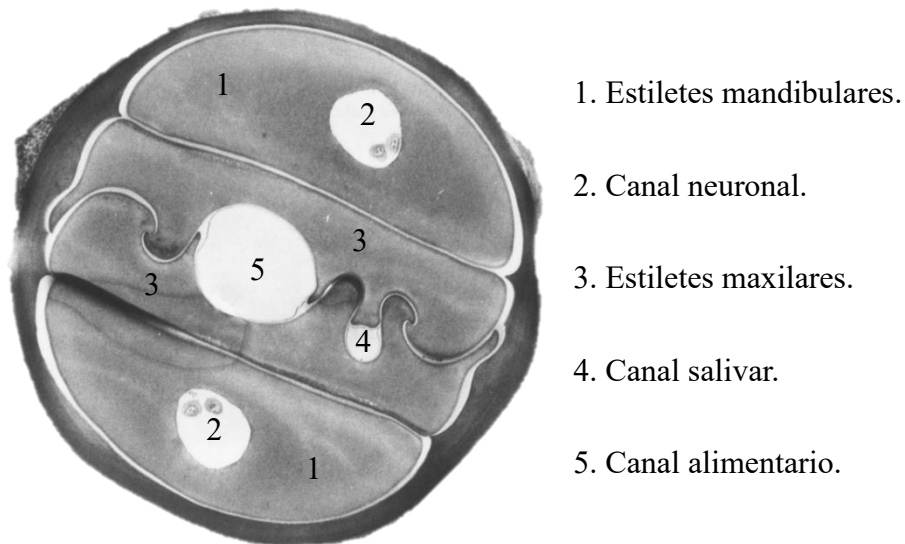
### **1.2.1. Morfología.**

La mayoría de los pulgones plaga pertenecen a la familia Aphididae, miden entre 2-5 mm de longitud (Figura 2). En la cabeza poseen: ojos compuestos, un par de antenas y el aparato bucal u órgano de alimentación. Las antenas están compuestas por entre 3-6 segmentos o antenómeros (escapo, pedicelo y el resto forman el filamento), en general, el último segmento está formado por dos partes, la base y el proceso terminal. En las

antenas se encuentran los sensores o rinarios que tienen una misión olfativa. El aparato bucal de los pulgones (Figura 3) es de tipo picador-chupador, típico del orden Hemiptera (García Marí y Ferragut Pérez, 2020). Consta de dos pares de estiletes largos que se estrechan hasta llegar a una punta afilada. El primer par, denominado estiletes mandibulares, se encargan de la penetración física de las paredes celulares de las plantas y protegen o enfundan al segundo par, conocido como estiletes maxilares, que son los que realmente ingresan en las células vegetales, son bastante flexibles y largos, lo que les permite alcanzar los vasos floemáticos (Tjallingii y Hogen Esch, 1993). El par interno de estiletes maxilares están estrechamente entrelazados mediante crestas y surcos, formando el canal alimentario (de 1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro) y el canal salivar (de 0,2-0,4  $\mu\text{m}$  de diámetro), aunque son canales distintos, se fusionan en la punta para formar un conducto común (Forbes, 1969). Toda esta estructura se encuentra protegida por un labio formado por cuatro segmentos parcialmente telescópicos, con pelos en su extremo que actúan como sensores táctiles. Por otro lado, está la faringe, situada a continuación del canal alimentario y que a su vez consta de tres partes: el conducto faringeal (formado por la epifaringe y la hipofaringe), la válvula precibarial (controlada por los músculos dorsales, encargados de la apertura, y los músculos ventrales, encargados del cierre) y la bomba cibarial, responsable del bombeo de la savia desde el canal alimenticio hasta el esófago y la faringe (Moreno Lozano, 2005).



**Figura 2. Morfología de los pulgones. Izquierda: forma áptera. Derecha: forma alada. (Favret y Miller, 2012).**



**Figura 3. Sección transversal del estilete del aparato bucal de un pulgón (Tjallingii y Hogen Esch, 1993).**

En el tórax se encuentran tres pares de patas y, en el caso de las formas aladas éste suele estar esclerotizado y se insertan dos pares de alas. Las alas anteriores tienen una morfología muy estable y son muy útiles para la identificación de las especies. Las alas posteriores son más pequeñas (García Marí y Ferragut Pérez, 2020).

El abdomen, tiene ocho segmentos visibles, es de coloración clara a oscura y de forma alargada a redondeada, se caracteriza por la presencia o ausencia de un par de cornículos o sifones por los que expulsan sustancias procedentes de la hemolinfa, estas secreciones llevan, por un lado, feromonas de alarma, para avisar al resto de la colonia de la amenaza de un posible ataque de algún enemigo natural, y también un líquido aceitoso o pegajoso que dejan caer sobre el atacante. En la parte final del abdomen poseen una prolongación denominada cauda, su desarrollo está relacionado con la forma de secreción de la melaza que realizan por el ano. La forma y características de los sifones y la cauda son muy utilizadas en taxonomía. Algunas especies poseen en el abdomen glándulas productoras de cera pulverulenta o filamentosa con la que se recubren para protegerse (García Marí y Ferragut Pérez, 2020).

Los pulgones suelen presentar polimorfismo intraespecífico, con diferentes formas y coloraciones dentro de la misma especie (García Marí y Ferragut Pérez, 2020). Hay alrededor de 4700 especies de pulgones en el mundo (Remaudière y Remaudière, 1997). De éstas, se han registrado unas 450 especies procedentes de plantas de cultivo,

pero sólo unas 100 han explotado con éxito el medio agrícola en la medida en que tienen una importancia económica significativa (Blackman y Eastop, 2000). En los cultivos hortícolas en general, y específicamente en el contexto de este trabajo, en los cultivos de pimiento y melón, las especies más problemáticas son *Aphis gossypii* Glover y *Myzus persicae* (Sulzer), aunque también hay que destacar a otras que también suelen aparecer causando importantes daños, aunque con menor frecuencia como son *Aphis craccivora* Koch, *Aulacorthum solani* (Kaltenbach), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Martín Gil et al., 2021; Romero Cuadrado et al., 2023).

#### 1.2.2. Biología y desarrollo.

Los pulgones se reproducen a través de un proceso llamado partenogénesis cíclica, en el cual se alterna una generación con reproducción sexual y ovípara y varias generaciones consecutivas con reproducción asexual mediante partenogénesis y ovoviviparismo.

Las hembras partenogenéticas paren ninfas genéticamente idénticas a ellas (clones), que inmediatamente después de nacer son capaces tanto de alimentarse como de moverse. Los pulgones presentan reproducción o generaciones telescópicas, es decir que las ninfas recién nacidas ya contienen embriones en desarrollo en sus ovarios. Pasan, con sus respectivas mudas, por 4 estadios ninfales hasta alcanzar el estado adulto (Brightwell y Dransfield, 2016). Dependiendo de la especie y las condiciones climáticas, la fase de ninfa puede durar entre 2-5 días, mientras que la etapa adulta suele durar, de media, 14 días, por lo que un pulgón vive de media uno 20 días, en los que cada hembra adulta puede poner entre 50-80 ninfas o lo que es lo mismo entre 3-4 ninfas al día (De Conti et al., 2010). Los pulgones pueden tener hasta 20 generaciones por año, dependiendo de las condiciones climáticas, siendo sus ciclos de vida muy variables (García Marí y Ferragut Pérez, 2020).

Para la dispersión de la especie se producen en la colonia un cierto porcentaje de individuos alados. Los primordios alares aparecen en las ninfas de tercer estadio. El mecanismo que provoca la aparición de individuos alados en una colonia es de tipo endocrino, es decir, regulado por hormonas. El factor externo que determina la puesta en marcha de estos sistemas endocrinos es sobre todo la superpoblación y en ocasiones

también la calidad de alimento. Las temperaturas bajas pueden también favorecer la aparición de alados y se sabe que el contacto de las hormigas inhibe la aparición de alados (García Marí y Ferragut Pérez, 2020).

La mayoría de los pulgones presentan principalmente dos tipos de ciclos biológicos en función de si cambian de planta hospedadora para completar el ciclo. Existen especies monoicas, que completan el ciclo anual en una misma especie de planta o en plantas de especies botánicamente relacionadas, y especies dioicas, que, para completar su ciclo anual, necesitan cambiar de una especie de planta hospedadora a otra botánicamente distinta (García Marí y Ferragut Pérez, 2020).

Las especies monoicas son también holocíclicas, es decir, realizan el ciclo completo que consiste en una generación sexual que alternan con una o varias generaciones sucesivas partenogenéticas. En otoño-invierno tiene lugar la fase sexual, tras la cópula del macho (áptero o alado) con la hembra (áptera), éstas realizan las puestas de los huevos fecundados, los cuales permanecerán en un estado de diapausa como estrategia de supervivencia durante las condiciones climáticas desfavorables del invierno, hasta que llegue la primavera que es cuando tendrá lugar la eclosión de los huevos, de ellos emergen hembras ápteras, que producirán por partenogénesis sucesivas generaciones de hembras ápteras o aladas, las cuales estas últimas migrarán hacia otras plantas cercanas de la misma especie o especies botánicamente muy relacionadas para colonizarlas. En otoño, el cambio de fotoperiodo y la bajada de las temperaturas, desencadena una respuesta fisiológica en las hembras sexúparas, llamadas así porque dan lugar por partenogénesis a los individuos sexuados, estos son hembras ápteras y machos (ápteros o alados), los cuales se aparean y se repite el ciclo (Hardie, 2017; García Marí y Ferragut Pérez, 2020).

En el caso de las especies dioicas, la fase sexual y la puesta de huevos durante el invierno tiene lugar sobre plantas leñosas, denominadas hospedantes primarios y durante la primavera eclosionan los huevos apareciendo generaciones de hembras ápteras que producirán por partenogénesis primero hembras ápteras y luego aladas, las cuales son las encargadas de realizar las migraciones hacia plantas herbáceas, denominadas hospedantes secundarios. En el hospedador secundario se suceden durante el verano las generaciones de hembras partenogenéticas, ápteras o aladas, siendo estas últimas las encargadas de

realizar las migraciones hacia otras plantas de porte herbáceo, con el fin de dispersarse y evitar la competencia por el alimento. En otoño, los días más cortos y las temperaturas bajas inducen cambios hormonales en las poblaciones, apareciendo individuos alados que con sus vuelos migran de regreso a plantas leñosas (hospedador primario). En el hospedador primario tiene lugar la reproducción sexual y la puesta de huevos, repitiéndose así el ciclo, el cual suele durar un año, aunque en algunas especies dura dos años (Hardie, 2017; García Marí y Ferragut Pérez, 2020).

Las temperaturas suaves del invierno, los cultivos extensivos en zonas templadas y sobre todo los cultivos protegidos (invernaderos, túneles, mantas térmicas, etc.), han propiciado la pérdida de la fase sexual en casi todas las subfamilias de pulgones. Cuando esto sucede, la especie se reproduce durante todo el año, pero sólo por partenogénesis. Esto se conoce como estrategia anholocíclica. Ocurre tanto en especies monoicas como dioicas (García Marí y Ferragut Pérez, 2020).

#### 1.2.3. Selección y alimentación de plantas hospedantes.

Los pulgones alados son los encargados de emigrar buscando plantas hospedantes para colonizar. Experimentos de campo y túneles de viento muestran que estos insectos solo vuelan bien con vientos de baja velocidad (Kennedy y Thomas, 1974), pero, por el contrario, son capaces de permanecer en el aire durante muchas horas a la espera de ser transportados por el viento a largas distancias, esto ha sido estudiado con trampas de succión (Pettersson et al., 2017).

Se ha demostrado que tienen la capacidad de controlar su aterrizaje (Irwin et al., 2017). Localizan el material vegetal principalmente por el color, aunque también por el olor (Pettersson et al., 2017). Debido probablemente al proceso evolutivo, los individuos alados tienen los receptores olfativos de las antenas más desarrollados que los individuos ápteros. Estos receptores olfativos reciben el nombre de rinarios, en ellos se concentran proteínas de unión a olores (conocidas por sus siglas en inglés como OBPs, odorant binding proteins), las cuales participan en la percepción de olores en las antenas. Se ha demostrado mediante la técnica de electroantenografía (EAG) que los pulgones responden a una numerosa variedad de compuestos orgánicos volátiles (VOCs, volatile

organic compounds) de las plantas. Sin embargo, todavía no se conoce bien el papel de estos órganos olfativos en la interacción áfido-planta (Pickett et al., 2017).

Después del aterrizaje, comprueban si la planta hospedante es apta para ser colonizada, palpando la superficie de la planta con los quimiorreceptores de contacto que poseen en las antenas, tarsos y labios. Estos órganos sensoriales pueden detectar señales químicas no volátiles de la cutícula del tejido vegetal. Si les gusta y deciden quedarse, los pulgones eligen la parte óptima de la planta donde asentarse, generalmente muchas de las especies plaga prefieren el envés de las hojas tiernas de los brotes apicales, buscando protección contra los enemigos naturales y los factores climáticos, pero que también puedan disponer de un suministro alimentario de calidad y en cantidades suficientes para cubrir sus necesidades (Pettersson et al., 2017).

Seguidamente se disponen a probar y saborear la superficie de la hoja, para ello secretan saliva acuosa hacia la superficie de la planta que luego ingieren (Wensler, 1962; Wensler y Filshie, 1969). Todo ello activa los órganos gustativos del aparato bucal que detectan sustancias químicas solubles en las plantas desempeñando un papel fundamental en la selección de la planta hospedante. Se han localizado unas 100 células gustativas en el órgano del canal alimentario de los pulgones (Pettersson et al., 2017).

Si lo que han probado les gusta, pasan a la fase de alimentación. Mediante la técnica de gráficos de penetración eléctrica (EPG) se puede estudiar el comportamiento alimentario de insectos (McLean y Kinsey, 1964; Tjallingii, 1985). En el caso de los pulgones, durante la penetración del estilete desde la primera capa de la epidermis de las hojas hasta los vasos conductores de savia (floema y xilema), que son los tejidos objetivo, los pulgones realizan penetraciones cortas con el estilete tomando pequeñas muestras de los jugos intercelulares e intracelulares de la planta (Tjallingii y Hogen Esch, 1993; Miles, 1999; Tjallingii, 2006), en el momento en el que prueban la savia del floema es cuando realmente toman la decisión final sobre la aceptación o el rechazo de la planta hospedante, ya que es aquí donde comprueban la calidad gustativa y nutricional (Pettersson et al., 2017).

Se piensa que los pulgones son capaces de encontrar los tejidos conductores del floema guiándose por los cambios de pH, sacarosa y otros compuestos de las células que

perforan durante el recorrido del estilete. Esto sería posible ya que, en las células del floema, el pH y los niveles de sacarosa son altos, mientras que, en las células de la epidermis, del mesófilo y del parénquima vascular, son bajos (Pettersson et al., 2017).

Las actividades típicas en la fase de floema siempre comienzan con la excreción de savia hacia el tejido conductor y rápidamente comienza la ingestión. Los pulgones secretan dos tipos de saliva; uno forma la vaina del estilete, está compuesta principalmente por proteínas y ayuda en los movimientos del estilete y absorbe o inmoviliza las sustancias potencialmente tóxicas que la planta libera como respuesta del ataque, y el otro es de tipo acuoso y transporta un conjunto activo de enzimas. La savia del floema está encerrada a altas presiones en los vasos conductores, por lo que cuando el estilete perfora este tejido, la savia asciende por el canal alimentario del pulgón, mediante un proceso pasivo, es decir, sin esfuerzo para el pulgón (Prado y Tjallingii, 2007). Durante este proceso, los pulgones secretan saliva continuamente hacia la punta de los estiletes para evitar el bloqueo del canal alimentario. En condiciones ambientales estables, este período de alimentación del floema puede durar horas, e incluso muchos días, durante los cuales el pulgón perfora continuamente un solo tubo criboso del floema. En la fase de ninfa, la razón principal para retirar los estiletes será probablemente la muda al siguiente estadio (Pettersson et al., 2017).

Los estudios sobre el comportamiento alimentario sugieren que los pulgones controlan la ingestión de savia del floema regulando el período de ingestión en lugar de regulando el flujo de ingestión (Tjallingii, 1995). Por lo general, se considera que los pulgones se alimentan del floema, pero también se ha descubierto que ingieren savia del xilema, aunque en los pulgones, la ingestión de xilema no parece contribuir a la nutrición como tal, sino que debe considerarse como una ingesta de agua (Spiller et al., 1990). Cabe recordar, que por el xilema circula la savia bruta, la cual se forma en la raíz y se transporta al resto de la planta, tras la fotosíntesis se transforma en savia elaborada y se transporta por el floema de nuevo hasta las raíces, por esta razón, la composición de ambas varía, siendo la savia del floema más nutritiva que la savia del xilema. Además, a diferencia del proceso pasivo de ingestión de savia del floema, la savia del xilema está sometida a bajas presiones, por lo tanto, la succión de savia del xilema se considera un proceso activo por

lo que al pulgón le supone mucho esfuerzo tomar el agua de la savia del xilema (Pettersson et al., 2017).

El abandono de la planta lo realizan los individuos alados, se produce como resultado de una serie de cambios en la planta hospedante y de señales sociales relacionadas con la densidad de población de la colonia. Los aminoácidos, principales componentes nutricionales que los pulgones obtienen de las plantas, fluctúan según la parte de la planta, la edad o incluso del día a la noche. Estos cambios en la composición de la savia del floema pueden hacer que los pulgones dejen de alimentarse y retiren sus estiletes. Tanto la disminución en la cantidad o calidad del alimento como la superpoblación promueven la liberación de señales hormonales que avisan a la colonia de la necesidad de cambiar de planta hospedante y con ello la aparición de individuos provistos de alas (Douglas y van Emden, 2017).

#### 1.2.4. Daños y síntomas.

Los pulgones son un serio impedimento para la producción mundial de alimentos, aunque algunos cultivos resultan más dañados que otros, todos los cultivos en el mundo son atacados por al menos una especie de pulgón (Quisenberry y Ni, 2017). Los daños que causan debido a su alimentación pueden ser directos, que se traducen en lesiones en los tejidos vegetales e indirectos ya que son vectores de virus (García Marí y Ferragut Pérez, 2020).

Los síntomas fácilmente visibles derivados de los daños directos son manchas necróticas, decoloración, cese o retraso del crecimiento, malformaciones de hojas y frutos, producción de agallas, todo ello son resultado del mecanismo de defensa de las plantas frente al ataque de los pulgones y como consecuencia se traduce en un debilitamiento de las plantas y la consiguiente reducción del rendimiento productivo (Quisenberry y Ni, 2017).

De manera indirecta, la expulsión del exceso de carbohidratos, que contiene la savia del floema, en forma de melaza o cera corporal, ensucia las plantas, provoca la posterior aparición de hongos, lo que se conoce como negrilla o fumagina y como consecuencia se reduce la capacidad fotosintética de la planta y la depreciación comercial

de la cosecha. Además, se establece una relación de mutualismo con las hormigas, estas defienden a los pulgones de sus depredadores y parasitoides, y propagan las colonias para obtener mayor cantidad de melaza. Aunque en otras veces las hormigas pueden depredar a los pulgones (García Marí y Ferragut Pérez, 2020).

Por otro lado, también de manera indirecta, los pulgones son vectores de virus fitopatógenos que causan enfermedades de gran importancia económica en los cultivos (Hull, 2002). La mayoría de los pulgones vectores de virus pertenecen a los géneros *Myzus*, *Aphis*, *Acyrtosiphon* y *Macrosiphum* (Kennedy et al., 1962). Los virus transmitidos por pulgones pertenecen a 19 de los 70 géneros de virus fitopatógenos reconocidos y comprenden aproximadamente 275 especies de virus que afectan a las plantas (Nault, 1997). Un ejemplo de virus transmitidos por pulgones tanto en el cultivo de pimiento como en melón es el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV, género *Cucumovirus*), transmitido de manera no persistente. En pimiento también transmiten de forma no persistente el virus Y de la patata (*Potato virus Y*, PVY, género *Potyvirus*). En melón, el virus del mosaico amarillo del calabacín (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMC, género *Potyvirus*) y los virus del mosaico de la sandía (*Potyvirus citrulli*, WMV y *Watermelon mosaic virus 1*, PRSV-W, género *Potyvirus*) de forma no persistente. Ejemplos de virus transmitidos por pulgones de manera persistente son el virus de las venas amarillas del pimiento (*Pepper vein yellows virus*, PeVYV, género *Polerovirus*) que afecta al pimiento y el virus del amarilleo de las cucurbitáceas (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV, género *Polerovirus*) que afecta al melón (Pérez et al., 1992; Juárez et al., 2004; Melgarejo Nárdiz et al., 2010; Juárez et al., 2013; Martín Gil et al., 2021; Font-San Ambrosio et al., 2023; Romero Cuadrado et al., 2023).

#### 1.2.5. Control.

Los pulgones tienen numerosas especies de enemigos naturales, tanto depredadoras como parasitoides, algunos de ellas muy específicos, actuando solo sobre determinadas especies de pulgones. Entre los parasitoides destacan los himenópteros braconídeos como *Aphidius colemani* Viereck o *A. ervi* Haliday, indicado para el control de especies de pulgones de pequeño tamaño como *A. gossypii* o *M. persicae*, mientras que *Aphidius matricariae* Haliday y *Ephedrus cerasicola* Stary y el himenóptero afelinido *Aphelinus abdominalis* Dalman, son más indicados para el control de especies de

pulgonos de gran tamaño como *A. solani* o *M. euphorbiae*. Todas estas especies también pueden parasitar individuos de *M. persicae*. Mención especial merece el himenóptero braconido *Praon volucre* (Haliday) que parasita tanto a las especies de pulgón de gran tamaño como a las de menor tamaño (Montserrat Delgado et al., 2012).

En el sureste español, los pulgonos proliferan en otoño y primavera y los enemigos naturales son más abundantes en verano, por lo que una estrategia interesante para favorecer la presencia de fauna auxiliar en las parcelas, antes de que comiencen los ataques del pulgón sobre el cultivo, es la implementación de estrategias de control biológico por conservación, esto consiste en la plantación de setos o islas de biodiversidad alrededor de las parcelas o asociadas junto a las líneas de cultivo. Las especies vegetales seleccionadas para este fin deberán ofrecer algún tipo de alimento alternativo (presas, néctar, polen, etc.) en las que puedan mantenerse las poblaciones de enemigos naturales en los momentos en los que no hay pulgonos en los cultivos (García Marí y Ferragut Pérez, 2020). Una práctica muy extendida es la instalación de bankers o reservorios, que consiste en la siembra de alguna gramínea, normalmente cebada (*Hordeum vulgare* L.), ya sea en macetas o mediante siembra directa junto a las líneas o filas de plantas. Sobre los bankers se realizarán inoculaciones de pulgonos específicos de las gramíneas como son *R. padi* de pequeño tamaño, o *Sitobion avenae* Fabricius, de mayor tamaño. Sobre estas poblaciones de pulgonos se realizarán las sueltas de los parasitoides, que parasitarán a los pulgonos del cereal, para posteriormente actuar sobre los pulgonos que pudieran llegar al cultivo y ayudar en el control (Montserrat Delgado et al., 2012).

En cuanto a los depredadores destacan los coleópteros coccinélidos *Coccinella septempunctata* Linnaeus, *Hippodamia variegata* (Goeze) o *Scymnus nubilus* Mulsant, las larvas de los dípteros como el cecidómido *Aphidoletes aphidimyza* (Rondani) o los sírfidos *Sphaerophoria rueppellii* (Wiedemann) o *Eupeodes corollae* (Fabricius) y los neurópteros *Chrysoperla carnea* (Stephens) y *Micromus angulatus* (Stephens) (Montserrat Delgado et al., 2012). También hay algunos hongos entomopatógenos como *Akanthomyces lecanii* (Zimmermann) Spatafora, Kepler y B. Shrestha (García Marí y Ferragut Pérez, 2020).

Los pulgonos se multiplican con una extraordinaria rapidez y aparecen en las primeras etapas del cultivo, el problema está cuando las condiciones climáticas son

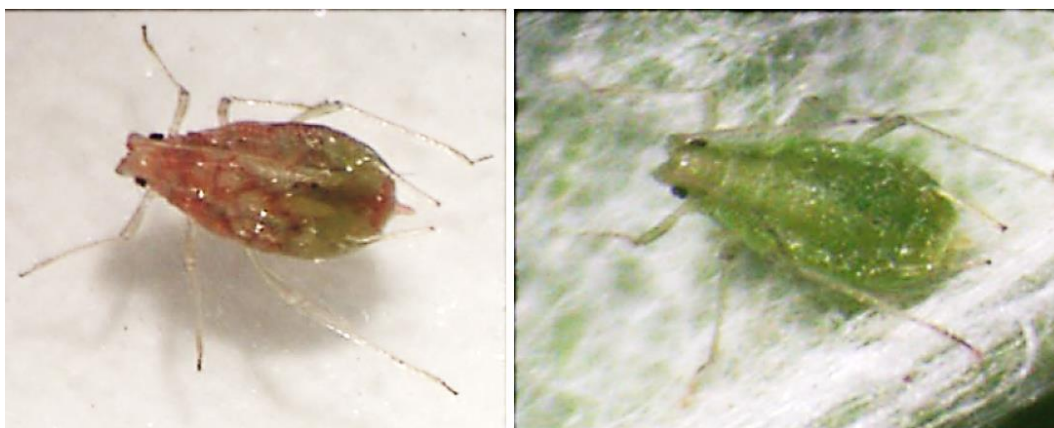
favorables para el desarrollo de la plaga, pero no tanto para la instalación de los enemigos naturales, lo cual dificulta el control biológico de la plaga. Por ello, es fundamental anticiparse al problema o realizar tratamientos fitosanitarios puntuales que frenen su desarrollo (Monserrat Delgado et al., 2012). Algunas de las materias activas autorizadas en el Registro de Productos Fitosanitarios (MAPA, 2024b) para el control de áfidos tanto en el cultivo de pimiento como en melón son: piretrinas y azadiractina ambas de origen vegetal o insecticidas de síntesis entre los que se encuentran los piretroides como deltametrina o lambda cihalotrina, o los neonicotinoides como acetamiprid, entre otros.

#### 1.2.6. *Myzus persicae* (Sulzer).

En este apartado se va a describir más detalladamente la especie de pulgón *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), por ser una de las especies objetivo de esta tesis.

*M. persicae* fue citado por primera vez por Sulzer en 1776, tiene su origen probablemente en Asia, como su principal hospedador primario, el melocotonero (*Prunus persica* (L.) Batsch), por ello se conoce como el pulgón verde del melocotonero, aunque es una especie muy polífaga y cosmopolita. Mundialmente se ha encontrado en más de 875 especies de plantas, en España se ha citado en más de 100 especies vegetales y produce importantes daños tanto en frutales de hueso del género *Prunus* sp., como melocotonero y almendro, así como en diversas hortalizas como patata, crucíferas, remolacha, tabaco, berenjena, pimiento, melón, etc. (García Marí y Ferragut Pérez, 2020; CABI, 2022a). Es considerado el pulgón vector de virus más importante, puesto que es capaz de transmitir más de 300 virus de plantas (Moreno Lozano, 2005).

Su tamaño es de 1,2-2,1 mm (Figura 4), de color muy variable, desde tonalidades verdes hasta rojizas en las ninfas y adultos ápteros. Los adultos alados tienen coloraciones negruzcas en la cabeza, tórax y una mancha negra central en el dorso del abdomen. Los tubérculos frontales de la cabeza son pronunciados y convergentes. Los sifones son casi tan largos como el proceso terminal de la antena y algo dilatados, en algunos casos el extremo de los sifones puede ser oscuro (García Marí y Ferragut Pérez, 2020; CABI, 2022a).



**Figura 4. Individuos ápteros de *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Izquierda: clon rosa. Derecha: clon verde.**

Las razas dioicas holocíclicas tienen al melocotonero y a otras especies del género *Prunus* sp., como hospedadores primarios. Y a un gran número de plantas herbáceas como brasicáceas, cucurbitáceas, solanáceas, fabáceas, asteráceas, poáceas, ciperáceas, apiáceas, etc., como hospedadores secundarios. En zonas frías, pasa el invierno en estado de huevo en el hospedante primario. Las puestas son depositadas con preferencia en ramas tiernas y axilas de yemas de las plantas leñosas. La eclosión se inicia en febrero y aparecen las hembras fundadoras que son vivíparas y partenogénicas. En las brotaciones de los hospedadores primarios se suceden generaciones de individuos ápteros y alados, siendo estos últimos los que emigran gradualmente de abril a junio hacia el hospedador secundario. Durante el verano se suceden varias generaciones en las plantas herbáceas. El vuelo de retorno al hospedador primario se realiza en septiembre, lo realizan hembras y machos y se repite el ciclo (García Marí y Ferragut Pérez, 2020; CABI, 2022a).

En regiones templadas hay razas holocíclicas y otras sin reproducción sexual o anholocíclicas que pasan el invierno en el hospedador secundario, generalmente plantas herbáceas. En España hay una raza anholocíclica que ataca ocasionalmente a los cítricos como hospedantes secundarios. La existencia de estos clones anholocíclicos es considerada como un factor que favorece la aparición de resistencias (García Marí y Ferragut Pérez, 2020; CABI, 2022a).

#### 1.2.7. *Aphis gossypii* Glover.

*Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae), es la otra especie de la que trata esta tesis doctoral. Fue citado por primera vez en 1877 por Glover, se le conoce como el

pulgón del algodón o el pulgón del melón. Es de pequeño tamaño, los adultos miden entre 1 y 1,5 mm de longitud y poco más de 0,34 mm de diámetro. Su coloración puede variar (Figura 5) desde amarillo hasta verde muy oscuro (casi negro), a menudo tiene una apariencia manchada con algunas partes verdosas y otras más amarillas. Los individuos en los que predomina la coloración amarilla suelen ser de menor tamaño y aparecen durante las condiciones más cálidas del verano con altos niveles poblacionales, mientras que los de coloración verde son más grandes y aparecen durante las temperaturas más frías de primavera y otoño y en condiciones de poca densidad poblacional. Las hembras de un color pueden producir descendencia de otro color en función de las condiciones ambientales. La planta hospedante también puede influir en el color del pulgón. Los individuos alados tienen la cabeza y el tórax de color negro. Los cornículos o sifones siempre son más largos y oscuros que la cauda, están uniformemente esclerotizados y se estrechan gradualmente desde la base hasta una pequeña dilatación en el extremo del sifón. La cauda suele tener de 4 a 7 pelos y es más pálida que los cornículos. Los tubérculos antenales están débilmente desarrollados. Las antenas son amarillas con la parte terminal oscura y las patas amarillas con el extremo del tarso y fémur oscuros (García Marí y Ferragut Pérez, 2020; CABI, 2022b).



**Figura 5. Colonia de *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae).**

Está distribuido mundialmente, se adapta a diferentes condiciones climatológicas, presenta una rápida y fácil propagación debido a su elevada tasa de reproducción, es una especie extremadamente polífaga y muy dañina para muchos cultivos económicamente

importantes. La especie *A. gossypii* engloba varios biotipos o razas adaptadas para vivir en diferentes plantas hospedadoras ya sean cultivadas, ornamentales o espontáneas de diferentes zonas geográficas. Los cultivos donde suele ocasionar más daños son algodón, cucurbitáceas (como melón), solanáceas (como pimiento) y cítricos. El daño económico causado por *A. gossypii* se debe a la alimentación directa, la excreción de melaza donde se desarrolla la negrilla y la transmisión de más de 50 tipos de virus, siendo esto último la razón de su mayor impacto económico general. Además, es una de las especies que presenta más resistencias a los plaguicidas, junto con *M. persicae*.

Su reproducción es mayoritariamente asexual por partenogénesis tanto en formas aladas como ápteras. En ambientes más cálidos, *A. gossypii* exhibe un ciclo de vida anholocíclico (solo se reproduce por partenogénesis), mientras que en áreas más frías exhibe un ciclo de vida tanto monoico holocíclico (reproducción sexual y asexual sobre el mismo hospedante), como dioico holocíclico (con dos migraciones, una en la primavera del hospedante de invierno al hospedante de verano donde se reproduce asexualmente y una segunda migración en otoño de regreso al hospedante de invierno para poner huevos como resultado de la reproducción sexual) (CABI, 2022b). En España se considera que solo existen razas dioicas anholocíclicas, aunque en la misma zona geográfica pueden darse distintos ciclos de vida. Esta especie tiene como hospedadores primarios a la catalpa común o árbol indio (*Catalpa bignonioides*, Walter) y al hibisco o rosa de Siria (*Hibiscus syriacus* L.) y aunque está adaptada a vivir en una asociación de plantas hospedadoras, no suele ocurrir que varias líneas convivan en la misma planta hospedadora (García Marí y Ferragut Pérez, 2020).

### **1.3. Pimiento (*Capsicum annuum* L.).**

#### **1.3.1. Origen y difusión.**

El pimiento (*Capsicum annuum* L.), pertenece a la familia de las solanáceas. Es originario del área andina de Bolivia, Perú y Ecuador, desde donde se expandió al resto del continente americano (Maroto Borrego, 2002; Reche Marmol, 2010). Cristóbal Colón trajo los primeros pimientos a España en 1493, éstos eran picantes, por lo que debido a su similitud en el sabor con la pimienta (tan apreciada en aquella época) se le dio el nombre de pimiento. Pronto tuvieron una gran acogida y su cultivo se extendió a lo largo

del siglo XVI por otros países de Europa, Asia y África. A finales del siglo XIX, llegaron desde México variedades menos picantes obtenidas a partir de variedades silvestres, las cuales fueron seleccionándose por sucesivas hibridaciones hasta conseguir pimientos con menos cantidad de capsaicina comenzando así el cultivo del pimiento de una forma general en España (Nuez et al., 1996; Reche Mármol, 2010).

### 1.3.2. Importancia económica y distribución geográfica.

Según las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), correspondientes al año 2022, la producción mundial de pimiento alcanzó cerca de 37 millones de toneladas, siendo China el principal productor mundial con aproximadamente el 45,5% (16,8 millones de t) de la producción mundial. España ocupa la quinta plaza con poco más de 1,5 millones de t, lo que supone el 4,15% de la producción mundial, solo por detrás de países como México, Indonesia y Turquía (FAOSTAT, 2024). Cerca del 8% (115.700 t) de la producción nacional de pimiento se produce en Agricultura Ecológica (CREM, 2023).

A nivel nacional, según los datos más actualizados del Anuario de Estadística del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), correspondiente al año 2022, la producción de pimiento se concentra en el sureste español: Almería produce un 64% del total nacional (979.894 t), seguida de Murcia con 197.436 t (13% del total nacional), Granada con 47.018 t (3% nacional) y Alicante con 28.450 t (1,86% total nacional) (MAPA, 2024a).

### 1.3.3. El cultivo del pimiento en la Región de Murcia.

Según las estadísticas agrarias autonómicas de la Región de Murcia correspondientes al año 2022, el pimiento es el sexto cultivo más importante en producción, por detrás de brócoli, tomate, melocotón, lechuga y limón (CREM, 2023). Las variedades de pimiento más cultivadas son los tipos de carne gruesa California y Lamuyo, ambas comercializadas en coloración verde, rojo y amarillo. También se cultivan variedades de tipo italiano y bola, utilizado para la producción de pimentón bajo la DOP Pimentón de Murcia (Pérez Hernández et al., 2023). El ciclo de cultivo comienza en septiembre y octubre con la germinación de semillas y siembra en semilleros

especializados. El trasplante en campo hacia noviembre y diciembre. Y se recolectan desde marzo hasta agosto (López Marín et al., 2017; Jaudenes Piferrer, 2021). Según los datos del Anuario de Estadística del MAPA correspondientes al año 2022, en la Región de Murcia hay un total de 1.745 ha dedicadas al cultivo del pimiento, todas ellas en regadío y la mayoría (82%; 1.428 ha) se cultiva en invernadero. Los rendimientos productivos en regadío y cultivo protegido (121.500 kg/ha) son 1,6 veces mayores que en regadío al aire libre (MAPA, 2024a). El 75% (1.312 ha) de la superficie de pimiento cultivada en la Región de Murcia se encuentra en la comarca del Campo de Cartagena (Pérez Hernández et al., 2023). En cuanto a la producción de pimiento en Agricultura Ecológica en la Región de Murcia, hay 474,6 ha (27% de la superficie de pimiento total autonómica) que producen 36.520 t de pimiento, lo que supone un 18% de la producción de pimiento a nivel autonómico y un 32% de la producción de pimiento ecológico a nivel nacional (CREM, 2023).

Antiguamente en esta comarca, los agricultores producían pimiento tipo bola para pimentón. Con la construcción de los primeros invernaderos en la zona a partir de 1970 y la llegada del agua procedente del Trasvase Tajo-Segura en 1980, el pimiento para pimentón fue sustituido por pimientos de carne gruesa y con ello, aumentó la incidencia de plagas y enfermedades. Respecto a esto, conviene destacar, por un lado, la introducción del trips occidental de las flores, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) y la transmisión del virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV, género *Tospovirus*) en la campaña 88-89 y, por otro lado, la aparición como plaga de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) a principios de los 90. La incidencia de ambas plagas fue tal, que las medidas preventivas como el uso de material vegetal sano, eliminación de material vegetal contaminado y colocación de mallas en las aberturas del invernadero fueron insuficientes. Además, las reiteradas y frecuentes aplicaciones de tratamientos fitosanitarios provocaron la aparición de resistencias, por lo que el control químico no era eficaz y suponía un riesgo medioambiental debido a la acumulación de residuos de fitosanitarios en las plantas al límite de los niveles autorizados, conjuntamente se originó una situación insostenible dadas las limitaciones para organizar las recolecciones debido a los plazos de seguridad que había que respetar (Lacasa, 2021).

Ante este panorama, la puesta a punto de soluciones por medios biológicos se planteaba como herramienta para garantizar una estabilidad en el control a lo largo del ciclo del cultivo. Entre 1990 y 1997 se realizaron sueltas de enemigos naturales para el control de *F. occidentalis* y *B. tabaci*, tomando como referencia los trabajos desarrollados en los Países Bajos, los mejores resultados se obtuvieron con especies autóctonas, que se asociaban al cultivo de forma natural, como los antocóridos *Orius laevigatus* (Fieber) y *O. albidipennis* Reuter y los ácaros fitoseidos *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot y *Neoseiulus cucumeris* (Oudemans), dentro del grupo de depredadores, pero también parasitoides de moscas blancas como la especie autóctona *Eretmocerus mundus* Mercet o la importada *E. eremicus* Rose & Zolnerowich. Así surgió la producción integrada como elemento de identidad de las producciones del Campo de Cartagena y que en la actualidad se sigue practicando (Lacasa, 2021).

#### **1.4. Melón (*Cucumis melo* L.).**

##### **1.4.1. Origen y difusión.**

No se conoce con certeza el origen del cultivo de esta cucurbitácea. Algunos botánicos sitúan el origen del melón (*Cucumis melo* L.) en el sureste de África, mientras que para otros procede del continente asiático, siendo esta última hipótesis, al parecer, la menos probable, aunque en Asia existen varias zonas (India, China y Afganistán) con altísima variabilidad genética y varietal. Se ha supuesto que los antiguos egipcios ya conocían este cultivo, aunque no existe una total certeza. Posiblemente fue domesticado en Egipto y Abisinia (actual Etiopía y Eritrea) en torno al 2000 a. C., llegando a Extremo Oriente en torno al 800 a. C. (Maroto Borrego, 2002; Reche Marmol, 2008). Su introducción en Europa parece ser que tuvo lugar por parte de los cartagineses durante el imperio romano, ya que en aquella época era el único puerto del Mediterráneo occidental que comercializaba con Oriente (CARM, 2015), luego desapareció como cultivo a lo largo de la primera fase de la Edad Media para ser reintroducido posteriormente en la Península Ibérica por los árabes. Durante el siglo XV llegó a Francia desde Italia y fue llevado por Cristóbal Colón a América en uno de sus viajes (Maroto Borrego, 2002; Reche Marmol, 2008).

El melón es una planta cuyos frutos son consumidos principalmente en fresco, siendo también utilizados para la elaboración de dulces, conservas y confitados. En determinados países asiáticos se consumen sus semillas y de ellas se puede extraer un aceite apto para el consumo humano (Maroto Borrego, 2002).

#### 1.4.2. Importancia económica y distribución geográfica.

Según las estadísticas de la FAO correspondientes al año 2022, la producción mundial de melón fue de 28,5 millones de t. China es el país que produce prácticamente la mitad (49,73%) de la producción mundial de melón con algo más de 14,2 millones de t. Le siguen países como Turquía, India o Kazajistán, en los que se produce el 15% del melón a nivel global. España ocupa la decimocuarta plaza con poco más de 520.000 t, lo que supone el 1,83% de la producción mundial, por delante se sitúan países como EEUU, México, Italia, Bangladesh, Brasil, Irán, Guatemala y Afganistán (FAOSTAT, 2024). Poco más del 4% (21.443 t) de la producción española de melón se produce en Agricultura Ecológica (CREM, 2023).

A nivel nacional, según los datos correspondiente al año 2022, del Anuario de Estadística del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Murcia lidera la producción española de melón con 171.744 t, lo que supone casi un 33%, seguida de Ciudad Real con 124.700 t (casi el 24% del total nacional), Almería (94.776 t, 18%) y Alicante (25.487 t, 4,9%). En España, el sistema de cultivo de melón que predomina es el regadío al aire libre, salvo en Almería, Valencia y Granada donde predomina el cultivo de melón protegido (MAPA, 2024a).

#### 1.4.3. El cultivo del melón en la Región de Murcia.

Según los datos del Anuario de Estadística del MAPA correspondientes al año 2022, en la Región de Murcia hay 4.609 ha de melón, de las cuales el 97% (4.469 ha) se cultivan en regadío al aire libre (MAPA, 2024a) y el 62% (2.868 ha) se cultiva en la comarca del Campo de Cartagena. El melón es el noveno cultivo más importante en producción, según las estadísticas agrarias autonómicas de la Región de Murcia correspondientes al año 2022. Hay 230 ha inscritas en Agricultura Ecológica, lo que supone un 5% de la superficie destinada al cultivo del melón, y producen 8.570 t de

melón, que es un 5% de la producción total de melón en la Región de Murcia. A nivel nacional, un 40% de la producción total de melón se cultiva mediante Agricultura Ecológica (CREM, 2023). Los ciclos de cultivo se inician con el trasplante en febrero pudiendo llegar hasta junio, cosechándose los primeros frutos de las variedades más tempranas en junio, alargándose la producción durante los meses de verano hasta septiembre (Jaudenes Piferrer, 2021). En cuanto a las variedades, el 47% de la superficie se destina a variedades como Cantalupo, Galia o Charentais y el 53% de la superficie restante la ocupan variedades de piel lisa como Amarillo, Tendral o Piel de Sapo, la cual tiene su propia Indicación Geográfica Protegida “Melón de Torre Pacheco-Murcia” (Pérez Hernández et al., 2023).

El vínculo del cultivo del melón con su zona geográfica se basa en la reputación obtenida en el mercado nacional e internacional debido a la apreciada calidad de los frutos, por su dulzor y la firmeza de su pulpa. Esto se debe fundamentalmente a los factores climáticos y edafológicos del medio geográfico, con escasa pluviometría durante el periodo de maduración, junto con las buenas prácticas de cultivo que tradicionalmente realizan los agricultores. La repercusión social, reflejo del arraigo cultural asociado a la reputación de este producto, se demuestra con la celebración de las “Fiestas del melón de Torre Pacheco”, que se celebran desde 1969 (CARM, 2015).

### **1.5. Enfermedades y plagas en pimiento y melón y métodos de control.**

Según la FAO (2021), las enfermedades y plagas agrícolas son responsables de hasta el 40% de pérdidas de la producción mundial de cultivos alimentarios, y de pérdidas en el comercio de productos agrícolas por valor de unos 206.000 millones de € cada año a nivel mundial.

#### **1.5.1. Enfermedades.**

- VIRUS:

Los virus vegetales son parásitos intracelulares que necesitan infectar células hospedantes sanas para multiplicarse. Como por si solos son incapaces de penetrar la epidermis de las plantas, los virus han desarrollado diversas estrategias de transmisión

como la transmisión por inoculación mecánica, por contacto entre plantas y/o por semilla (Moreno Lozano, 2005).

- Pimiento:

Ejemplos de este tipo que afectan al pimiento son los que pertenecen al género *Tobamovirus* como el virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV), el virus del mosaico verde atenuado del tabaco (*Tobacco mild green mosaic virus*, TMGMV) el virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV), el virus del mosaico moteado del tomate (*Tomato mottle mosaic virus*, ToMMV), el virus del moteado atenuado del pimiento (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) o el virus del fruto rugoso marrón del tomate (*Tomato brown rugose fruit virus*, ToBRFV), entre otros (Melgarejo Nárdiz et al., 2010; EPPO, 2024).

- Melón:

En el caso del cultivo del melón algunos ejemplos de virus que se transmiten por inoculación mecánica, por contacto entre plantas y/o por semilla son el virus del mosaico verde jaspeado del pepino (*Tobamovirus viridimaculae*, CGMMV, *Tobamovirus*), el virus del mosaico de la calabaza (*Comovirus cucurbitae*, SqMV, *Comovirus*) (Melgarejo Nárdiz et al., 2010; EPPO, 2024) o el virus de las manchas necróticas del melón o virus del cribado del melón (*Gammacarmovirus melonis*, MNSV, *Gammacarmovirus*), virus implicado en la enfermedad de etiología compleja del “colapso o muerte súbita del melón” y transmitido por semilla, aunque su presencia y extensión está ligada a la presencia del hongo *Olpidium bornovanus* (Sahtiyanci) Karling (Font-San Ambrosio et al., 2023).

Pero la estrategia que predomina entre los virus vegetales para dispersarse de un hospedador a otro es la transmisión mediante insectos vectores (Hull, 2002), aunque solo aquellos que cumplan ciertos requerimientos de compatibilidad con el vector serán transmitidos exitosamente (Power, 2000). La transmisión por parte de un vector consta de cuatro fases: adquisición, cuando los estiletes perforan las células del tejido vegetal infectado; latencia, tiempo que ha de pasar para que el vector sea capaz de transmitir el virus; retención, circulación de viriones (partículas de virus completas con una cubierta

proteica y el núcleo de ARN o ADN) en el organismo del insecto e inoculación, liberación de viriones a una planta sana durante las punciones intracelulares de los estiletes (Moreno Lozano, 2005; Katis et al., 2017). En las plantas recién inoculadas, los viriones se multiplican en las células y eventualmente se vuelven sistémicos propagándose a través del floema e infectando a toda la planta (Carrington et al., 1996).

Según los tiempos de adquisición e inoculación por el vector, la transmisión se divide en tres categorías: no persistente, cuando la adquisición e inoculación ocurre tras una punción del estilete muy breve (menos de 1 min); semipersistente, cuando la adquisición e inoculación requieren tiempos de prueba o alimentación de más de 15 minutos ininterrumpidamente. En estos casos, los vectores mantienen su eficacia transmisora hasta 2 días después de la adquisición. Por último, están los virus persistentes, cuando la adquisición e inoculación requieren periodos largos de alimentación (desde horas a días), en estos casos los vectores son capaces de transmitir el virus el resto de su vida. Los virus persistentes son también conocidos como circulativos ya que, tras ser ingeridos, pasan a través del intestino hacia el sistema circulatorio y de ahí a las glándulas salivales transmitiéndose a través del canal salival. Por el contrario, los virus no persistentes y semipersistentes son no circulativos porque no atraviesan las membranas celulares del vector, sino que permanecen adheridos en el revestimiento cuticular de los estiletes y las paredes del tracto digestivo (Moreno Lozano, 2005; Katis et al., 2017).

En el apartado 1.2.4. se han citado algunos ejemplos de virus no persistentes o persistentes transmitidos por pulgones en pimiento y melón y en el apartado 1.5.2. se citarán otros virus transmitidos por otras plagas en estos cultivos.

El control directo de las enfermedades virales no es posible, se pueden emplear medidas preventivas como el uso de material vegetal sano o resistente, el control de malas hierbas, la eliminación de plantas enfermas y el cumplimiento riguroso de las medidas de higiene, así como la revisión de los cerramientos, pueden desempeñar un papel importante en la reducción de la propagación de virus y permiten cierto grado de control, pero para conseguir un control efectivo hay que integrar herramientas de control biológico y/o químico de vectores, ya que la adopción de un solo método suele ser insuficiente (Katis et al., 2017).

La sintomatología es diversa, desde clorosis, amarillos y manchas sobre las hojas, enanismo de la planta, reducción del tamaño de frutos, caída y malformaciones en hojas y frutos, decoloraciones, etc., hasta llegar a producir la muerte de la planta (Melgarejo Nárdiz et al., 2010; Martín Gil et al., 2021; Romero Cuadrado et al., 2023).

○ BACTERIAS:

Entre las bacterias que pueden causar enfermedades en pimiento y melón destacan: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al., conocida como podredumbre blanda que suele iniciarse en la zona del cuello de la planta; las especies del género *Pseudomonas* sp., producen necrosis en la médula de los vasos conductores, manchas oscuras en tallo y clorosis de las hojas jóvenes; las especies del género *Xanthomonas* sp., producen manchas necróticas con halo blanco amarillento en hojas, necrosis marginales y defoliación, pústulas pardas en fruto y exudados amarillentos (Melgarejo Nárdiz et al., 2010; Martín Gil et al., 2021; Romero Cuadrado et al., 2023).

- Pimiento:

Algunas especies de bacterias que afectan al pimiento son (Melgarejo Nárdiz et al., 2010; Martín Gil et al., 2021):

- *Pseudomonas corrugata* Roberts y Scarlett y *P. mediterranea* Catara, Sutra, Morineau, Achouak, Christen y Gardan.
- *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Vauterin, Hoste, Kersters y Swings, conocida como mancha o sarna bacteriana; *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn, causa tumores debidos a la superproducción de auxinas y citoquininas que originan hipertrofia e hiperplasia de las células vegetales del cuello y raíces, pero también en la parte aérea, aunque con menor frecuencia.
- *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al., conocida como chancro bacteriano, produce marchitez vascular, chancros en tallo, manchas oscuras y quemaduras marginales en hojas y manchas en frutos en forma de ojo de pájaro u “ojo de perdiz”.

- Melón:

Y algunas bacterias que afectan al melón son (Melgarejo Nárdiz et al., 2010; Romero Cuadrado et al., 2023):

- *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (Brown & Jamieson) Young, Dye y Wilkie y *P. syringae* pv. *lachrymans* (Smith & Bryan) Young, Dye y Wilkie.
- *Xanthomonas cucurbitae* (Bryan) Vauterin, Hoste, Kersters y Swings, conocida como mancha o bacteriosis de las cucurbitáceas.

Todas ellas se transmiten principalmente por salpicaduras de agua, el viento, a través del material vegetal y por malas prácticas de higiene de herramientas y operarios. La entrada del patógeno se produce por pequeñas aberturas en el tejido vegetal del tallo o las hojas (Melgarejo Nárdiz et al., 2010; Martín Gil et al., 2021; Romero Cuadrado et al., 2023), por lo que para su prevención se recomienda evitar la presencia de agua libre en el suelo y en contacto con el cuello de las plantas, utilizar semillas y material vegetal sano procedente de viveros o semilleros autorizados, eliminar plantas infectadas y restos vegetales y desinfectar las herramientas de trabajo antes y después de su uso (Martín Gil et al., 2021). En el Registro de Productos Fitosanitarios (MAPA, 2024b) está autorizado el uso de hidróxido cúprico y oxicloruro de cobre, para el cultivo de pimiento y melón, como bactericida.

○ HONGOS:

Ejemplos de especies de hongos que atacan a ambos cultivos de pimiento y melón son (Melgarejo Nárdiz et al., 2010; Martín Gil et al., 2021; Romero Cuadrado et al., 2023):

- *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough, conocido como mal del esclerocio. La infección comienza por la parte baja de la planta, produce podredumbre de cuello donde se observa un micelio blanco y sobre él corpúsculos esféricos (esclerocios) que desemboca en marchitez del hospedante.
- Los hongos del género *Alternaria* sp., siendo la especie *A. solani* Sorauer la que afecta a pimiento, cuyos síntomas son anillos concéntricos de tonalidad parda

oscura y superficie arrugada y rodeadas por zonas amarillas y *A. cucumerina* (Ellis & Everhart) Elliott que afecta al melón, produciendo inicialmente pequeñas lesiones color crema en las hojas, con un borde verde oscuro y acuoso y que posteriormente toman color marrón oscuro y crecen hasta confluir y secar por completo las hojas. Es también capaz de causar daños al fruto.

- *Botrytis cinerea* Persoon, conocido también como podredumbre o moho gris por sus síntomas característicos.
- *Sclerotinia sclerotiorum* (Libert) de Bary, causa la denominada podredumbre blanda, la zona afectada se cubre de un abundante micelio algodonoso de color blanco al principio y posteriormente negro que a menudo exudan gotitas de líquido.
- La enfermedad conocida como oídio u oidiopsis, es común en ambos cultivos, pero las especies de hongo son distintas, la que afecta al pimiento es *Leveillula taurica* (Léveille) G. Arnaud, y las que atacan al melón son *Podosphaera fusca* (Fries) Braun & Shishkov, *Podosphaera fuliginea* (Schlechtendahl) U. Braun y S. Takamatsu y *Golovinomyces cichoracearum* (de Candolle) Heluta, los síntomas se observan entre las nerviaciones de las hojas como resultado de la emergencia de las conidias que son manchas pulverulentas con aspecto de ceniza (otro de sus nombres comunes) rodeadas de un halo amarillo que se necrosan rápidamente por el centro.

- Pimiento:

Algunos hongos que afectan sólo al cultivo del pimiento son (Melgarejo Nárdiz et al., 2010; Lacasa, C.M., 2013; Martín Gil et al., 2021):

- *Verticillium dahliae* Klebahn, comúnmente llamado verticiliosis. El hongo, que penetra por las raíces o por heridas, llega hasta el xilema y la savia transporta los conidios al resto de la planta. El sistema vascular puede verse dañado, afectando a la distribución del agua y los nutrientes, como sintomatología inicial se observa una flacidez acusada que puede convertirse en marchitez permanente. Sólo cuando está en una fase muy avanzada de la enfermedad se produce un crecimiento del hongo fuera de

los tejidos vasculares. Sobre las hojas se observa una clorosis progresiva que avanza de abajo hacia arriba. En casos de infección grave se produce la muerte de la planta.

- *Phytophthora capsici* Leonian y *P. nicotianae* var. *parasitica* (Dastur) Waterhouse causantes de la tristeza o seca del pimiento. La invasión se extiende desde las raíces o el cuello, mostrando una marchitez de la planta en poco tiempo e irreversible hasta que ésta muere. En semillero y trasplante produce marchitamiento, podredumbre de cuello y/o raíz y decaimiento de las plantas. En las raíces se produce una podredumbre con engrosamiento y chancro en la parte del cuello. En los frutos de la parte baja de la planta se pueden producir podredumbres debido a las salpicaduras de agua con tierra contaminada.

- Melón:

Ejemplos de hongos que atacan al cultivo del melón son (Maroto Borrego et al., 1995; Reche Mármol, 2008; Melgarejo Nárdiz et al., 2010; Romero Cuadrado et al., 2023):

- *Pseudoperonospora cubensis* (Berkeley & Curtis) Rostovtsev, que produce el denominado mildiu de las cucurbitáceas, cuyos síntomas son manchas poligonales de color amarillo claro en el haz de las hojas, que se corresponden con manchas en el envés de color grisáceo o negro. Con el tiempo se necrosan las áreas afectadas y se vuelven marrones desde el centro hacia fuera, hasta secarse.
- *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzpatrick, que produce muerte de plántulas en preemergencia en semilleros y tras la emergencia, podredumbres húmedas que provocan la caída de plántulas, retrasos en el crecimiento con marchitez progresiva y enrollamiento de hojas hacia el haz, defoliación y muerte rápida de la planta. En raíz, produce pardeamiento generalizado y destrucción de la corteza.
- *Rhizoctonia solani* Khün, en tallos produce chancros rojizos y manchas lívidas motivadas por el crecimiento del micelio, cuando la situación es

más grave produce podredumbres superficiales de contorno festoneado en las que se puede detectar a simple vista el micelio rojizo y los esclerocios pardos.

- Dos especies del género *Fusarium* sp. afectan al melón, por un lado *F. culmorum* (W.G.Smith) Saccardo que penetra en las plantas por las raíces o la base del tallo causando marchiteces prematuras, pardeamientos y secas de la planta pudiéndolas destruir por completo. Y *F. oxysporum* f. sp. *melonis* Snyder & Hansen que produce un amarilleamiento lento y progresivo de la planta, estrías necróticas longitudinales en los tallos por las que exudan gomas y sobre las que se forman esporodoquios rosados. Existen aislados de este hongo que causan la marchitez súbita de las plantas sin que previamente amarilleen por lo que en algunas ocasiones se puede recurrir al injerto del melón sobre *Benincasa hispida* (Thunberg) Cogniaux o *Lagenaria siceraria* (Molina) Standley resistentes a *Fusarium* sp.

Para un desarrollo importante de enfermedades producidas por hongos, se necesitan repetidos períodos de humedad elevada (sobre todo por la noche) y temperaturas comprendidas entre los 15-28 °C. Las enfermedades fúngicas se pueden transmitir por semillas infectadas, restos de plantas enfermas en el cultivo, las salpicaduras de agua sobre tierra contaminada o el viento, por lo que como medidas preventivas se recomienda emplear material vegetal sano, usar variedades resistentes cuando existan, extremar la precaución en las labores de cultivo para evitar producir heridas, manejar de forma adecuada la ventilación y evitar la presencia de agua libre sobre el cultivo, así como retirar y destruir las malas hierbas, los órganos dañados y los restos de poda (Melgarejo Nárdiz et al., 2010; Martín Gil et al., 2021; Romero Cuadrado et al., 2023). Para el control químico de enfermedades fúngicas, el Registro de Productos Fitosanitarios (MAPA, 2024b) autoriza en melón y pimiento el uso de azufre, la combinación de eugenol (presente en el aceite esencial de clavo de olor, nuez moscada y canela) + geraniol + timol (presente en el aceite esencial de tomillo u orégano), oxiclóruo de cobre, hidrogenocarbonato de potasio, azoxistrobina, tebuconazol, penconazol, ciflufenamid, bupirimato y *Bacillus amyloliquefaciens*, entre otros. Para el caso concreto de enfermedades producidas por hongos del suelo existen alternativas de control no

químicas como la solarización, que consiste en desinfectar una capa del suelo de entre 15-20 cm de profundidad, aprovechando la radiación solar para elevar la temperatura a unos 40-50 °C. Para ello se humedece el suelo (60-80 l/m<sup>2</sup>) y se cubre con un acolchado plástico transparente de polietileno de unas 140-200 galgas de espesor. Este proceso se realiza una vez finalizado el cultivo y durará unas 5-6 semanas. La mejor época para realizarla es en verano. Otra técnica de desinfección del suelo es la biofumigación, que consiste en incorporar materia orgánica al suelo, la cual fermenta y emite unos gases que junto con la acción de algunos microorganismos beneficiosos desinfectan el suelo. Ambas técnicas se pueden combinar para mejorar la eficacia, es lo que se conoce como biosolarización (Guerrero et al., 2021; Martín Gil et al., 2021).

#### 1.5.2. Plagas.

- PULGONES (Hemiptera: Aphididae):

Los pulgones, por ser la plaga objeto de estudio de esta tesis doctoral, se ha dedicado una sección especial, describiéndose con más detalle en el apartado anterior 1.2.

- TRIPS (Thysanoptera: Thripidae):

La especie *Frankliniella occidentalis* (Pergande) puede afectar al melón, pero es en pimiento en donde es considerada una plaga principal al provocar daños directos al cultivo por las picaduras al alimentarse y las puestas que realizan sobre las hojas, flores y frutos (Montserrat Delgado, 2012; Romero Cuadrado et al., 2023).

En el caso del pimiento, *F. occidentalis* (Pergande) puede producir daños indirectos en el cultivo al ser el vector más eficiente del virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV, *Tospovirus*) (Montserrat Delgado, 2012; Melgarejo Nárdiz et al., 2010). También se debe prestar atención a otras especies como *Thrips tabaci* Lindeman, *Echinothrips americanus* Morgan (Montserrat Delgado, 2012) y otras de aparición más reciente y que están suponiendo un problema importante en este cultivo, *Thrips parvispinus* (Karny) (Lacasa et al., 2019) y *Scirtothrips dorsalis* Hood (De la Peña, 2024).

Entre las estrategias para controlar la plaga, de manera preventiva se recomienda cumplir rigurosamente las medidas de higiene, mantener los cerramientos en buen estado y la utilización de trampas cromáticas adhesivas azules. De manera curativa se pueden realizar tratamientos fitosanitarios, las materias activas autorizadas en pimiento y melón son piretroides como deltametrina, spinosinas como spinosad y otros como azadiractina, aceite de parafina o aceite de naranja (MAPA, 2024b), a ser posible en combinación con estrategias de control biológico con sueltas de depredadores tales como ácaros fitoseidos entre los que se encuentran *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot, *Neoseiulus cucumeris* (Oudemans) y *Transeius montdorensis* (Schicha) o también el chinche antocórido depredador *Orius laevigatus* (Fieber) (Monserrat Delgado, 2012; Romero Cuadrado et al., 2023).

- MOSCAS BLANCAS (Hemiptera: Aleyrodidae):

Principalmente hay dos especies que afectan al pimiento y al melón: *Trialeurodes vaporariorum* Westwood y *Bemisia tabaci* (Gennadius), siendo esta última la que causa mayores daños (Guirao, 2002). Los daños que producen son debido a la alimentación, secretan abundante melaza sobre la cual proliferan hongos conocidos como negrilla, que reducen la capacidad fotosintética debilitando a la planta y además son también vectores de virus (García Marí y Ferragut Pérez, 2020).

En pimiento pueden transmitir el virus de la cuchara o rizado amarillo del tomate (Tomato yellow leaf curl disease, TYLCV, Begomovirus) o el virus del amarilleo del tomate (Tomato chlorosis virus, ToCV, Crinivirus) (Melgarejo Nárdiz et al., 2010).

En melón pueden transmitir el virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Dehli o virus de Nueva Dehli (Begomovirus solanumdelhiense sin. Tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV, Begomovirus) (Font San Ambrosio y Alfaro Fernández, 2015), considerado en la actualidad como el virus de transmisión por mosca blanca más prevalente en los cultivos de cucurbitáceas, independientemente del cultivo y las condiciones del mismo, encontrándose frecuentemente en infecciones mixtas con otras virosis. Otros ejemplos de virus transmitidos por aleuródidos son el virus de las venas amarillas del pepino (Ipomovirus cucumisvenaflavi sin. Cucumber vein yellowing virus, CVYV, Ipomovirus) y otros del género Crinivirus como el virus del enanismo amarillo

del pepino (*Crinivirus cucurbitae* sin. *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, CYSDV), el virus del falso amarilleo de la remolacha (*Crinivirus pseudobetae* sin. *Beet pseudoyellows virus*, BPYV) u otros más recientes como el virus del amarilleo clorótico de las cucurbitáceas (*Cucurbit chlorotic yellows virus*, CCYV), aunque todavía no ha sido identificado como un virus problemático en Europa (Melgarejo Nárdiz et al., 2010; Font-San Ambrosio et al., 2023).

El manejo de las poblaciones de aleuródidos, tanto en melón como en pimiento, se realiza por métodos químicos como el uso de acetamiprid, deltametrín, lambda cihalotrina, piretrinas, aceite de naranja, aceite de parafina o azadiractina (MAPA, 2024b), pero también por métodos biológicos. Los principales auxiliares que se utilizan contra moscas blancas en pimiento en nuestras zonas de producción son los depredadores *O. laevigatus* (Fieber), pero principalmente el uso combinado del ácaro depredador *A. swirskii* Athias-Henriot y parasitoides de larvas como *Encarsia formosa* Gahan o *Eretmocerus mundus* Mercet y *E. eremicus* Rose & Zolnerowich (Monserrat Delgado, 2012; García Marí y Ferragut Pérez, 2020; Romero Cuadrado et al., 2023). Sin olvidar las medidas de higiene, cerramientos y trampas cromáticas adhesivas amarillas (Monserrat Delgado et al., 2012).

- ÁCAROS (Acarida: Tetranychidae):

Dentro de los artrópodos clasificados como arácnidos y pertenecientes al orden acarida, están los tetraníquidos como *Tetranychus urticae* Koch, conocido como araña roja, que es plaga del cultivo del pimiento y melón (Monserrat Delgado et al., 2012; Romero Cuadrado et al., 2023), aunque también conviene prestar especial atención a otras especies del mismo género como son *Tetranychus evansi* Baker y Pritchard y *Tetranychus turkestanii* Ugarov y Nikolskii (Ferragut et al., 2013; Romero Cuadrado et al., 2023).

Los ácaros fitófagos se alimentan de cualquier parte de la planta excepto de las raíces. Mayoritariamente se alimentan de las hojas, provocando un cierre de los estomas cuando las poblaciones son elevadas, reduciendo así la transpiración y la fotosíntesis (García Marí y Ferragut Pérez, 2020). Los síntomas que producen son decoloración, pérdida de brillo, desecación, defoliación en casos extremos, manchas y alteraciones de

crecimiento, además de producir hilos de seda en los lugares donde se ubican las colonias, que suelen ser las zonas apicales de los brotes (García Marí y Ferragut Pérez, 2020).

Para reducir los riesgos iniciales de ataques de ácaros, son fundamentales las medidas de higiene y de eliminación de la vegetación hospedante colindante a la parcela con suficiente antelación. En el caso de detectarse presencia de la plaga, puede actuarse por métodos biológicos, con introducciones de depredadores como son los ácaros fitoseidos: *A. andersoni* (Chant), *A. swirskii* Athias-Henriot, *N. californicus* (McGregor), *N. cucumeris* (Oudemans), *T. montdorensis* (Schicha) y *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot y el díptero *Feltiella acarisuga* (Vallot) (Monserrat Delgado et al., 2012; Martín Gil et al., 2021; Romero Cuadrado et al., 2023). Pero también por métodos químicos, las materias activas autorizadas en melón y pimiento son azufre y abamectina (MAPA, 2024b).

- ORUGAS (Lepidoptera):

Los problemas de orugas de lepidópteros en el cultivo del pimiento (en melón no son muy frecuentes), se centran en los noctuidios *Helicoverpa armigera* (Hübner) también conocida como oruga del tomate y maíz, *Spodoptera exigua* Hübner o rosquilla o gardama verde y *Spodoptera littoralis* (Boisduval) o rosquilla negra, cuyas orugas dañan principalmente los frutos y el pirálido *Ostrinia nubilalis* (Hübner) conocido como taladro o barrenador del maíz (Monserrat Delgado et al., 2012; Romero Cuadrado et al., 2023).

Una buena estrategia para el manejo de lepidópteros es el uso de mallas adecuadas y el empleo de sistemas de captura masiva mediante la colocación de trampas o polilleros cebados con feromonas sexuales, las cuales además de para realizar un seguimiento poblacional, si se colocan a altas densidades sirven para reducir los niveles poblacionales al capturar parte de la población de los machos y evitar así los apareamientos con las hembras y la consiguiente puesta de huevos (Monserrat Delgado et al., 2012; Romero Cuadrado et al., 2023).

Hay gran cantidad de enemigos naturales que atacan a los lepidópteros. Entre los depredadores, aparte de aves, pequeños mamíferos, reptiles y anfibios, destacan los

arácnidos y varias especies de insectos como míridos, como *Macrolophus pigmaeus* (Rambur), antocóridos como *O. laevigatus* (Fieber)) o crisópidos como *C. carnea* (Stephens). Los parasitoides que atacan a orugas suelen ser himenópteros del género *Trichogramma* sp. y *Apanteles* sp. y dípteros taquínidos (Monserrat Delgado et al., 2012; Romero Cuadrado et al., 2023). Para el control de algunos lepidópteros está ampliamente extendido el uso de productos fitosanitarios basados en la bacteria *Bacillus thuringiensis*, pero también se pueden emplear otros de naturaleza química como deltametrina, lambda cihalotrina, y/o spinosad (MAPA, 2024b).

- NEMATODOS (Rhabditida: Meloidogynidae):

Los nematodos fitoparásitos son organismos microscópicos que habitan en el suelo y se distinguen de otros nematodos por tener un aparato bucal en forma de estilete. Se dispersan principalmente de manera indirecta a través del material vegetal, aperos, tierra, agua, etc., pero también lo hacen de manera directa con su propio movimiento. Las especies del género *Meloidogyne* son los nematodos fitoparásitos más importantes por su extensa distribución y capacidad de producir enfermedades en los cultivos, ya que interfieren en la toma de agua y nutrientes por parte de la raíz y en su transporte a la parte aérea. Su naturaleza es polífaga con más de 2000 plantas hospedantes. En los cultivos de pimiento y melón se encuentran principalmente dos especies *M. incognita* (Kofold & White) Chitwood y *M. arenaria* (Neal) Chitwood (Martín Gil et al., 2021).

Los síntomas que producen son básicamente reducción del crecimiento de las plantas y amarilleos foliares ya que las raíces dañadas no pueden absorber el agua ni los nutrientes requeridos por la planta. Los síntomas en la parte aérea son inespecíficos y no permiten reconocer la enfermedad por su similitud con los causados por otros patógenos de suelo o deficiencias nutricionales, por lo que la presencia del nematodo tendrá que confirmarse mediante análisis de laboratorio. En las raíces, *Meloidogyne* causa nódulos o agallas, síntoma específico que sirve para su diagnóstico a nivel de género (Martín Gil et al., 2021).

En el sureste de España, los nematodos son considerados uno de los principales problemas fitopatológicos de suelo en cultivos protegidos, como el pimiento. En cultivos al aire libre, como el melón, debido a las prácticas de rotaciones de cultivos, los problemas

por nematodos no son tan acusados (Montserrat Delgado, comunicación personal). Los primeros problemas de nematodos aparecieron en la década de los 70, se estableció como principal método de desinfección de suelo el uso generalizado de bromuro de metilo (Ros Ibáñez et al., 2021), pero en noviembre de 1992 se firmó un acuerdo internacional, conocido como el Protocolo de Montreal, en el que se prohibió la utilización libre de este compuesto, debido su acción degradativa sobre la capa de ozono, restringiéndose su uso a determinados momentos críticos hasta el año 2007, cuando quedó totalmente prohibido (López Marín et al., 2017). Fue a raíz de entonces cuando resurgieron los problemas por nematodos, siendo a partir de 2009 un problema emergente en algunos invernaderos pasando a ser en 2012 el problema principal en alguno de ellos con dificultad para paliar los daños, pese a la desinfección anual (Ros Ibáñez et al., 2021). Esta delicada situación impulsó la investigación de otras medidas alternativas que fueran viables económicamente y más respetuosas con el medio ambiente (López Marín et al., 2017).

Entre las medidas de prevención y control se incluyen: la eliminación completa (incluyendo la raíz) de plantas infestadas, para impedir que el nematodo continúe reproduciéndose; la eliminación de malas hierbas, ya que la mayoría son hospedantes de nematodos y actúan como reservorio; utilizar material vegetal sano, resistente o injertado sobre patrones resistentes, si existen; extremar las medidas de higiene y limpieza de calzados, aperos, maquinaria, etc.; aplicar técnicas de desinfección del suelo como la solarización, biofumigación o la combinación de ambas, biosolarización (Martín Gil et al., 2021; Ros Ibáñez et al., 2021). Cualquier actuación debe realizarse antes del trasplante, con carácter preventivo, para evitar la invasión de las raíces. Las medidas curativas con fitosanitarios requieren múltiples aplicaciones y difícilmente revierten el daño producido. La aplicación de cualquier medida irá precedida por la confirmación de la presencia de nematodos mediante muestreos y análisis para identificar y cuantificar los niveles poblacionales (Martín Gil et al., 2021)

En cuanto a los productos fitosanitarios autorizados (MAPA, 2024b) para el control de nematodos en el cultivo de pimiento y melón están los químicos de síntesis como la abamectina y el fluopyram y otros de origen natural como azadiractina, extracto de ajo o geraniol+timol.

## **2. Objetivos**

El objetivo general de esta tesis doctoral es desarrollar formulaciones de bioactivos volátiles de origen vegetal mediante el empleo de la nanotecnología. Con ello, se pretende generar nuevo conocimiento científico sobre nanoemulsiones de aceite en agua como alternativa a los concentrados emulsionables (CE) convencionales utilizados como productos fitosanitarios para la protección de cultivos.

En concreto, se pretende evaluar el efecto insecticida y repelente de nanoemulsiones de bioactivos volátiles sobre *Myzus persicae* (Sulzer) en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tanto en condiciones de laboratorio como de campo en invernadero y determinar su influencia en el comportamiento alimentario de *M. persicae* en pimiento y *Aphis gossypii* Glover en melón (*Cucumis melo* L.). Las sustancias activas estudiadas son: citral, (E)-anetol, farnesol, (Z)-jasmona, aceite destilado de limón, aceite esencial de anís y esteres metílicos de ácidos grasos de coco, de manera individual o sus mezclas. Se combinarán con surfactantes naturales como la lecitina de soja, sintéticos como Tween80® y/o aceites de girasol o de semillas de algodón como estabilizantes naturales y se caracterizarán las nanoemulsiones resultantes.

Con todo ello, se pretende desarrollar nuevas herramientas para el control de plagas que solucionen problemas y reporten beneficios, con la motivación de que las sustancias que mejores resultados hayan proporcionado puedan encontrarse en el futuro a la disposición de cualquier agricultor.

### **3. Materiales y métodos**

### 3.1. Preparación y caracterización de nanoemulsiones de bioactivos volátiles.

Para la realización de los experimentos llevados a cabo en esta tesis doctoral, los bioactivos volátiles se preparaban en forma de nanoemulsión, para ello se ha empleado un homogeneizador de alta velocidad IKA Labor Pilot Controller 2000/4 (IKA-Werke GmbH and Co. Staufen, Germany) (Figura 6) programado para procesar lotes de 100 ml durante 10 min a 7940 rpm y una temperatura del circuito de refrigeración de 15°C para evitar sobrecalentamientos de la máquina y la volatilización de los bioactivos.



**Figura 6. Homogeneizador de alta velocidad IKA Labor Pilot Controller 2000/4 (IKA-Werke GmbH and Co. Staufen, Germany).**

También se realizaron nanoemulsiones mediante la técnica de ultrasonidos, utilizando para ello el modelo Branson 450 Digital Sonifier (Marshall Scientific LLC., Hampton, New Hampshire, EEUU) (Figura 7) con una bocina disruptiva cónica de 1/2" 400 W con una amplitud del 30% durante 5 minutos con pulsos de 15 s.



**Figura 7. Ultrasonidos Branson 450 Digital Sonifier (Marshall Scientific LLC., Hampton, New Hampshire, EEUU).**

La caracterización de las nanoemulsiones (tamaño de partícula y potencial Z) se realizó utilizando un Zetasizer Nano ZS y un Zetasizer Advance Ultra Red (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, Worcestershire, United Kingdom) como el que se muestra en la Figura 8.



**Figura 8. A la izquierda Zetasizer Advance Ultra Red (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, Worcestershire, United Kingdom), en el centro monitor para visualización de datos, y a la derecha cubetas para medir tamaño de partícula (DTS0012) y potencial Z (DTS1070).**

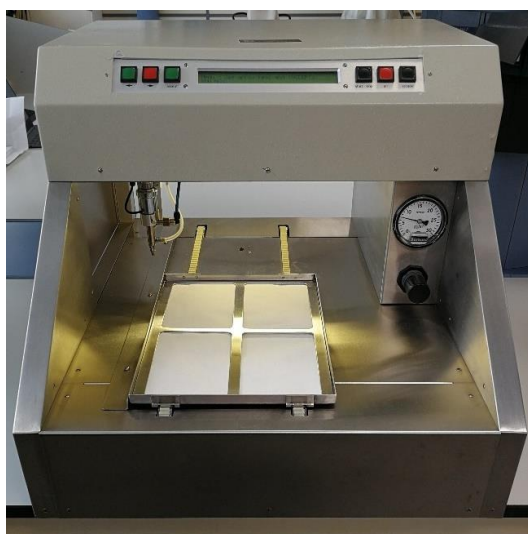
### 3.2. Análisis estadístico.

En los apartados siguientes (3.3 - 3.6) se detallan los modelos estadísticos utilizados para el análisis de los datos en cada uno de los experimentos llevados a cabo en esta tesis.

### 3.3. Estudio de la actividad insecticida.

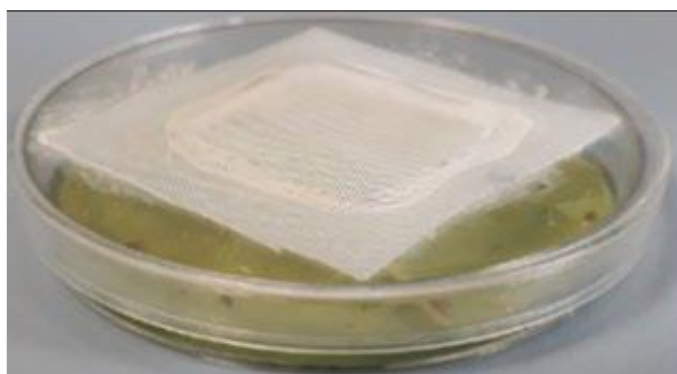
#### 3.3.1. Condiciones de laboratorio.

Se evaluó la eficacia insecticida contra *M. persicae* en condiciones de laboratorio de una mezcla al 1% de 5 bioactivos volátiles: citral, (E)-anetol, farnesol y (Z)-jasmona de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.) y aceite esencial de limón (*Citrus limon* L.) de Citromil S.L. (Santomera, Murcia, España). Se prepararon tres formulaciones del producto mezcla (que contenía un 0,2% de cada compuesto) mediante el homogeneizador de alta velocidad: (1) con Tween80 en relación 1:2 (aceite:surfactante), (2) con lecitina de soja 1:1 y (3) con lecitina de soja y aceite de girasol 1:1:1. Las emulsiones se prepararon al 5% y luego se diluyeron a las dosis de 0,25% para su aplicación sobre las placas Petri mediante un aparato de pulverización automática (Computer Controlled Spraying Aparatus, CCSA) de Burkard Manufacturing Co. Ltd. (Rickmansworth, Hertfordshire, Inglaterra, Reino Unido) (Figura 9) cuyas condiciones de trabajo fueron 0,345 bar de presión y una abertura de boquilla tal para una aplicación equivalente a 200 l/ha.



**Figura 9. Pulverizador automático (Burkard Manufacturing Co. Ltd.).**

Las placas Petri (5 cm de diámetro) contenían una dilución de agar al 1,15% en agua destilada, la cual se mezcló con un agitador magnético y se calentó hasta llevar a ebullición, luego se dejó enfriar y se depositó un trozo de hoja de pimienta en forma de disco del mismo diámetro que la placa Petri, una vez hecho esto se depositaron con ayuda de un pincel aproximadamente 20 pulgones adultos. Cuando los pulgones ya estaban asentados sobre la hoja en la base de la placa Petri se pulverizaron y se cerró con la tapa a la que previamente se le realizó una abertura y se le pegó un trozo de muselina para favorecer la ventilación. Todo el conjunto quedó sellado con un trozo de Parafilm para evitar que los pulgones pudieran escapar (Figura 10).



**Figura 10. Placa Petri ventilada y sellada con Parafilm®. En su interior, disco de hoja de pimienta sobre agar y pulgones.**

Se realizaron treinta repeticiones por tratamiento. El número de pulgones vivos y muertos se registró a las 24 horas y los 4 días. Se calculó la eficacia con la fórmula de Henderson-Tilton para cada tratamiento frente al control correspondiente. Los datos fueron transformados con la función arcoseno de la raíz cuadrada y analizados mediante el ANOVA y el test de comparación de medias LSD.

### 3.3.2. Condiciones de campo.

Los ensayos de campo consistieron en tratar plantas con el producto mezcla y otros bioactivos, y formulaciones sin bioactivo como control, para posteriormente cuantificar el número de pulgones presentes. Los experimentos en campo se realizaron durante dos años (2020 y 2021) en la finca experimental agraria Torreblanca que el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA) tiene en Dolores de Pacheco (Torre Pacheco, Murcia). La metodología utilizada se especifica en la Tabla 2.

**Tabla 2. Experimentos de campo (cultivo de pimiento de carne gruesa cv. Herminio) con aplicaciones de productos bioactivos volátiles. Metodología.**

| Año                               | 2020                                                                                                   | 2021                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nº Invernaderos                   | 2                                                                                                      | 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Fecha plantación                  | 27/01/2020                                                                                             | 21/10/2020                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Mes del experimento               | abril                                                                                                  | febrero y abril                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Poblaciones de pulgones iniciales | 28-200 pulgones/planta                                                                                 | 20-50 pulgones/planta                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Diseño experimental               | 2 bloques aleatorios                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Unidad experimental               | 5 plantas adyacentes en la misma fila                                                                  | 2 plantas en filas adyacentes                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Tratamientos                      | Producto mezcla <sup>a</sup> al 1% formulado al 1:2; 1:1 y 1:1:1. Y controles <sup>b</sup>             | Aplicación secuencial de 3 tratamientos:<br>a) producto mezcla <sup>a</sup> (formulación 1:1:1) al 0,5%.<br>b) b.1) febrero: 3% de aceite de semilla de algodón con 3% de jabón potásico en agua.<br>b.2) abril: 1,5% de aceite de semilla de algodón con 1,5% de jabón potásico en agua.<br>c) cis-jasmona (formulación 1:2) al 0,25%.<br>cada 4 días, sobre las mismas plantas. Y controles <sup>b</sup> |
| Aplicación de tratamientos        | Pulverizador de mochila a presión manual MATABI® POLITA 7 o SUPER 16 (Grupo Goizper, Gipuzkoa, España) |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Datos y análisis                  | Nº pulgones vivos y muertos (t = 0, 1 y 4 días). Gráficos Box and Whisker, ANOVA y LSD                 | Nº pulgones vivos y muertos (t = 0, 1 y 4 días). Tasa instantánea de crecimiento poblacional. ANOVA y prueba de Wilcoxon                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

<sup>a</sup> Producto mezcla: nanoemulsión O/W de una mezcla de aceite esencial de citral, (E)-anetol, farnesol, cis-jasmona y limón en cantidades iguales. Formulación 1:2 con Tween80®, 1:1 con lecitina de soja y 1:1:1 con lecitina de soja y aceite de girasol.

<sup>b</sup> Los controles contenían solo los surfactantes y estabilizantes y el agua correspondientes.

### 3.4. Estudio de la persistencia del efecto insecticida.

Se estudió la persistencia del efecto insecticida de 4 nanoemulsiones de bioactivos volátiles como son anís, (E)-anetol, farnesol y aceite destilado de limón formulados individualmente al 0,2% con Tween80® (1:2). También se probó al 0,2% la mezcla de bioactivos citral, (E)-anetol, (Z)-jasmona, aceite destilado de limón y farnesol. Se empleó el sulfoxaflor (12% [SC] P/V; CLOSER® Isoclast™ active, Corteva Agriscience Spain S.L.U., Sevilla, España) a una dosis de 24 mg i.a./L como control positivo. Se ensayó sobre plantas de pimiento en una etapa de crecimiento 202 según la escala BBCH (segundo brote apical lateral primario visible). Los tratamientos se aplicaron con un pulverizador a presión manual Matabi® Berry 1,5 (Grupo Goizper, Gipuzkoa, España) a razón de aproximadamente 100 ml/planta.

Posteriormente, 1-2 h después de la pulverización, una vez las hojas se habían secado, se introdujeron cuatro hembras adultas de *M. persicae* en jaulas de clip (Entomopraxis SCP, Barcelona, España), las cuales se colocaron en el envés de las hojas de una misma planta (Figura 11) en diferentes momentos: el mismo día de la aplicación del tratamiento o día 0 y en los días 1, 2, y 7 después de la aplicación de los tratamientos. El ensayo se llevó a cabo en una cámara de crecimiento (Figura 12) a una temperatura constante de 23 °C y un ciclo de luz/oscuridad de 16:8 h.

El experimento se repitió cuatro veces (una aplicación o réplica por semana) empezando los lunes durante cuatro semanas consecutivas, y en cada réplica se utilizaron cinco plantas (repeticiones); por lo tanto, se recogieron datos de un total de 20 repeticiones por tratamiento. El número de ninfas y adultos vivos por jaula se registró diariamente hasta el séptimo día después de la liberación de los pulgones. Los datos se analizaron estadísticamente con el software R (R Core Team 2019), versión 4.2.2, con un nivel de significación de 0,05. Para el análisis estadístico se ajustó a una regresión lineal, en función del tiempo, con el primer punto fijado en el valor 4 (correspondiente al número inicial de hembras). Los valores de las pendientes se han comparado mediante la prueba de comparaciones pareadas de Tukey, utilizando la función emtrends del paquete emmeans, versión 1.8.3. (Lenth, 2022).



**Figura 11. Planta de pimiento con jaula de clip (izquierda). Detalle de la jaula de clip y pulgones (derecha).**



**Figura 12.** Cámara de cultivo y plantas de pimienta con jaulas clip y pulgones.

### **3.5. Estudio de efectos antialimentarios.**

El estudio de los efectos antialimentarios de las nanoemulsiones de bioactivos volátiles se realizó mediante la técnica de Gráficos de Penetración Eléctrica (EPG), la cual consiste en incluir a un insecto dentro de un circuito eléctrico de forma que cuando el insecto clava su estilete en el tejido vegetal, el circuito se cierra dando lugar a las señales EPG que se producen por cambios en el potencial y en la resistencia durante la ruta del estilete y su penetración en diferentes tejidos de la planta. Las diferentes señales EPG o formas de onda han sido ampliamente estudiadas y están asociadas al comportamiento de prueba y alimentación del pulgón, estas se pueden registrar en tiempo real mediante un software diseñado para ello y visualizar en un monitor de un ordenador (Tjallingii 2023).

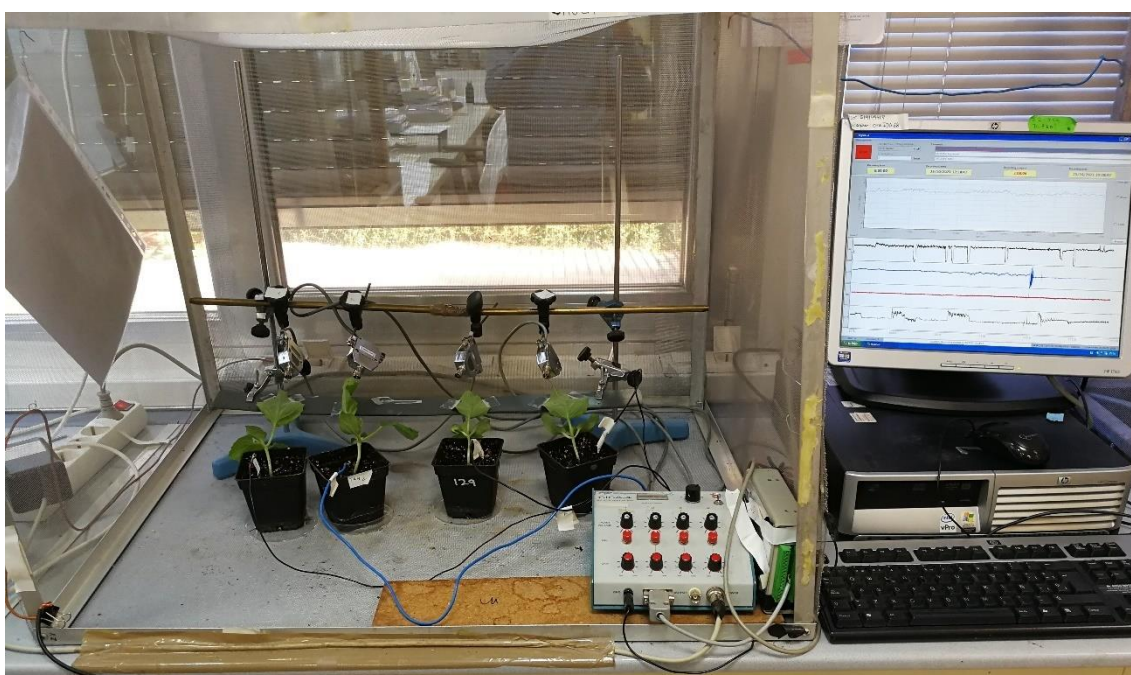
En el caso concreto de esta tesis doctoral, la técnica EPG se ha utilizado para estudiar el comportamiento alimentario de *A. gossypii* en plantas de melón y de *M. persicae* en plantas de pimienta. Para los experimentos de comportamiento alimentario, se utilizaron plantas de melón en una etapa de crecimiento de 101 en la escala BBCH (primera hoja verdadera del tallo principal, desplegada) y plantas de pimienta en una

etapa de crecimiento de 102 en la escala BBCH (segunda hoja verdadera del tallo principal, desplegada). Dos horas antes de comenzar los registros EPG, las plantas se pulverizaron con las nanoemulsiones de anís, (E)-anetol, farnesol y aceite destilado de limón, individualmente al 0,2%, utilizando un aerógrafo de doble acción 17055 (AB300) de 0,3 mm de diámetro de boquilla, con capacidad de 9 cm<sup>3</sup> y presión de trabajo entre 15 - 30 psi, el cual estaba accionado por un compresor 17049 (AS-186) (Artesania Latina S.L., China). Además, otras plantas fueron rociadas con sulfoxaflor (12% [SC] P/V; CLOSER ® Isoclast™ active, Corteva Agriscience Spain S.L.U., Sevilla, España) a 24 mg i.a./L como tratamiento estándar, mientras que las plantas de control se trataron solo con agua destilada.

Para incluir a los pulgones en el circuito eléctrico previamente hay que inmovilizados, para ello se colocan con el abdomen sobre una punta de pipeta de 2-200 µL unida a un tubo de plástico flexible que está conectado a una bomba de vacío que succiona el cuerpo del pulgón (Eyela Aspirator A3S, Tokyo Rikakikai Co.LTD, Japón) de tal manera que en el dorso se le une un hilo de oro (18,5 µm de diámetro) utilizando una pequeña gota de una solución acuosa (especial para EPG) que contiene pegamento, plata y detergente (EPG Systems, Wageningen, Países Bajos). Luego, el extremo opuesto del alambre de oro se unió a un electrodo de cobre (3 cm de longitud y 1 mm de diámetro), correspondiente al electrodo de entrada de la sonda EPG. El electrodo de salida fue un segundo electrodo de cobre (10 cm de longitud y 2 mm de diámetro), que se introdujo en el sustrato de la planta. Los pulgones con el alambre de oro adherido (Figura 13) se colocaron en el envés de las hojas y se conectaron al dispositivo DC-EPG (Giga-4 y Giga-8; EPG Systems, Wageningen, Países Bajos). El procedimiento de adquisición de EPG (Figura 14) se realizó dentro de una jaula de Faraday para minimizar el ruido electromagnético. La adquisición y el marcaje de ondas EPG se llevaron a cabo utilizando el paquete de software para Windows Stylet + v01.30 (EPG Systems, Wageningen, Países Bajos). Las señales de EPG se registraron durante 8 h en condiciones de laboratorio (24 ± 4 °C), y el registro comenzó inmediatamente después de que los pulgones se colocaron en la hoja. Se tomaron un mínimo de 20 registros para cada tratamiento, y se utilizaron un pulgón y una planta diferentes para cada réplica.



**Figura 13. Pulgón con hilo de oro adherido al dorso mediante pegamento EPG.**



**Figura 14. Componentes del sistema EPG con jaula de Faraday, plantas, pulgones, electrodos, sondas y dispositivo DC-EPG, ordenador, monitor y software de adquisición mostrando formas de onda EPG a tiempo real.**

Las formas de onda EPG relacionadas con el comportamiento alimentario de los pulgones se recogen en la Tabla 3.

**Tabla 3. Formas de onda EPG relacionadas con el comportamiento alimentario de pulgones (Basado en Tjallingii, 2023).**

| Onda | Definición                                                                       |
|------|----------------------------------------------------------------------------------|
| np   | No prueba, estado de inactividad, sin contacto del estilete con el tejido foliar |
| C    | Estilete en el espacio intercelular                                              |
| pd   | Punciones intracelulares del estilete (transmisión de virus no persistentes)     |
| E1   | Salivación al comienzo de la fase de floema (inoculación de virus persistentes)  |
| E2   | Ingestión pasiva de savia del floema (adquisición de virus persistentes)         |
| F    | Descoordinación de las piezas bucales del estilete                               |
| G    | Ingestión activa de savia del xilema                                             |

Para el cálculo, expresado como porcentaje (%), de la duración total de todas las formas de onda identificadas en todos los registros de EPG la onda F, relacionada con la descoordinación de las piezas bucales del estilete como resultado de las dificultades encontradas a lo largo de su trayectoria. Y otras ondas como las punciones del estilete intracelular (pds), que reflejan las pruebas intracelulares que ocurren dentro de la fase de onda C y están asociadas a la transmisión de virus no persistentes, se incluyeron como parte de la forma de onda C para fines de cálculo.

Para analizar el efecto de las nanoemulsiones sobre el comportamiento de prueba y alimentación de los insectos, se procesó un conjunto seleccionado de variables EPG (media  $\pm$  SE) utilizando los libros de datos EPG-Excel (Sarria et al. 2009) y EPG Workbook CSIC/UAL (Garzo et al. 2024). Para cada tratamiento se calcularon los siguientes parámetros: (i) proporción de individuos que han producido una forma de onda específica (PPW), como el número de insectos que producen una forma de onda específica dividido por el número total de insectos utilizados en cada tratamiento; ii) el número total de eventos de cada forma de onda, como la suma del número de veces que cada insecto ha producido una forma de onda en cada registro de cada tratamiento, lo que arroja un valor por insecto (réplica) que luego puede compararse entre tratamientos utilizando una prueba estadística adecuada; iii) duración total de la forma de onda, como la suma de la duración de cada evento de onda en cada registro de cada tratamiento; asignando un valor de cero si no hay eventos para un insecto en particular; iv) duración media de la forma de onda, es decir, la duración total de la forma de onda dividida por el número de eventos de forma de onda en cada tratamiento, clasificando el valor como falta de datos si no hay eventos para una forma de onda determinada; (v) porcentaje del tiempo

de prueba que cada insecto ha empleado en realizar cada forma de onda, es decir, duración total de cada forma de onda dividido por el tiempo total de prueba; y (vi) la duración de los eventos EPG secuenciales, es decir, el tiempo que pasa entre que ocurre un evento y el siguiente. Además, también se calculó la duración media sobre el tiempo total de grabación EPG (expresada como %) de todas las formas de onda identificadas descritas anteriormente.

Todos los datos se analizaron estadísticamente con el software R (R Core Team 2019), versión 4.2.2, con un nivel de significación de 0,05. El conjunto seleccionado de variables EPG se analizó mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA). La normalidad y homocedasticidad de los residuos se evaluaron con las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Cuando fue necesario, los datos se procesaron con las transformaciones raíz cuadrada ( $x + 0,5$ ), logaritmo ( $x + 1$ ) o el arcoseno de la raíz cuadrada ( $x$ ). Cuando no fue posible cumplir con los requisitos de ANOVA de un factor, las variables se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis. Cuando los resultados de ANOVA o Kruskal-Wallis fueron significativos ( $p \leq 0,05$ ), se realizó la prueba de Tukey o la prueba de Dunn para comparaciones pareadas de medias, respectivamente.

### **3.6. Estudio de efectos sistémicos.**

Se estudiaron los efectos sistémicos o translaminares de las nanoemulsiones de farnesol, aceite destilado de limón al 0,2% con Tween80® (1:2) y el producto mezcla de bioactivos (citral, (E)-anetol, (Z)-jasmona, aceite destilado de limón y farnesol) al 0,2%. Como control negativo se usó agua y como control positivo sulfoxaflo (12% [SC] P/V; CLOSER® Isoclast™ active, Corteva Agriscience Spain S.L.U., Sevilla, España) a una dosis de 24 mg i.a./L.

Se utilizaron plantas de pimiento en una etapa de crecimiento de 202 en la escala BBCH. Una hoja completamente expandida del segundo y tercer par de hojas verdaderas se protegió con una bolsa de plástico de cierre zip para garantizar que esta hoja no fuera tratada con el producto durante la pulverización (Figura 15) y, por lo tanto, nos permita estudiar los efectos sistémicos solos sin efectos de contacto. Mediante un pulverizador manual (Matabi® Berry 1,5, Grupo Goizper, Gipuzkoa, Spain) y a razón de aproximadamente 100 ml/planta, se pulverizaron las planta de pimiento, seguidamente,

se colocaron cuatro hembras adultas de *M. persicae* en una jaula de clip (Entomopraxis SCP, Barcelona, España) sobre la hoja sin tratar. Este experimento se llevó a cabo en una cámara de crecimiento a una temperatura constante de 23 °C y un ciclo de luz/oscuridad de 16:8 h.



**Figura 15. Planta de pimienta con hoja protegida con bolsa de cierre zip para evitar pulverización por el tratamiento.**

Se realizaron cuatro aplicaciones de los tratamientos (una aplicación o réplica por semana), cada lunes durante cuatro semanas consecutivas, y en cada réplica se utilizaron cinco plantas (repeticiones); por lo tanto, se realizaron un total de 20 repeticiones por tratamiento. Se anotaron el número de ninfas y adultos vivos por jaula clip a las 24 horas, 4 y 7 días después de la colocación de los pulgones. Los datos se analizaron estadísticamente con el software R (R Core Team 2019), versión 4.2.2, con un nivel de significación de 0,05. El número de pulgones (ninfas y adultos) vivos por planta se analizó mediante un modelo lineal generalizado (GLM) con distribución binomial negativa, calculado con la función `glmer.nb` del paquete `lme4`. Además, se calculó la tasa instantánea de crecimiento poblacional ( $ri$ ) como:

$$ri = \ln(Nf/No)/\Delta T$$

donde  $Nf$  es el número de pulgones cada día después del tratamiento,  $No$  es el número de pulgones al inicio y  $\Delta T$  es el número de días transcurridos entre el conteo inicial y final. Las tasas resultantes se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn para la comparación de medias.

### 3.7. Estudio de efectos repelentes e inhibidores de la reproducción.

Se han estudiado las propiedades repelentes e inhibidoras de la reproducción de las nanoemulsiones de (E)-anetol, farnesol, aceite destilado de limón y un compuesto derivado del aceite de coco como son los esteres metílicos de ácidos grasos de coco, en adelante coco, al 0,2% o al 0,1% en mezclas de más de un producto, empleando para la formulación Tween®80 en agua destilada, también se ha probado el producto mezcla de citral, (E)-anetol, (Z)-jasmona, aceite destilado de limón y farnesol, a partes iguales, diluida al 0,2% (0,04% de cada compuesto).

En otro estudio se ha probado el efecto repelente e inhibidor de la reproducción de individuos alados de *M. persicae* de otras formulaciones. Por un lado, las nanoemulsiones de coco al 0,4% de manera individual y su combinación con aceite destilado de limón (1:0,5) y ambas sustancias junto con fibroína de seda (1:0,5:0,25). Y, por otro lado, las nanoemulsiones de aceite en agua (O/W) siendo el aceite esencial de anís al 0,25% el ingrediente en común de ambas formulaciones y empleando para las mezclas en proporción 1:1 el aceite de cártamo en un caso y el aceite de lino en otro caso. Cabe destacar que no ha dado tiempo a publicar en revistas científicas los resultados obtenidos con estas formulaciones, pero sí que han sido presentados en el XIII Congreso Nacional de Entomología Aplicada – XIX Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Entomología Aplicada celebrado en Gijón entre los días 7 y 11 de octubre de 2024, por lo que conviene incluir en esta tesis doctoral dada la relevancia de los mismos.

Los tratamientos se aplicaron con un pulverizador manual (Matabi® Berry 1,5; Grupo Goizper, Gipuzkoa, España) a razón de aproximadamente 100 mL/planta sobre plantas de pimienta de 25 a 30 cm de altura y en una etapa de crecimiento equivalente a 501 en la escala BBCH (primer botón floral visible). Luego, las plantas se colocaron en una jaula entomológica de 100 × 55 × 70 cm dentro de una cámara climática. Se colocó una planta tratada en un extremo de la jaula y una planta control (tratada con agua) en el otro, separándose las plantas a una distancia de 70 cm. La prueba de elección se realizó en condiciones controladas a una temperatura constante de 23°C y un ciclo de luz/oscuridad de 16:8 h.

En cada jaula, se liberaron 25 pulgones alados sobre una placa de Petri colocada en el centro de la jaula, suspendida a unos 35 cm de altura con la ayuda de cables unidos al marco de madera de la jaula (Figura 16). La placa Petri se pintó de color negro para no proporcionar señales visuales a los pulgones a la hora de elegir una planta u otra, con la intención de que la elección fuera solamente por el estímulo olfativo. Los pulgones y las plantas se renovaban todos los días. Las posiciones de la planta control y de la planta tratada se alternaron en cada jaula y en cada réplica para evitar sesgos en las elecciones. En cada réplica se utilizaron seis jaulas. Se realizaron un total de cuatro réplicas (aplicaciones) por tratamiento a la semana (de lunes a jueves). Cada tratamiento fue evaluado en la misma semana. Para cada tratamiento se realizaron un total de 24 repeticiones (jaulas), utilizando 24 plantas control y 24 plantas tratadas, y se liberaron un total de 600 pulgones alados (25 por jaula).



**Figura 16.** Jaula entomológica de 100 × 55 × 70 cm utilizada en el bioensayo de elección (planta control y planta tratada) y placa Petri negra como plataforma de vuelo de los pulgones alados.

A las 24 h, se registraron los individuos alados y las ninfas de cada planta. Para cada tratamiento, se calculó la distribución de las elecciones (expresada en porcentaje), es decir, el número de pulgones adultos que habían elegido la planta tratada o el número de pulgones que habían elegido la planta control dividido por el número total de pulgones que habían elegido cualquier planta. Otro parámetro calculado fue el índice de repelencia (IR en %) calculado con la siguiente fórmula:

$$RI (\%) = [1 - (T/C)] \times 100$$

donde  $T$  es el número de pulgones en la superficie tratada y  $C$  es el número de pulgones en el control 24 h después de la liberación de los individuos alados de *M. persicae*. Para evaluar un posible efecto inhibidor de la reproducción por parte de las nanoemulsiones de bioactivos volátiles sobre las formas aladas de *M. persicae*, se calculó el número medio de ninfas por hembra para cada tratamiento y su control 24 h después de la liberación de individuos alados.

Para el análisis estadístico se utilizó el software R versión 4.2.2. La significación estadística de las diferencias en las elecciones de los individuos alados, entre cada tratamiento y su control, se evaluó mediante una prueba binomial exacta de dos colas, y los porcentajes de elección se representan gráficamente con los intervalos de confianza de Clopper-Pearson al 95%. Para la comparación de medias entre el número de ninfas por hembra para cada tratamiento y su control, se utilizó la prueba  $t$  para muestras pareadas, con un valor  $p \leq 0,05$  como umbral de significación estadística.

## **4. Publicaciones**

Se adjunta a continuación copia de las separatas de los artículos que componen esta tesis doctoral por compendio de publicaciones:

➤ **Publicación 1 (página 77):**

Pascual-Villalobos, M.J., Díaz, I., Martín, F., Canto-Tejero, M., Villora, G., Guirao, P. (2022). Plant bioactive volatile products and their efficiency in aphid control. *Industrial Crops and Products* 183: 114975. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114975>

➤ **Publicación 2 (página 97):**

Martín, F., Garzo, E., Guirao, P., Pascual-Villalobos, M.J., Fereres, A., Moreno, A. (2024). Persistence of nanoemulsions of bioactive volatiles and their impact on aphid feeding behaviour. *Journal of Pest Science* 97: 1-15. <https://doi.org/10.1007/s10340-024-01746-5>

➤ **Publicación 3 (página 130):**

Martín, F., Guirao, P., Pascual-Villalobos, M.J. (2024). Repellent effects of coconut fatty acid methyl esters and their blends with bioactive volatiles on winged *Myzus persicae* (Sulzer) Aphids (Hemiptera: Aphididae). *Insects* 15(9): 731. <https://doi.org/10.3390/insects15090731>

#### 4.1. Publicación 1.

##### Plant bioactive volatile products and their efficiency in aphid control

Industrial Crops & Products (2022) 183: 114975

Factor de impacto: 5,9

Q1

M.J. Pascual-Villalobos<sup>a</sup>, I. Díaz<sup>a</sup>, F. Martín<sup>a</sup>, M. Cantó-Tejero<sup>a</sup>, G. Villora<sup>b</sup>, P. Guirao<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA), C/Mayor s/n, La Alberca, 30150 Murcia, Spain.

<sup>b</sup> Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Campus de Excelencia Internacional Mare Nostrum, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, Spain.

<sup>c</sup> Universidad Miguel Hernández, E.P.S.Orihuela, Carretera de Beniel Km. 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain.

Received 16 September 2021, Revised 5 April 2022, Accepted 7 April 2022, Available online 27 April 2022, Version of Record 27 April 2022

0926-6690/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114975>

#### Abstract

The “farm-to-fork strategy” of the European Union aims to reduce dependency on pesticides and towards increased use of low-risk products, such as those based on botanical extracts. A product based on the mixture of the five natural compounds selected for their repellent or insecticidal properties, namely citral, (E)-anethole, farnesol, cis-jasmone and lemon essential oil, was evaluated against *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Three formulations were prepared using various surfactants at different ratios: the first one with Tween80®, the second one with soy (*Glycine max* (L.) Merr.) lecithin and the third one with soy lecithin and sunflower oil (*Helianthus annuus* L.). The oil-in-water nanoemulsions at 1% were tested in a laboratory study with Petri dishes using a computer-controlled spraying apparatus (equivalent application of 200 l/ha). The mean efficacy was 45%, 71% and 63%, respectively, with a least statistically

significant difference (LSD) at 5% comparing the first two formulations. A field experiment (in two pepper, *Capsicum annuum* L., greenhouses) at Torreblanca Exp. Stat. in Murcia (Spain) followed in April 2020 in which a reduction in aphid populations only occurred by spraying the product formulated with soy lecithin. Phytotoxicity was also observed but was lower in the formulation that contained sunflower oil. Nanoemulsions were characterised using a Zetasizer, and a polydispersion of 2–3 populations of particles, ranging from 15 to 341 nm in size, was found with the Tween80® formulation and bigger sizes (250–438 nm) with the soy lecithin and sunflower oil formulation, which were more stable (Z potential = -28.15 mV). The application of ultrasounds reduces the Z-average to 100 nm in the mixture product with stability for at least 14 days. Another field experiment was repeated in February and April 2021. The plants were sprayed sequentially with the following: a) mixture product at 0.5% formulated with soy lecithin and sunflower oil, b) 3% cottonseed (*Gossypium hirsutum* L.) oil in 3% soap water (Feb.) or 1.5% cottonseed oil in 1.5% soap water (Apr.) and c) cis-jasmone at 0.25% formulated with Tween80®. The treatment with the mixture of bioactive volatiles (a) was not more effective than that of the fixed seed oil (b). In February, the instantaneous population growth rate ( $r_i$ ) of aphid populations showed a significant reduction when the plants were sprayed with cottonseed oil. Further research is recommended for the formulation and application methods of the products being developed.

**Keywords:** Anise, nanoemulsions, essential oils, cottonseed oil, botanical insecticide, *Myzus persicae*

## 1. Introduction

Industrial non-food crops are the source of valuable products that can be used as raw materials in botanical insecticides. Essential oils (EOs) are produced in spices such as anise (*Anethum graveolens* L.) or in waste streams, for instance, in the citrus industry. The selection of active compounds is relevant in research to develop novel applications, but the industry generally uses the available and cheap raw materials. In recent years, aphids have emerged as critical pests for pepper grown under greenhouse conditions in Southeast Spain, causing direct and indirect (due to virus transmission) damage to the crop (personal communication). Chemical agriculture is withdrawing many active substances and is experiencing increasingly fewer effective compounds and resistance is

developing in pests (personal communication). Mineral oils are a common active ingredient used in organic and zero-residue agriculture nowadays, but there is a need to find alternatives, and plant vegetable oils and/or plant extracts are good candidates for this purpose.

Oil in water (O/W) emulsions are receiving attention because of the need to reduce the volatile organic solvents used in emulsifiable concentrates. Nanoemulsions are those in which the particles are in the nanometric scale. The small size of oil droplets provides some interesting properties, such as activity at lower doses or penetration enhancement (Pascual-Villalobos et al., 2017b). Mondal et al. (2017) have published that azomethine-based nanofungicides are twice as effective as conventionally sized azomethines. The surfactants and stabilisers of the formulations play a relevant role in the characteristics and stability of the emulsions. The surfactants adsorb to oil droplet surfaces, reducing the interfacial tension that causes disruption and aggregation, therefore stabilising the emulsions. In some cases, the use of surfactant mixtures (or cosurfactants) improves the preparations by reducing the interfacial tension and increasing the fluidity of the interface. Limpongsa et al. (2019) show the case of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad.) oil and caffeine in cosmetics. There is a tendency to replace synthetic surfactants with natural ones (Bai and McClements, 2016; Schreiner et al., 2020). Among the natural surfactants, we can mention lecithins and saponins. Plant lecithins are complex mixtures of phospholipids and retain oil soluble substances in the lipid bilayer membrane. They are registered as basic substances in EU regulations and can therefore be used in the formulation of plant protection products. Saponins are isolated from the bark of the tree *Quillaja saponaria* Molina (Quillajaceae) or from tea (*Camelia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae) seeds, and rhamnolipids are biosurfactants derived from microorganisms (Bai and McClements, 2016). Natural surfactants from plants can replace synthetic surfactants such as Tween80® and can form and stabilise nanoemulsions. Zhu et al. (2018) reported that with orange (*Citrus sinensis* Osbeck) oil, particle diameters are less than 150 nm. Schreiner et al. (2020) have published that *Quillaja* saponins are more effective alone than in combination with glycerol to form nanoemulsions of sweet almond (*Prunus dulcis* Mill. D.A. Webb.) oil.

In previous works (Pascual-Villalobos et al., 2017a; Cantó-Tejero et al., 2021a), we selected some bioactive compounds against *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) for their repellent or insecticidal properties, namely the following: citral (the blend of two isomers, neral and geranial), (*E*)-anethole (the main compound of aniseed EO), farnesol, *cis*-jasmones and lemon EO (which contains mainly limonene). According to Cantó-Tejero et al. (2021a), the natural compounds farnesol, *cis*-jasmones and (*E*)-anethole are the most *M. persicae*-repellent compounds. The foliar applications of farnesol plus (*E*)-anethole at 0.2% each reduced the aphid population growth rate,  $r_i$  calculated as per the conception of Ribeiro et al. (2014), ( $r_i = -0.78$  at 24 h), and blending both products increased the insecticidal activity although no synergistic effects were obtained. *Cis*-jasmones also had an effect on aphid mortality.

The objective of this work was to characterise nanoemulsions of a product developed through a mixture of active plant compounds and formulated with synthetic or natural surfactants and to test its insecticidal effect in field experiments using the aphid *M. persicae* on pepper crop as a real reference system of agricultural production in Southeast Spain.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Nanoemulsions preparation and characterization**

Five plant-based volatile products – citral, (*E*)-anethole, farnesol, *cis*-jasmones and lemon (*Citrus limon* L.) EO – were used in the experiments. The first four were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), and the fifth was obtained from Citromil S.L. (Santomera, Murcia, Spain). The mixture product combined the five of them in equal amounts. Three formulations were prepared using a high-speed rotor IKA Labor Pilot 2000/4 (IKA-Werke GmbH and Co. Staufen, Germany) (10 min, 7940 rpm, 15 °C): the first one with Tween80® 1:2, the second one with soy lecithin 1:1 and the third one with soy lecithin and sunflower oil 1:1:1. The emulsions were prepared at 5% and then diluted. The nanoemulsions were characterised (particle size distribution and Z potential) using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd.) and a Zetasizer Advance Ultrared (MADLS). In order to test the stability of the samples in storage, a Digital Branson

Ultrasonicator 4500 with a tapered disruptor horn of ½” 400 W was utilised with 30% amplitude for 5 min with 15 s pulses.

## 2.2. Insects

A culture of *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) (a clone with pink colour) was reared in our laboratory on pepper plants (*Capsicum annuum* L., cv. Herminio) in a growth chamber under a 16:8 (L:D) photoperiod at  $25 \pm 1$  °C and 65% relative humidity. Apterous adult females (unsynchronized) were used in the laboratory assay as well as to inoculate plants in the field experiments. Plants were left to evolve to check that before the treatments the number of aphids per plant was not statistically significant different.

## 2.3. Laboratory tests of aphicidal activity

The oil-in-water nanoemulsions of the mixture product at 1% (which contained 0.2% of each of the five pure compounds) were tested in a laboratory study with Petri dishes. The formulations evaluated were 1:2, 1:1 and 1:1:1; see Subsection 2.1 for details. The experimental unit comprised one Petri dish (5 cm diam.) with a pepper leaf on agar and approximately 20 settled aphids. There were thirty replications per treatment. The dishes were sprayed with a computer-controlled spraying apparatus (CCSA, Burkard Ltd.) at 0.345 bar and 6 twists (equivalent application of 200 l/ha). The number of alive and dead aphids was recorded after 1 and 4 days. Data were transformed by arcsin square root prior to analysis. The Henderson-Tilton mean efficacy (of each treatment against the corresponding control) was computed together with the LSD to compare the treatments statistically.

## 2.4. Field experiments

Experiments were conducted for two years at Torreblanca Exp. Stat. in Murcia (Spain), in 2020 and 2021. The methodology used is summarised in Table 1. The effect of spray applications on aphid populations was studied by statistical methods. In 2020, data of the number of alive and dead insects 4 days after treatment were analysed by ANOVA. In addition 95% LSD or box and whisker plots were used to compare formulations with their controls. In 2021, data of the number of alive and dead insects

were analysed by ANOVA and also by Wilcoxon test to compare each treatment with its control. The instantaneous rate of growth increase (ri) of aphid populations (calculated as per the conception of Ribeiro et al., 2014) was analysed as well.

**Table 1. Field experiments (pepper crop cv. Herminio) with bioactive volatile product applications. Methodology.**

| Year 2020                                                                                                                                                     | Year 2021                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2 greenhouses                                                                                                                                                 | 2 greenhouses                                                                                                                                                                                                                                |
| Planting date: 27 January 2020                                                                                                                                | Planting date: 21 October 2020                                                                                                                                                                                                               |
| Month of experiment: April                                                                                                                                    | Months of experiment: February and April                                                                                                                                                                                                     |
| Aphid population before spraying: 28-200 aphids/plant                                                                                                         | Aphid population before spraying: 20-50 aphids/plant                                                                                                                                                                                         |
| Randomised block design with 2 blocks                                                                                                                         | Randomised block design with 2 blocks                                                                                                                                                                                                        |
| Experimental unit: 5 adjacent plants in the same row                                                                                                          | Experimental unit: 2 plants in adjacent rows                                                                                                                                                                                                 |
| Treatments <sup>a</sup> and controls (formulations 1:2; 1:1 and 1:1:1) of mixture product at 1%                                                               | Sequential treatments <sup>a</sup> and controls: a) mixture product (formulation 1:1:1) at 0.5%, b) 3% cottonseed oil in 3% soap water (Feb.) or 1.5% cottonseed oil in 1.5% soap water (Apr.) and c) cis-jasmone (formulation 1:2) at 0.25% |
| Data and analysis: Number of alive insects before the treatment and number of alive and dead insects after 1 and 4 days. ANOVA, LSD and Box and Whisker plots | Data and analysis: Number of alive insects before the treatment and number of alive and dead insects after 1 and 4 days. ANOVA and Wilcoxon test                                                                                             |

<sup>a</sup> Mixture product: O/W nanoemulsion of a mix of citral, (E)-anethole, farnesol, cis-jasmone and lemon essential oil in equal amounts. Formulation 1:2 with Tween80®, 1:1 with soy lecithin and 1:1:1 with soy lecithin and sunflower oil. Controls contained just the corresponding surfactants and water.

### 3. Results

#### 3.1. Characterisation of nanoemulsions

In Table 2, a summary of the results is shown. A polydispersion was found of 2–3 populations of particles ranging from 10 to 341 nm in size with the 1:2 formulation as well as bigger sizes (250–434 nm) with the 1:1:1 formulation, which had a more stable (Z potential = -28.78 mV) product. The polydispersity index (PdI) was within the range of 0.401–0.753 for the 1:1:1 formulation and 0.298–0.802 for the 1:2 formulation. Such values indicate polydisperse samples except for the control with just Tween80® (formulation 1:2) and the dilutions 2%, 1% and 0.25% in which PdI < 0.3. The particle

concentration (no./ml) for the nanoemulsions at 1% ranged from  $8.1 \times 10^{10}$  to  $7.0 \times 10^{15}$  in the samples that were measured.

**Table 2. Characterisation of O/W nanoemulsions of the mixture product<sup>a</sup>.**

| Product                                                 | Concentration (%)    | Z average (nm) | PdI          | Peaks <sup>b</sup> (%) | Size (nm)          | Pot Z (mV) | Particles/ml           |                        |                      |                        |
|---------------------------------------------------------|----------------------|----------------|--------------|------------------------|--------------------|------------|------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| Formulation 1:1:1 (with soy lecithin and sunflower oil) |                      |                |              |                        |                    |            |                        |                        |                      |                        |
| Mixture <sup>c</sup>                                    | 5                    | 434 ± 10,9     | 0,725        | 85<br>15               | 559<br>4671        | -28,78     | 7,0 x 10 <sup>15</sup> |                        |                      |                        |
|                                                         | 1                    | 254 ± 3,132    | 0,429        | 55<br>39<br>6          | 490<br>143<br>4733 |            |                        |                        |                      |                        |
|                                                         |                      |                |              | 0,25                   | 216 ± 2,974        |            |                        | 0,401                  | 84<br>16             | 259<br>2474            |
|                                                         |                      |                |              |                        |                    |            |                        |                        | Control <sup>d</sup> |                        |
|                                                         | Control <sup>d</sup> | 5              | 324 ± 16,918 | 0,512                  | 80<br>13<br>7      |            |                        | 424<br>4035<br>61      | -28,15               | 8,1 x 10 <sup>10</sup> |
|                                                         |                      | 2              | 394 ± 19,568 | 0,753                  | 42<br>37<br>21     |            |                        | 591<br>180<br>4541     |                      |                        |
| 1                                                       |                      |                |              |                        | 250 ± 8,876        | 0,533      | 82<br>18               | 295<br>3550            |                      |                        |
|                                                         |                      |                |              |                        |                    |            | 0,25                   | 282 ± 1,531            |                      |                        |
| Formulation 1:2 (with Tween80®)                         |                      |                |              |                        |                    |            |                        |                        |                      |                        |
| Mixture <sup>c</sup>                                    |                      | 5              | 303 ± 12,319 | 0,729                  | 80<br>7            | 336<br>74  | -17,17                 | 5,8 x 10 <sup>12</sup> |                      |                        |
|                                                         | 1                    | 70 ± 7,069     | 0,802        | 75<br>20               | 179<br>16          |            |                        |                        |                      |                        |
|                                                         |                      |                |              | 0,25                   | 201 ± 61,768       | 0,298      |                        |                        | 63<br>37             | 161<br>15              |
|                                                         | Control <sup>d</sup> |                |              |                        |                    |            |                        |                        |                      |                        |
| Control <sup>d</sup>                                    | 5                    | 341 ± 21,764   | 0,667        | 85<br>8                | 405<br>5169        | -7,29      | 3,7 x 10 <sup>15</sup> |                        |                      |                        |
|                                                         | 2                    | 10 ± 0,194     | 0,294        | 87<br>10               | 9<br>650           |            |                        |                        |                      |                        |
|                                                         |                      |                |              | 1                      | 10 ± 0,044         |            |                        | 0,268                  | 88<br>12             | 10<br>1452             |
|                                                         | 0,25                 | 121 ± 92,442   | 0,298        |                        |                    |            |                        |                        | 83<br>15             | 9<br>285               |

<sup>a</sup> Particle size and PdI were measured with a Zetasizer Nano ZS. Z potential and particles/ml were measured with a Zetasizer Advance Ultrared (MADLS).

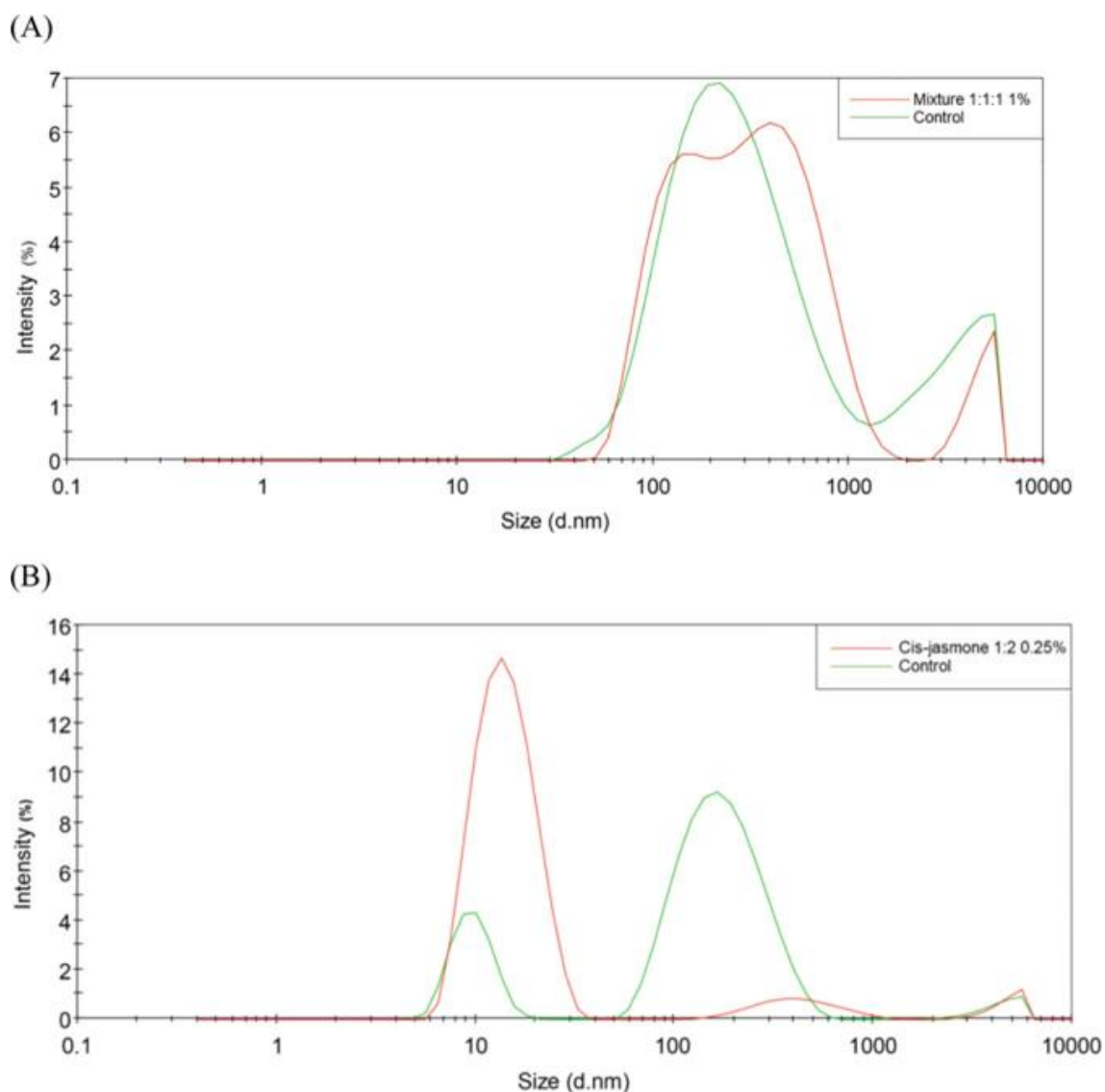
<sup>b</sup> Only peaks with > 5% in intensity were included.

<sup>c</sup> The mixture contained five bioactive products ((E)-anethole, cis-jasmone, citral, farnesol and lemon essential oil) in equal amounts. The emulsions were prepared at 5% and then diluted.

<sup>d</sup> Control was prepared the same, except the bioactive products.

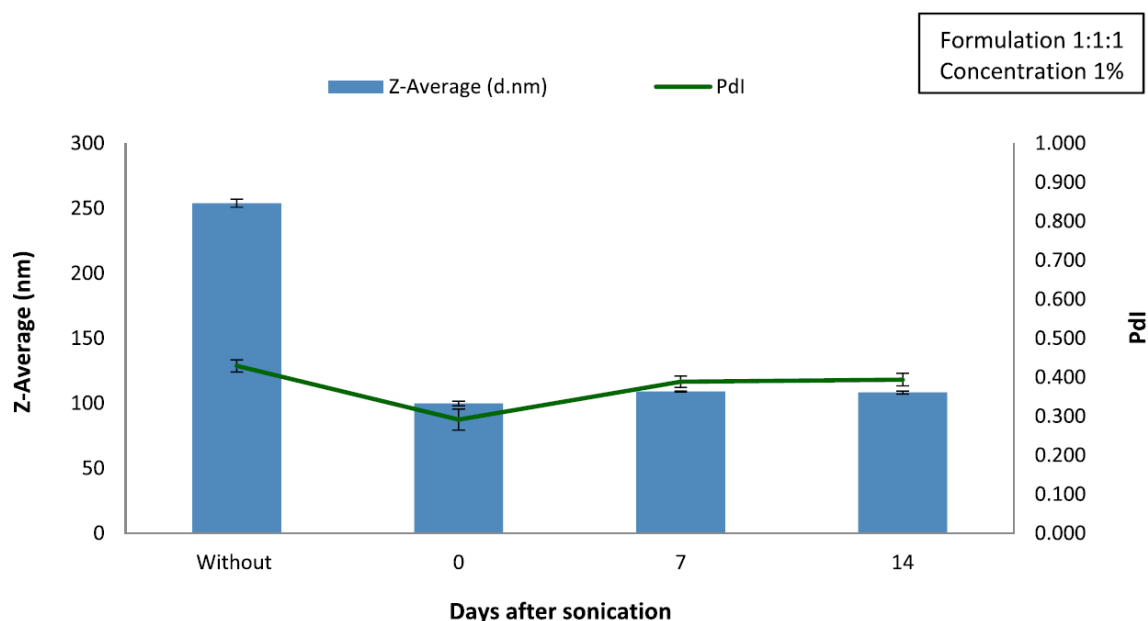
In Fig. 1A, the particle size distribution for the nanoemulsion of the mixture product (formulation 1:1:1) at 1% indicates main peaks of particles 490 nm and 143 nm in size, while the control has one main peak of 295 nm particles. In both cases, however, less frequent populations of particles, over 3500 nm in size, were present.

In addition, it was observed that cis-jasmone presented a good emulsion with Tween80® (1:2), with 15 nm particles and a PdI = 0.289 (compared to 353 nm and PdI = 0.486 of the formulation 1:1:1), see Fig. 1B.



**Fig. 1. Particle size distribution by intensity. (A) Mixture product at 1% and control nanoemulsions with formulation 1:1:1. (B) Cis-jasmone at 0.25% and control nanoemulsions with formulation 1:2.**

The application of ultrasounds (Fig. 2) reduces the Z-average from 252 nm to 100 nm in the mixture product (formulation 1:1:1) with stability for at least 14 days. Therefore, in order to fabricate nanoemulsions with smaller particle sizes, the application of ultrasounds offers an advantage.



**Fig. 2. Z-average and polydispersity index (PDI) by DLS of nanoemulsions of the mixture product (formulation 1:1:1) at 1% with and without application of ultrasounds and storage for seven or fourteen days.**

### 3.2. Aphicidal activity in laboratory tests

Fig. 3 shows the efficacy of formulations 1:2 (Tween80®), 1:1 (soy lecithin) and 1:1:1 (soy lecithin and sunflower oil); the Henderson- Tilton efficacy for each was 45%, 71% and 63%, respectively, with an LSD statistically significant at 5% for the first compared to the last two formulations (Fig. 4). In the Petri dishes bioassay, the mixture product had a better insecticidal effect when soy lecithin was used in the formulation.

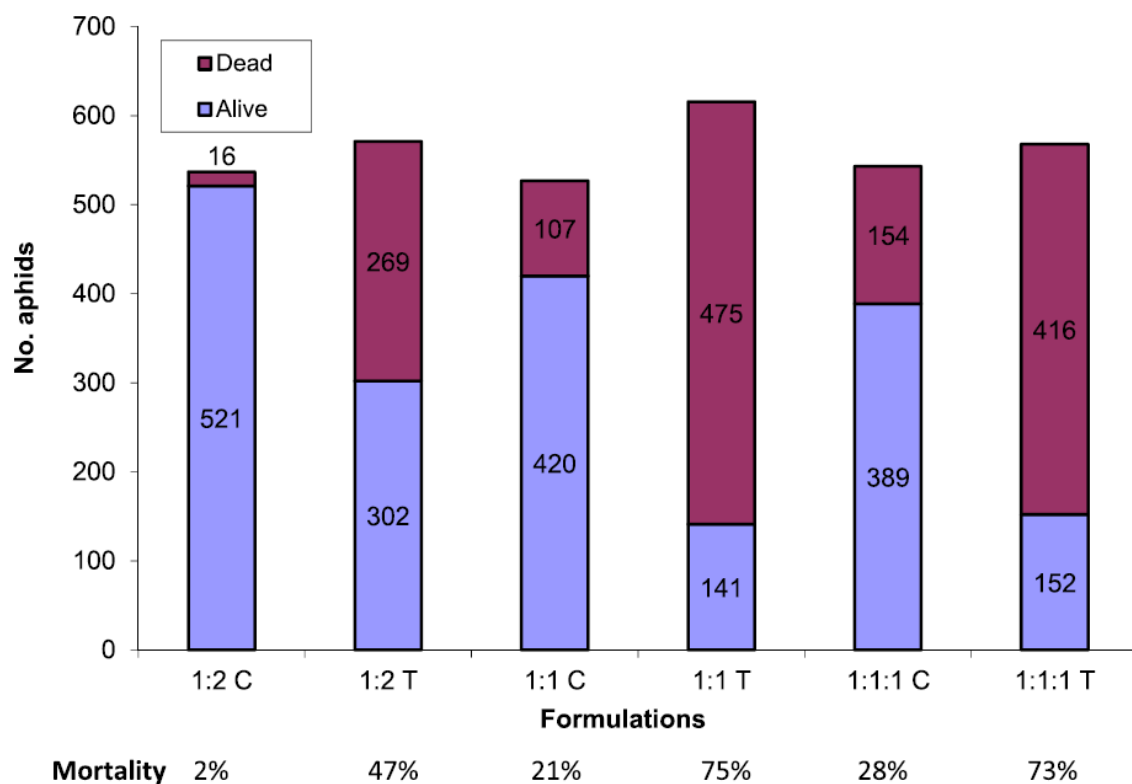


Fig. 3. Number of alive and dead adults and percentage of mortality four days after spraying O/W nanoemulsions of the mixture product at 1% with 3 formulations to Petri dishes with *Myzus persicae* (n = 30 and approximately 20 aphids/dish).

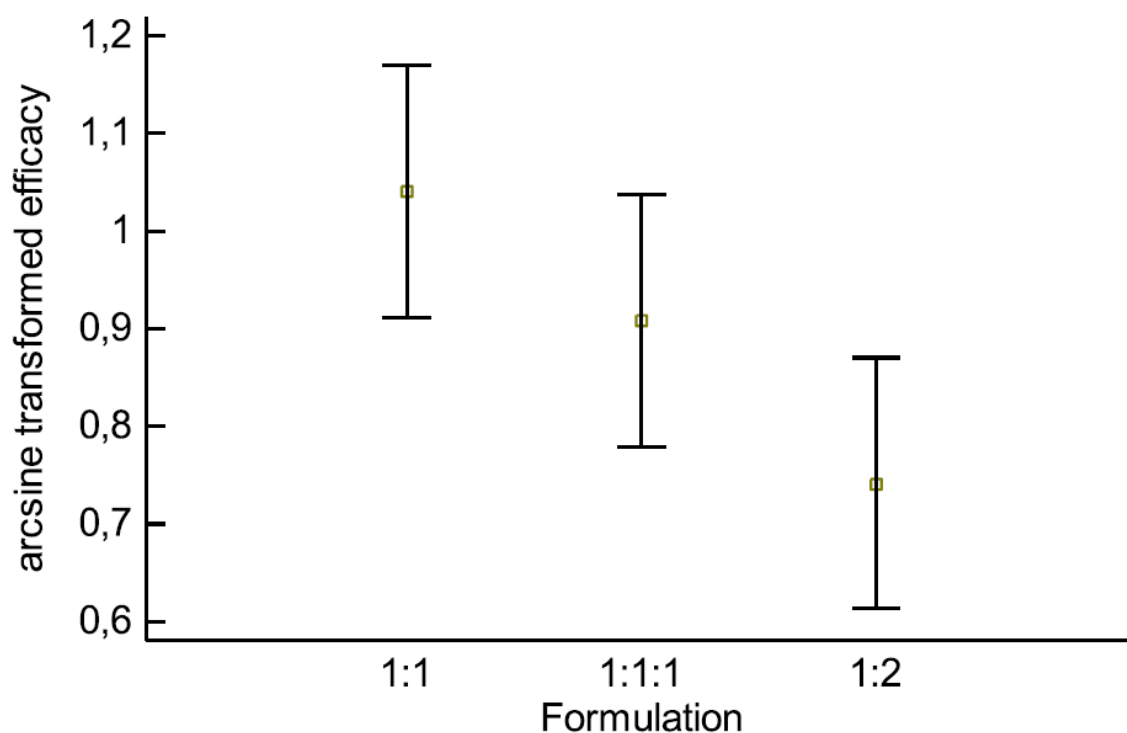
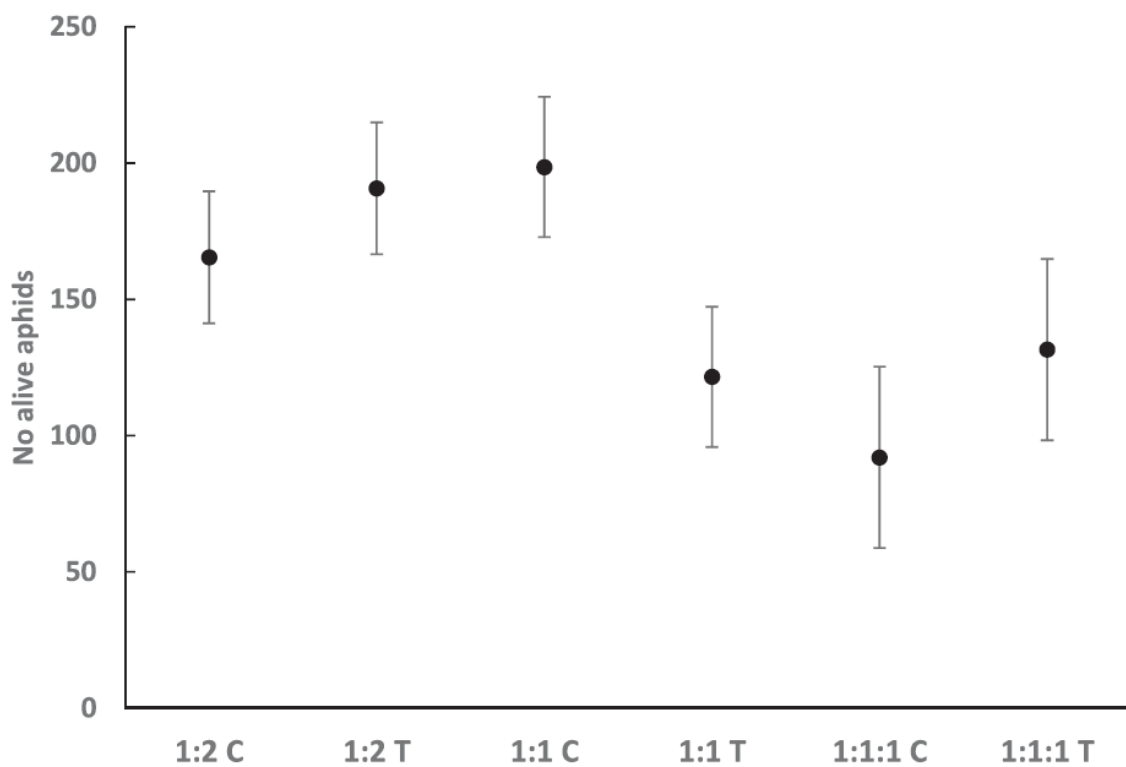


Fig. 4. Means and 95% LSD Intervals of the data (arcsine square root transformation), four days after treatment, from the Petri dishes with *Myzus persicae* settled on pepper leaf and sprayed with the mixture product at 1%.

### 3.3. Field experiments

#### 3.3.1. Year 2020

The field experiment (in two pepper greenhouses) in April 2020 resulted in a reduction in aphid populations by spraying the mixture product at 1% formulated with soy lecithin (1:1); therefore, this was consistent with the results of the efficacy test in the laboratory (see Subsection 3.2). In Fig. 5, we see the statistically significant difference between the number of alive insects in the treatment and control groups four days after spraying (formulation 1:1). The Kruskal–Wallis test ( $K = 5.451$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.0195$ ) was significant. No differences were obtained for the other two formulations (Fig. 5). Mortality was also increased by spraying the product (in all three formulations); however, a larger number of dead aphids were recorded with the Tween80® formulation (1:2). See the plate in Fig. 6 of a pepper leaf with the dead aphids. The Box and Whisker plot in Fig. 7 shows the statistically significant difference in the number of dead aphids between treatment and control (formulation 1:2) four days after spraying ( $F = 18.62$  \*\*). No differences were obtained for the other two formulations (Fig. 7). Phytotoxicity was also observed in the crop: slight drying of leaf tips and flower petals in some cases or dry mottled spots in the leaves. However, no damage was observed in the pepper fruits. Such symptoms were evident with both the 1:2 and the 1:1 formulations but not with the 1:1:1 formulation. If the application dose was reduced from 1% to 0.5% or even 0.25%, there was less insecticidal effect and phytotoxicity. Therefore, the 1:1:1 formulation (soy lecithin and sunflower oil) was selected for the field experiments in the following year (2021), as it had a balanced performance with a reduction in aphid populations and less phytotoxicity for the crop.



**Fig. 5.** Field experiment 2020: means and 95% LSD intervals of number of alive aphids (*Myzus persicae*) 4 days after treatment with the mixture product at 1% with 3 formulations.



**Fig. 6.** Aphid mortality spraying O/W nanoemulsions of the mixture product at 1%.

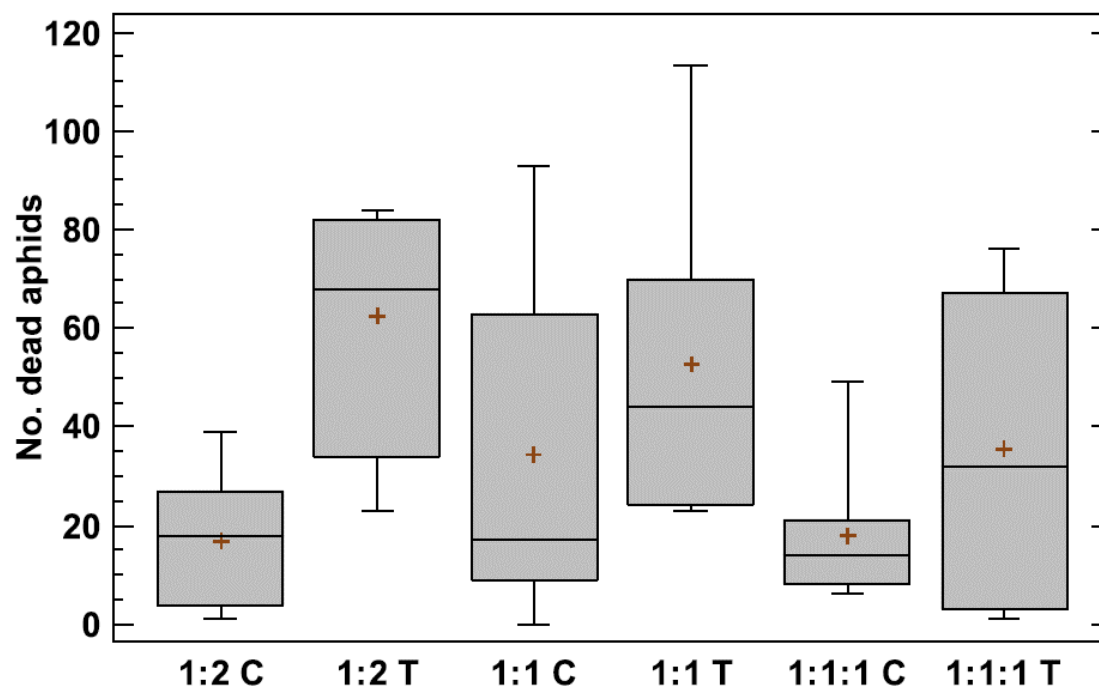
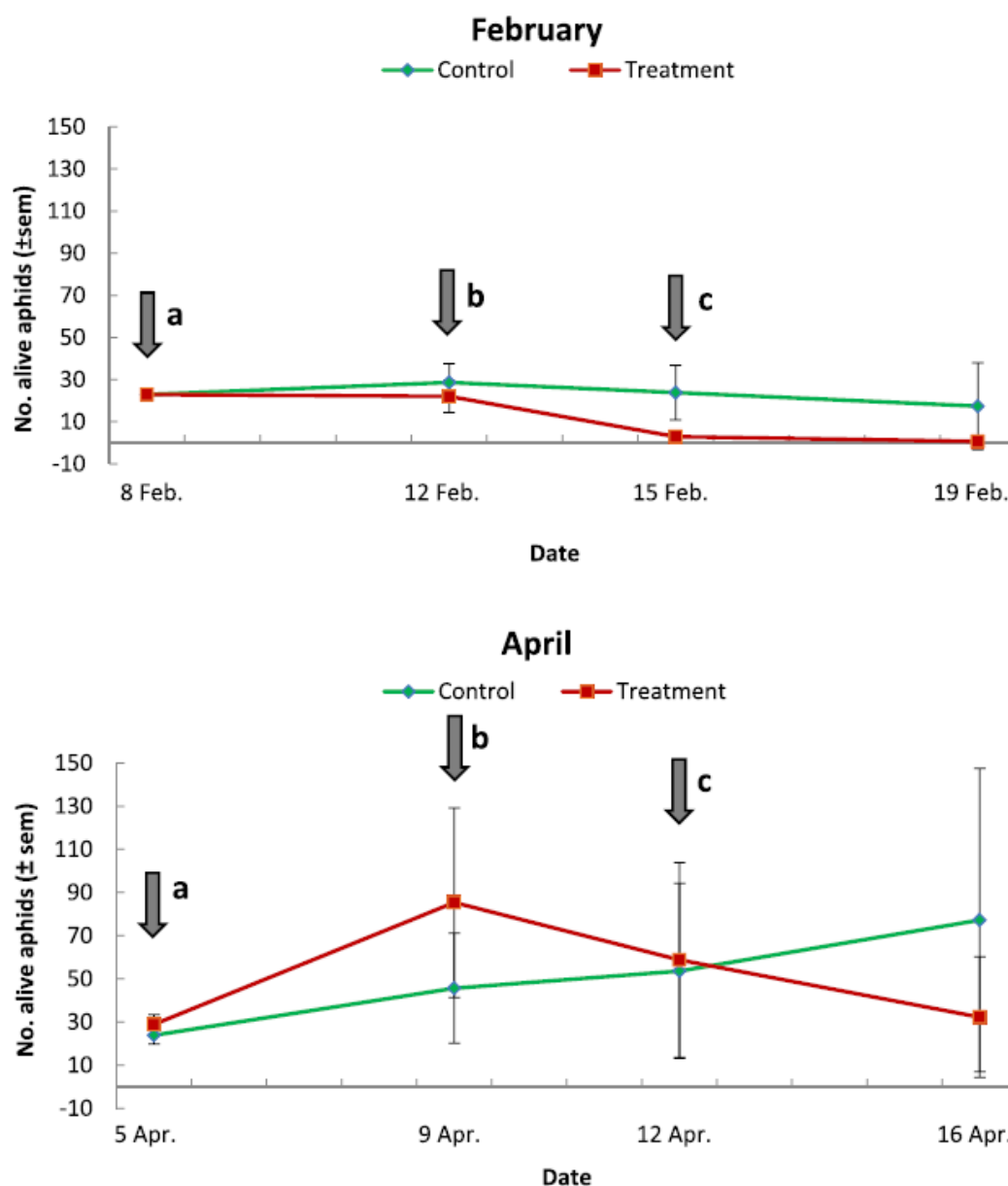


Fig. 7. Field experiment 2020: Box and Whisker plot of dead aphids (*Myzus persicae*) 4 days after treatment with the mixture product at 1% with 3 formulations.

### 3.3.2. Year 2021

For the field experiment in 2021, in two pepper greenhouses, we infested plants with aphids, but the initial populations were kept lower (20–50 aphids/plant) than the previous year (28–200 aphids/plant), otherwise the pest populations would increase exponentially, making it difficult to draw any conclusion regarding the effects of the treatments. In Fig. 8, an overview of the results is graphed for February and April. The same plants were sprayed sequentially (every 4 days) with the following: a) mixture product formulation 1:1:1 at 0.5% applied to the air (not directly to the plants to avoid phytotoxicity), b) 3% cottonseed oil in 3% soap water (Feb.) or 1.5% cottonseed oil in 1.5% soap water (Apr.) (directly to the plants) and c) cis-jasmone formulation 1:2 at 0.25% (directly to the plants). The corresponding controls were treated in the same manner except for the application of bioactives. In February, a reduction in alive aphids throughout the observation period was obtained for the treatments in comparison to the controls, whereas there was no insecticidal effect after the first treatment in April but was later noted after the second and third treatments. Overall, the first treatment, with the mixture of bioactive volatiles at 0.5% sprayed to the air (a) to reduce pests while avoiding phytotoxicity, was not statistically different from its corresponding control, and neither was it different from that of the vegetable fixed oil sprayed on the plants (b).

In February, the instantaneous rate of growth increase (ri) of aphid populations showed a significant reduction when the plants were sprayed with the cottonseed oil: the Wilcoxon test presented  $W = 64$  ( $P = 0.0009^{***}$ ) and ANOVA gave  $F = 48.8$  ( $df = 1, 13$ ;  $p < 0.000009$ ); in April, there was no statistically significant difference but it was close to 5% ( $W = 49$ ,  $P = 0.083$  and  $F = 4.12$ ,  $df = 1, 13$ ;  $P = 0.0633$ ). In addition, cis-jasmone spraying (c) in February (albeit with data variability) produced aphid mortality as well ( $W = 7$ ,  $P = 0.0322^*$  and  $F = 5.28$ ,  $df = 1, 13$ ;  $P = 0.0422$ ).



**Fig. 8.** Field experiment 2021 (pepper crop cv. Herminio) with sequential spraying of treatments: a) mixture product (formulation 1:1:1) at 0.5%, b) 3% cottonseed oil in 3% soap water (Feb.) or 1.5% cottonseed oil in 1.5% soap water (Apr.) and c) cis-jasmone (formulation 1:2) at 0.25%.

Table 3 presents data on average aphid mortality. In February, an aphicidal effect was produced in all treatments with mortality values over 80% after spraying with cottonseed oil at 3% or cis-jasmone at 0.25%. In April, such effects were much lower but with a statistically significant difference for cottonseed oil at 1.5%.

**Table 3. Aphid mortality (%) ( ± SEM) after 4 days of application (Field experiment 2021).**

|                  | February       |             | April       |          |
|------------------|----------------|-------------|-------------|----------|
|                  | Treatment      | Control     | Treatment   | Control  |
| Mixture producto | 30,3 ± 8,49    | 24,1 ± 6,54 | 0 ± 0       | 1 ± 0,63 |
| Cotton seed oil  | 82,0 ± 5,40*** | 18,3 ± 2,69 | 20 ± 5,32** | 2 ± 1,97 |
| Cis-jasmone      | 83,3 ± 16,67*  | 9,7 ± 2,61  | 14 ± 12,29  | 1 ± 1,03 |

Wilcoxon test to compare treatment and control. Values for statistically significant treatments: W = 0 (P = 0.000931) or W = 4 (P = 0.002571) for cotton seed oil in Feb. or Apr. and W = 7 (P = 0.02862) for cis-jasmone in Feb.

#### 4. Discussion

The particle size of nanoemulsions depends on the respective bioactive compounds, surfactants and stabilisers used and the method of fabrication. Riquelme and Arancibia (2019) reported that saponins improve Pdl and Z potential but are less effective at reducing particle size. In our experiment, if fixed oils were used – e.g. sunflower oil in the 1:1:1 formulation or glycerol in the 1:2:1 formulation previously reported (Pascual-Villalobos et al., 2017a) – the overall particle size increased, but the stability of the product improved as well. On the other hand, the use of ultrasound resulted in smaller sizes and stability over time. Increasing the amount of surfactant is a way to reduce the particle size of a nanoemulsion (Jaworska et al., 2013); however, an excessive amount may be detrimental to the delivery of entrapped bioactives, as Chuacharoen et al. (2019) indicated for curcumin in milk.

Mixing several compounds in one product may offer some advantages such as in the case of combining insecticidal, repellent or other effects in a botanical agent, but it can potentially make obtaining a monodisperse nanoemulsion more complicated. The hydrophilic lipophilic balance (HLB) of the oil phase has to be obtained experimentally, and the choice of surfactants should match such a value for a stable emulsion. Parra Barona (2018) tested different mixtures of Tween80® and Span80 with Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. The encapsulation of a bioactive is important in

formulations; for instance, Ge and Ge (2015) pointed out that for *Melaleuca alternifolia* Maiden & Betche ex Cheel (tea tree) oil, preservation from light, oxygen and temperature is required and, in addition to that, a slow release is produced compared to unformulated tea tree oil. Another advantage of mixing compounds is reducing the Ostwald ripening (the solubilisation of small oil droplets in water due to the high Laplace pressure) which increases the size of emulsion particles over time, because some of them may act as ripening inhibitors.

Weekly sprays of citral or anise essential oil at 0.2% prevented natural infestations of aphids in a pepper crop, and curative applications of the two products together reduced aphid populations (Pascual-Villalobos et al., 2019). Such products, although less effective than pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* Trevir. Sch. Bip.), proved to be safer for natural enemies. Other authors (Erlina et al., 2020; Lina et al., 2020) have also presented insights on botanical insecticides: the nanoemulsion of *Piper aduncum* L. (Piperaceae) fruit (which contains the phenyl-propanoid dilapiol) at 0.5–5% has residual toxicity in the cabbage larvae *Crociodolomia pavonana* F. (Lepidoptera: Crambidae), reducing the growth of the larvae.

The literature reports that farnesol or (E)-anethole nanoemulsions are more active (Repellency Index of 47.1–60.8 or 25.8–59.6, respectively) if formulated with soy lecithin (Pascual-Villalobos et al., 2019). In the field experiments presented herein, the reduction in aphid populations was clear when soy lecithin was used in the formulation of the bioactive mixture product spray at 1%. The mortality of aphids tended to be greater for formulations with Tween80® or soy lecithin, but crop phytotoxicity was more pronounced in those cases as well. However, when sunflower oil was used in the formulation, there were much fewer phytotoxic symptoms. To slow down the spread of aphids in the crop by applying the bioactive volatile product, we had to avoid large populations (over 200 aphids/plant) as a starting point because botanical products do not produce 100% mortality and the insects remaining alive propagate fast in numbers. In addition, earlier applications in the season (winter) have more efficacy than those later in spring when we would have the optimal environmental conditions for fast aphid reproduction.

In other experiments, we did not obtain phytotoxic effects in pepper if the bioactive volatiles were sprayed at 0.2%. Recently, Cantó-Tejero et al. (2021b) observed that application of (E)-anethole against *Nasonovia ribisnigri* Mosley (Hemiptera: Aphididae) in lettuce at doses of 0.2–0.4% presented efficacies over 43% without phytotoxicity and allowed the presence of biological control agents (ladybirds and syrphids) that were not seen in the plots treated with pyrethrum.

Our results indicate that sprays of cis-jasmone at 0.25% have aphicidal activity. In previous works (Pascual-Villalobos et al., 2017a), we obtained repellency (R.I. 58.6) of cis-jasmone to *Rhopalosiphum padi* L. (Hemiptera: Aphididae) at 0.02 µl/cm<sup>2</sup>.

The tested product of bioactive volatiles has potential, but there is room for improvement concerning the formulations. So far, the application of fixed oils (e.g. cottonseed oil tested in the field experiment in 2021) as an insecticidal spray was better, but new alternatives are needed and will be pursued by our group in future research.

## **5. Conclusions**

The plant bioactive volatile products tested present promising efficacy against aphids. Although formulations with soy lecithin and Tween80® were more active than the formulation with sunflower oil and soy lecithin, the latter one was safer to spray on the pepper crop to avoid phytotoxicity

More research is needed on the formulation and application method to produce better results in aphid control and to eliminate the phytotoxic side effect being observed. The selection of the appropriate surfactants depends on the active ingredient properties and should provide small particle sizes, a low PdI, a large Z potential value and maintenance of its characteristics after dilution.

## **Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

This work has been funded by the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA) with the project RTA2017- 00022. Manuel Cantó and Félix Martín were awarded the predoctoral scholarships INIA CPD2016-0092 and INIA PRE2018-084296, respectively.

## References

- Bai, L., McClements, D.J., 2016. Formation and stabilization of nanoemulsions using biosurfactants: rhamnolipids. *J. Colloid Interface Sci.* 479, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.06.047>.
- Cantó-Tejero, M., Casas, J.L., Marcos-García, M.A., Pascual-Villalobos, M.J., Florencio-Ortiz, M.V., Guirao, P., 2021a. 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>.
- Cantó-Tejero, M., Pascual-Villalobos, M.J., Guirao, P., 2021b. Aniseed essential oil botanical insecticides for the management of the lettuce aphid. In: 32nd AAIC Annual Meeting, 2021. Bologna, Italy, p. 12 (Book of abstracts).
- Chuacharoen, T., Prasongsuk, S., Sabliov, C.M., 2019. Effect of surfactant concentrations on physicochemical properties and functionality of curcumin nanoemulsions under conditions relevant to commercial utilization. *Molecules* 24 (15), 2744. <https://doi.org/10.3390/molecules24152744>.
- Erlina, L.H., Lina, E.C., Reflinaldon, Djamaan, A., Arneti, A., 2020. Insecticidal activity of nanoemulsion of *Piper aduncum* extract against cabbage head caterpillar *Crociodolomia pavonana* F. (Lepidoptera: Crambidae). *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 468, 012001.
- Ge, Y., Ge, M., 2015. Distribution of *Melaleuca alternifolia* essential oil in liposomes with Tween80 addition and enhancement of in vitro antimicrobial effect. *J. Exp. Nanosci.* 11 (5), 345–348. <https://doi.org/10.1080/17458080.2015.1065013>.

Limpongsa, E., Srisuk, P., Jaipakdee, N., 2019. Preparation and characterization of grapefruit oil base microemulsions of caffeine. *Int. J. Appl. Pharm.* 11 (2), 231–238. <https://doi.org/10.22159/ijap.2019v11i2.30958>.

Lina, E.C., Erlina, L.H., Syahrawati, My, Djamaan, A., Arneti, A., 2020. Botanical insecticide nanoemulsion of *Piper aduncum* extract to control cabbage head caterpillar *Crocidolomia pavonana* F. (Lepidoptera: Crambidae). *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 583, 012023.

Mondal, P., Kumar, R., Gogoi, R., 2017. Azomethine based nano-chemicals: development, in vitro and in vivo fungicidal evaluation against *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. *Bioorg. Chem.* 70, 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.12.006>.

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

Pascual-Villalobos, M.J., Guirao, P., Cantó-Tejero, M., Díaz-Baños, F.G., Villora, G., 2017b. Las nanoemulsiones como alternativa a los concentrados emulsionables de uso insecticida. X Congreso Nacional de Entomología Aplicada (XVI Jornadas de la SEEA), Logroño 16–20 de octubre de 2017. Libro de abstracts p. 61.

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 (chapter 9). In: Koul, O. (Ed.), *Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives*. Academic Press Elsevier Inc., UK, pp. 223–248.

Parra Barona, D.M., 2018. Evaluación del efecto de la proporción de la fase oleosa en la estabilidad física de las emulsiones tipo O/W a base de aceite de Sacha inchi y agua. Trabajo de Grado, Universidad ICESI, Facultad de Ciencias Naturales. Programa de Química Farmacéutica. Santiago de Cali, Colombia.

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.

Riquelme, N., Arancibia, C., 2019. Obtención de nanoemulsiones utilizando saponinas de quillay como sustituto de un surfactante sintético. Mundo Nano 12 (23). <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2019.23.67654>.

Schreiner, T.B., Santamaría Echart, A., Ribeiro, A., Peres, A.M., Dias, M.M., Pinho, S.P., Barreiro, M.F., 2020. Formulation and optimization of nanoemulsions using the natural surfactant saponin from *Quillaja* bark. Molecules. <https://doi.org/10.3390/molecules25071538>.

Zhu, Z., Wen, Y., Yi, J., Cao, Y., Liu, F., McClements, D.J., 2018. Comparison of natural and synthetic surfactants at forming and stabilizing nanoemulsions: tea saponin, quillaja saponin and Tween80. J. Colloid Interface Sci. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.024>.

## 4.2. Publicación 2.

### **Persistence of nanoemulsions of bioactive volatiles and their impact on aphid feeding behaviour**

Journal of Pest Science (2024) 97: 1-15

Factor de impacto: 4,3

Q1

Félix Martín<sup>1,3</sup> · Elisa Garzo<sup>2</sup> · Pedro Guirao<sup>3</sup> · María Jesús Pascual-Villalobos<sup>1</sup> · Alberto Fereres<sup>2</sup> · Aranzazu Moreno<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA), C/Mayor s/n, La Alberca, 30150 Murcia, Spain.

<sup>2</sup> Instituto de Ciencias Agrarias (ICA-CSIC), c/Serrano 115-bis, 28006 Madrid, Spain

<sup>3</sup> Universidad Miguel Hernández, E.P.S.Orihuela, Carretera de Beniel Km. 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain.

Received: 7 November 2023 / Revised: 15 December 2023 / Accepted: 11 January 2024 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2024

<https://doi.org/10.1007/s10340-024-01746-5>

### **Abstract**

*Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) are two of the most significant aphid species acting as vectors for plant viruses in vegetable crops worldwide. This work provides new knowledge relating the persistence (including population growth and survival) and impact on aphid probing and feeding behaviour of plant essential oil-derived products. Modifications in *M. persicae* behaviour (EPG results) were noted in plants treated with 0.2% nanoemulsions of distilled lemon oil: (1) the non-probing activity lasted longer, (2) both non-phloematic probing and phloem ingestion activities of aphids were shorter, and (3) xylem ingestion activity and the time taken to achieve sustained phloem ingestion appear to be longer. Finally, a slight increase was also observed in the mean duration of the non-probing activity of *M. persicae* on plants treated with 0.2%

nanoemulsions of farnesol. When pepper plants were sprayed with a 0.2% nanoemulsion of farnesol with Tween80® (1:2), the population growth of *M. persicae* colonies on treated plants was slower (40 aphids/plant) than on controls (60 aphids/plant) up to the day seven. The slope of the aphid population growth line corresponding to the formulated mixture of bioactive volatiles was lower (2.26 b) and statistically significant in comparison with the control (7.09 a), probably due to a controlled-release effect up to day 14. No systemic effects were obtained for the bioactive volatiles tested.

**Keywords:** Farnesol · Lemon essential oil · *Citrus limon* · (E)-anethole · *Pimpinella anisum* · *Myzus persicae* · *Aphis gossypii* · Botanical insecticides

### Key message

- Distilled lemon oil has a disruptive effect on the feeding of *Myzus persicae*.
- Population growth of *M. persicae* was lower when the pepper plants were treated with farnesol.
- No systemic effects were obtained for the bioactive volatiles tested.
- No effects of any of the essential oils tested were observed on the probing behaviour of *Aphis gossypii* on melon plants.

### Introduction

Aphids (Hemiptera: Aphididae) are one of the most important crop pests. There are more than 5000 species of Aphididae in the world (Remaudiere and Remaudiere 1997). Of these, about 450 species have been recorded on crop plants (Blackman and Eastop 2000). Direct damage is caused by aphid feeding and the honeydew they secrete, and indirect damage as the main vectors of plant viruses (circulative and non-circulative) (Matthews and Hull 2002; Blackman and Eastop 2017). The cotton aphid *Aphis gossypii* Glover and the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer) are the principal pests of open-field melon crops and protected pepper crops in southeastern Spain (Garcia-Mari et al., 1994; Perez et al., 2003; Sanchez et al., 2011). These two species, amongst others, are highly efficient at transmitting cucumber mosaic virus (CMV, Cucumovirus) in a non-persistent way both on melon and pepper, and cucurbit aphid-borne yellow virus (CABYV, Polerovirus) which affects melon crops in the Murcia region (Spain) in a

persistent way (Lebonne et al., 1982; Lecoq et al., 1992; Garzo et al., 2004; Kassem et al., 2013). *Myzus persicae*, on the other hand, is considered the most efficient vector of other important plant viruses, such as broad bean wilt virus (BBWV, Fabavirus) and potato virus Y (PVY, Potyvirus), the latter also being transmitted by *A. gossypii*, and both viruses are transmitted in a non-persistent way in pepper crops (Feres et al., 1993; Lisa and Boccardo 1996).

In organic pepper crops in Campo de Cartagena (Murcia, southeast Spain), aphids have been a serious problem in recent years. With the conversion from conventional to organic farming, no synthetic chemical insecticides are applied, and secondary aphid species have become a major problem. In some cases, biological control alone is failing to keep their populations low, and therefore, there is a need to develop new and effective tools to reduce their populations.

In crop protection, plant-derived products are used due to their low toxicity to natural enemies, safety for humans, rapid biodegradability, and favourable marketing status given restrictions on the use of conventional insecticides (Gahukar 2014). Several studies show that essential oils and their compounds affect the physiological, nutritional, and behavioural processes of insects. They cause mortality, are antifeedants, oviposition deterrents and growth regulators, have ovicidal properties, and reduce the fertility of insects, as well as having fungicidal properties and/or preventing root penetration by nematodes (Isman 2000; Regnault-Roger 2013; Park and Tak 2016; Nollet and Rathore 2017; Ngegba et al., 2022). In spite of this, essential oils are not widely used in agriculture (Nollet and Rathore 2017; Rathore 2017; Butnariu and Sarac 2018). In aphids, farnesol (Gutierrez et al., 1997) was found to inhibit the settlement of *M. persicae*. In a previous study (Pascual-Villalobos et al., 2017), we also demonstrated that both farnesol and anise inhibited the settlement of *Rhopalosiphum padi* L. (Hemiptera: Aphididae), in a choice test on barley leaves, and we observed a mortality rate of 32.5% attributable to the volatiles and/or the residual effect of farnesol. Later, we also showed that anise, (E)-anethole, and farnesol inhibited the settlement of *M. persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera: Aphididae) in a choice test with pepper leaves (Canto-Tejero et al., 2022a). On the other hand, a study on the feeding behaviour of *M. persicae* on Chinese cabbage plants treated with farnesol concluded that this sesquiterpenoid does

not prevent feeding, but did inhibit settlement in a choice test (Wroblewska-Kurdyk et al., 2020). Recent publications (Canto-Tejero et al., 2022a, b, c) indicate farnesol has a promising level of contact toxicity against *M. persicae* on pepper and against *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Hemiptera: Aphididae) on lettuce in greenhouse and field experiments. Spraying at doses of 0.2–0.6%, aphid mortality rates ranged between 30 and 70%. For the latter aphid species, anise oil and/or (E)-anethole were even more effective. However, the systemic effect of natural chemicals remains to be studied.

Numerous oily insecticides are available as emulsifiable concentrates for use in phytosanitary treatments; however, they contain organic solvents. Alternatively, such products can be formulated as oil-in-water emulsions using emulsifiers or surfactants. The development of nanoemulsions represents a step forwards. Such emulsions are formed using high-energy procedures by which one of the liquids is dispersed in the other as nanoscale droplets (ranging in size from 10 to 500 nm and surrounded by surfactant) (Anton and Vandamme 2011). Nanoemulsions have great potential in agriculture since they achieve a more even distribution of the active ingredient per unit volume applied, which translates into an increase in efficacy per unit area treated. A concentrated nanoemulsion for phytosanitary use would allow dilution with water at the time of application without affecting the size and distribution of essential oil particles in the mixture (Khandelwal et al., 2016). Therefore, nanoemulsions of insecticidal substances of botanical origin represent an emerging technological development that could offer greater efficacy, durability, and reductions in the current amount of active ingredients used.

Most studies on aphids and insecticides focus on mortality, control of insecticide resistance, and behavioural responses related to interference with virus transmission. Very little is known about the possible effects of the application of nanoemulsions of botanical-based insecticides on the feeding behaviour of aphids. The mode of action of essential oils is not well-known. Thus, it is important to investigate whether they can have a knockdown or repellent effect on aphids or interfere with their feeding behaviour. In this context, to understand the effect of essential oils on aphid feeding behaviour, we used the electrical penetration graph (EPG) technique (Tjallingii 1985; Tjallingii et al., 2010), which allows observation of aphid probing and feeding behaviour. The EPG technique

has been commonly applied to investigate insect–plant interactions (Walker and Backus 2000; Guerrieri and Digilio 2008; Backus et al., 2021), including localisation and characterisation of host plant resistance to Hemiptera (van Helden and Tjallingii 1993; Alvarez et al., 2013), monitor pest resistance to insecticides (Garzo et al., 2016; Wang et al., 2020), explore the mechanisms of transmission of plant pathogens by their insect vectors (Ferreles and Moreno 2009; Moreno et al., 2012) and, to a lesser extent, investigate the mode of action of plant protection products in general, including insecticides and repellents (Harrewijn and Kayser 1997; Jacobson and Kennedy 2014; Miao et al., 2014).

The objective of this study was not only to focus on the feeding behaviour but also on the growth and survival of insects when bioactive volatile nanoemulsions were applied to *Aphis gossypii* and *Myzus persicae* on melon (*Cucumis melo* L.) and pepper plants (*Capsicum annuum* L.), respectively. Specifically, nanoemulsions were prepared using (i) the essential oil of anise (*Pimpinella anisum* L.); (ii) its main compound (E)-anethole; (iii) farnesol (which has a molecular structure similar to  $\beta$ -farnesene, an alarm substance of aphids); and (iv) distilled lemon oil (a by-product from the citrus industry in southeast Spain). Sulfoxaflor was included as a standard treatment (since this product is according to Garzo et al., 2016, a known antifeedant) and another control with just water.

## **Materials and methods**

### Insects and plants

For the study of feeding behaviour (EPG experiment), melon (*Cucumis melo* L. cv Bazán) and pepper (*Capsicum annuum* L. cv Herminio) plants were grown in growth chambers at the Institute of Agricultural Sciences (ICA-CSIC, Madrid, Spain) under controlled conditions at a temperature of 24:20 °C (day:night), 80% relative humidity, and 14.800 lx in a light/dark cycle of 16:8 h. Previously, the seeds were germinated in plastic Petri dishes with moist vermiculite and a filter paper disc. After three or four days, they were transplanted into 8 × 8cm<sup>2</sup> pots with a mixture of peat and vermiculite (2:1 ratio). Watering was carried out twice a week with Nutrichem® 20–20–20 at a dose of 1 g/L.

The aphids used in the EPG experiment were adult wingless individuals of the species *A. gossypii* or *M. persicae*. Only adult apterous aphids, aged 10 to 12 days, were selected for the experiment. The insects were reared on melon and pepper plants, respectively, maintained in culture chambers at the ICA-CSIC (Madrid, Spain) under controlled conditions of temperature 23:18 °C (day:night) and a light/dark cycle of 16:8 h. Originally, *A. gossypii* was collected from a melon crop (approximate GPS coordinates: 36.79630335950503, – 2.5936634449674627) in Almeria (Spain) in 1998 and *M. persicae* from a pepper crop (approximate GPS coordinates: 40.52726744063823, – 3.291601949024722) in El Encín (Alcalá de Henares, Madrid, Spain) in 1989, and since then, the populations have been maintained under controlled conditions. For maintenance, aphid colonies were renewed every two weeks, avoiding a high population density.

To evaluate the persistence and the systemic effects of the bioactive volatiles, pepper plants were grown in culture chambers at the Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA, Murcia, Spain) under controlled conditions at a constant temperature of 23 °C and a light/dark cycle of 16:8 h.

The aphids used in these assays were adult wingless individuals of the species *M. persicae* from cultures at the IMIDA (Murcia, Spain) reared under controlled conditions at a constant temperature of 23 °C and a light/dark cycle of 16:8 h. This *M. persicae* population was originally collected from a pepper crop in Campo de Cartagena (Murcia, Spain) and has been maintained at the IMIDA since 2016.

#### Bioactive volatile products

The bioactive volatiles used were: anise (Destilerías Muñoz Gálvez S.A., Murcia, Spain), (E)-anethole, farnesol (Sigma-Aldrich®, San Louis, Missouri, USA), and distilled lemon oil (Citromil S.L., Santomera, Murcia, Spain). These were four different bioactives and were prepared at 0.2% with Tween80® (1:2) in distilled water. The product mixture was another bioactive and was formulated by Idai Nature S.L. (La Poble de Vallbona, Valencia, Spain) by an undisclosed method; it contains equal amounts of (Z)-jasnone, citral, distilled lemon oil, farnesol, and (E)- anethole, at a dose of 0.2% total products.

In a previous publication (Pascual-Villalobos et al., 2017), we analysed anise essential oil that is composed of 96.9% (E)-anethole and also distilled lemon oil that is composed of 71.1% limonene, 11.5%  $\beta$ -pinene, 8.2%  $\gamma$ -terpinene, 2.1% ( $\alpha$ -pinene +  $\alpha$ -thuyene), 0.7% geraniol, 0.5% geraniol acetate, and 0.4% neral.

#### Preparation of oil-in-water (O/W) nanoemulsions

Nanoemulsions were prepared using a high-speed dispersion machine IKA® Labor-Pilot Controller 2000/4 programmed to work each batch of 100 ml for 10 min at a rotor speed of 7941 rpm and a cooling temperature of 15 °C, which prevents overheating of the machine, maintaining the temperature in the mixing chamber at  $20 \pm 5$  °C and thus preventing losses of the bioactives by volatilisation during the process.

For the EPG experiment, the O/W nanoemulsions were formulated at 0.2% with Tween80® (1:2) and were stored at room temperature ( $24 \pm 4$  °C) until use. For the persistence assay and the assessment of systemic effects, the O/W nanoemulsions were formulated at 2% with Tween80® (1:2) and used immediately diluted to 0.2% for spraying. The product mixture was formulated by Idai Nature S.L. as stated in the previous section and stored at room temperature until use.

#### Electrical monitoring of aphid feeding behaviour

The EPG technique consists of enclosing an insect within an electrical circuit such that when the insect inserts its stylet into the plant tissue, the circuit is completed, and the waveforms associated with the probing and feeding behaviour of the aphid can be recorded in real time. EPG signals are produced by changes in potential and resistance that occur during stylet probing or penetration on different tissues of the plant (Tjallingii 2023).

The EPG technique has been used to study the feeding behaviour of *A. gossypii* on melon plants and *M. persicae* on pepper plants. For the feeding behaviour experiments, melon plants at a growth stage of 101 (first true leaf of the main stem, unfolded) on the BBCH scale and pepper plants at a BBCH growth stage of 102 (second true leaf of the main stem, unfolded) were sprayed (upper and lower leaf side) with the nanoemulsions of anise, (E)-anethole, farnesol, or distilled lemon oil, at 0.2%, using an aerograph 27.085

(piston compressor of 23 L/minute, 15–50 PSI, and a 0.3-mm nozzle diameter, Artesania Latina S.L., China). In addition, another plants were sprayed with sulfoxaflor (12% [SC] P/V; CLOSER® Isoclast™ active, Corteva Agriscience Spain S.L.U., Sevilla, Spain) at 24 mg a.i./L as a standard treatment. Control plants were sprayed with distilled water only. Plants were sprayed 2 h before starting the EPG experiments.

Apterous adult aphids were individually immobilised by a vacuum-operated plate (Eyela Aspirator A3S, Tokyo Rikakikai Co.LTD, Japan) to attach a thin (18.5- $\mu$ m diameter) gold wire to the dorsum of the insect using a small drop of water-based silver glue (EPG Systems, Wageningen, The Netherlands). Then, the opposite end of the gold wire was attached to a copper electrode (3 cm in length and 1 mm in diameter), corresponding to the input electrode. The output electrode was a second copper electrode (10 cm in length and 2 mm in diameter), which was introduced into the substrate of the plant closing the electrical circuit. Aphids with the gold wire attached were placed on the abaxial side of leaves and connected to the DC-EPG device (Giga-4 and Giga-8; EPG Systems, Wageningen, The Netherlands). The EPG acquisition procedure was performed inside a Faraday cage to minimise electrical noise. EPG data acquisition and analysis were conducted using the Windows-based software package Stylet + v01.30 (EPG Systems, Wageningen, The Netherlands). EPG signals were recorded for 8 h under laboratory conditions ( $24 \pm 4$  °C), and recording started immediately after aphids had been placed on the leaf. A minimum of 20 records were taken for each treatment, and a different single aphid and plant were used for each replicate.

As previously described for aphids (Tjallingii 2023), EPG waveforms were classified as follows: np, non-probing behaviour (no contact of the stylet with the leaf tissue); C, which represents the intercellular apoplastic stylet pathway; E1, which represents salivation at the beginning of the phloem phase and has been associated with inoculation of persistent viruses; E2, which is related to passive ingestion of phloem sap and has been associated with the acquisition of persistent viruses; and G, which is related to the active ingestion of xylem sap from xylem elements. In addition, F, related to a lack of coordination of the stylet mouthparts as a result of difficulties encountered along its path, was considered for the calculation, expressed as a percentage (%), of the total duration of all waveforms identified in all EPG records taken. For calculation purposes,

the intracellular stylet punctures pds, reflecting intracellular probes occurring during C and associated to the transmission of non-persistent viruses, were included as part of waveform C.

To analyse the effect of nanoemulsions on insect probing and feeding behaviour, a selected set of EPG variables (mean  $\pm$  SE) was processed using the EPG-Excel data workbooks (Sarria et al., 2009) and EPG Workbook CSIC/UAL (Garzo et al., unpublished). These were calculated as follows: (i) proportion of individuals that produce a specific waveform (PPW) as the number of insects that produces a specific waveform divided by the total number of insects for each treatment; (ii) number of waveform events for each insect as the number of times that a waveform occurs for each insect, yielding one value per insect (replicate) that can then be compared between treatments using an appropriate statistical test; (iii) total waveform duration as the total duration of a waveform, summed over all occurrences of the waveform for each insect; assigning a value of zero if there are no events for a particular insect; (iv) mean waveform duration as the average waveform event duration, namely, total waveform duration divided by the number of waveform events for each insect, classifying the value as missing data if there are no events for a particular waveform; (v) percentage of the probing time that each insect spends in each waveform as the time spent in each waveform divided by the total probing time; and (vi) duration of sequential EPG events, that is, the time between the occurrence of one event and that of the next event. In addition, the average total duration (expressed as a percentage, %) of all identified waveforms described above during the EPG recordings was also calculated.

#### Nanoemulsion persistence assay

Bioactive volatile nanoemulsions of anise, (E)-anethole, farnesol, or distilled lemon oil at 0.2% with Tween80® (1:2) or the product mixture diluted to 0.2% and sulfoxaflor (24 mg a.i./L) were sprayed onto pepper plants at a BBCH growth stage of 202 (second primary lateral apical shoot, visible) with a handheld sprayer (Matabi® Berry 1,5; Grupo Goizper, Gipuzkoa, Spain) at a rate of approximately 100 ml/plant.

Subsequently, when the leaves dried (1–2 h after spraying), four adult females of *M. persicae* were placed (Fig. 1) on the abaxial side of the leaves, in a clip cage

(Entomopraxis SCP, Barcelona, Spain) on the same plant at different times: on day 0 (the same day as treatment application) and at days 1, 2, and 7 after the application of the treatments. The experiment was repeated four times (one application or replica per week) every Monday for four consecutive weeks, and in each replica, five plants (repetitions) were used; therefore, data were collected for a total of 20 repetitions per treatment. The number of alive nymphs and adults per clip cage was recorded daily until day seven after aphid release. The assay was carried out in a growth chamber at a constant temperature of 23 °C and a light/dark cycle of 16:8 h.



**Fig. 1** Persistence assay. Pepper plant with clip cage on day 0 (left). Detail of clip cage and aphids (right)

#### Assessment of systemic effect of nanoemulsions

Bioactive volatile nanoemulsions of farnesol or distilled lemon oil at 0.2% with Tween80® (1:2) or the product mixture at 0.2% or sulfoxaflor (24 mg a.i./L) were sprayed on pepper plants at a BBCH growth stage of 202 with the aforementioned handheld sprayer (Polita 7; approximately 100 ml/plant).

A fully expanded leaf from the second–third pair of true leaves of the pepper plant was protected with a resealable plastic bag to ensure that this leaf was not treated with the product when spraying (Fig. 2), and therefore, allow us to study the systemic effects alone without contact effects. Subsequently, four adult females of *M. persicae* were placed in a clip cage (Entomopraxis SCP, Barcelona, Spain) on the untreated leaf, 1–2 h after plant spraying. Four applications of the treatments were made (one first application or replica per week) every Monday for four consecutive weeks, and in each replica, five plants

(repetitions) were used; therefore, a total of 20 repetitions were performed per treatment. The number of nymphs and adults alive per clip cage was recorded at 1, 4, and 7 days after aphid release. This experiment was carried out in a growth chamber at a constant temperature of 23 °C and a light/dark cycle of 16:8 h.



**Fig. 2** Assessment of systemic effects. Untreated leaf on pepper plant (protected with a plastic bag during spraying)

### Statistical analysis

All data were statistically analysed using R software (R Core Team 2019), version 4.2.2, with a significance level of 0.05. The selected set of EPG variables were analysed using a one-way analysis of variance (ANOVA). The normality and homoscedasticity of residuals were evaluated with Shapiro–Wilk and Levene tests, respectively. When necessary, the data were transformed with the square root ( $x + 0.5$ ), logarithm ( $x + 1$ ), or arcsine of the square root. When it was not possible to meet the requirements for one-way ANOVA, variables were analysed with the Kruskal–Wallis test. When the ANOVA or Kruskal–Wallis results were significant ( $p \leq 0.05$ ), Tukey’s test or Dunn’s test were performed for pairwise mean comparisons, respectively.

For the persistence assay, the number of alive nymphs and adults per cage was fitted to a linear regression, as a function of time, with a fixed intercept of 4 (corresponding to the initial number of females). The values of the slopes have been compared by Tukey's pairwise comparisons test using the function of estimated marginal means of linear trends (Lenth 2022) (emtrends from the emmeans package, version 1.8.3).

Finally, to explore the potential systemic effects of the treatments tested, the instantaneous ratio of population growth ( $r_i$ ) was calculated as:  $\ln(N_f/N_o)/\Delta T$ , where  $N_f$  is the number of aphids each day after treatment,  $N_o$  is the number of aphids at baseline and  $\Delta T$  is the number of days between the two time points. The number of individuals (aphids) per plant was analysed using the negative binomial generalised linear model (GLM), calculated with the `glmer.nb` function (`lme4` package), and as for the persistence assay, the differences between treatments were assessed by Tukey's test using the function of estimated marginal means of linear trends (Lenth 2022) (`emmeans` package, version 1.8.3). In the case of the instantaneous ratio of population growth ( $r_i$ ), data were analysed by the Kruskal–Wallis test, and Dunn's test was performed for pairwise mean comparisons.

## Results

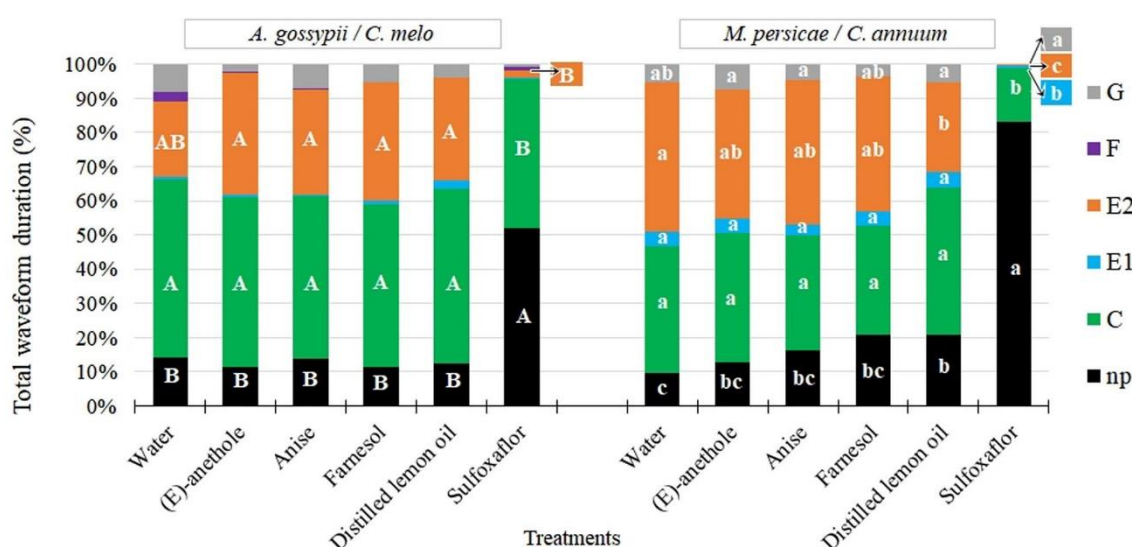
### Electrical monitoring of aphid feeding behaviour

The total time on each activity (np, C, E1, E2, F, and G), expressed as percentages of the 8 h of EPG recording, is indicated in Fig. 3. Regarding *A. gossypii*, we only obtained significant differences in the probing and feeding behaviour for aphids fed on sulfoxaflor-treated melon plants compared with those fed on control plants or on nanoemulsion-treated melon plants, without finding any significant effects of the tested nanoemulsions compared with the control plants. *Aphis gossypii* individuals placed on sulfoxaflor-treated melon plants spent long periods of time on non-probing activities (52% on sulfoxaflor-treated plants vs. 14% on control plants;  $p < 0.001$ ;  $H = 32.446$ ;  $df = 5$ ) and short periods of time on phloem activities (E1: 0.2% vs. 0.6% on control plants,  $P = 0.007$ ;  $H = 16.055$ ;  $df = 5$  and E2: 2.3% vs. 22% on control plants,  $P = 0.003$ ;  $H = 18.079$ ;  $df = 5$ ), see Fig. 3. In the case of *A. gossypii* on melon, we observed longer average total E2 durations after treatment with bioactive volatiles (Fig. 3) than under control conditions. We consider that it would be worth studying stimulating effects.

A strong and clear effect of sulfoxaflor on the feeding behaviour of *M. persicae* on pepper plants can be observed in Fig. 3. More time spent on non-probing activities (np: 83% on sulfoxaflor-treated plants vs. 10% on control plants;  $p < 0.001$ ;  $H = 62.005$ ;  $df = 5$ ) and less stylet pathway (C: 16% vs. 37% on control plants;  $p < 0.001$ ;  $F = 10.031$ ;

df = 5;125) and phloem activities (E1: 0.6% vs. 4% on control plants,  $p < 0.001$ ;  $F = 9.350$ ; df = 5;125 and E2: 0.5% vs. 44% on control plants,  $p < 0.001$ ;  $H = 48.543$ ; df = 5).

Further, some effects of distilled lemon oil on the probing behaviour of *M. persicae* on pepper plants can be observed in Fig. 3, with results intermediate between those of the control and sulfoxaflor treatments. Specifically, for individuals feeding on distilled lemon oil-treated pepper plants, the non-probing activity was longer (Fig. 3, np: 21%,  $p < 0.001$ ;  $H = 62.005$ ; df = 5) and phloem ingestion was shorter (Fig. 3, E2: 26%,  $p < 0.001$ ;  $H = 48.543$ ; df = 5) than for those feeding on control plants.



**Fig. 3** Total time on each activity (np, C, E1, E2, F, and G)<sup>a,b</sup> as a percentage of the 8-h EPG recording<sup>c,d</sup>. <sup>a</sup>The bioactive compounds were applied at a dose of 0.2% with Tween80® (1:2) as a water (control) nanoemulsion. Sulfoxaflor was applied at a dose of 24 mg ai/L diluted in water. <sup>b</sup>np = Non-probing; C = stylet between epidermis and mesophyll; E1 = salivation at the phloem; E2 = passive ingestion of phloem sap; F = stylet mechanical difficulties, and G = active ingestion of xylem sap. <sup>c</sup>Different capital letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) using mean comparison of Tukey's Test in ANOVA or Dunn's test in Kruskal–Wallis between treatments for each waveform in the case of *A. gossypii* on melon since the statistical analysis was done separately for each aphid species on its host plant. The absence of letters indicates non-significance of the statistical analysis. <sup>d</sup>Different lowercase letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) using mean comparison of Tukey's Test in ANOVA or Dunn's test in Kruskal–Wallis between treatments for each waveform in the case of *M. persicae* on pepper since the statistical analysis was done separately for each aphid species on its host plant.

Regarding the total duration of the EPG variables analysed, for *A. gossypii* on melon, we only found significant differences in sulfoxaflor-treated plants with the same trend as that in the results described above (Figs. 4, 5, and Table Supplementary material).

For *M. persicae* on pepper, besides the significant differences observed on sulfoxaflor-treated plants, we also observed some significant differences in the probing

behaviour of aphids feeding on farnesol or distilled lemon oil-treated plants compared with the controls. *Myzus persicae* individuals feeding on farnesol-treated plants showed a slightly longer mean duration of non-probing activity compared to those fed on control plants (Table 1, mean duration of np).

On the other hand, *M. persicae* individuals fed on distilled lemon oil-treated pepper plants showed longer non-probing time (np: 100.53 min) than insects fed on control plants (np: 47.05 min) ( $p < 0.001$ ;  $H = 62.005$ ;  $df = 5$ ). Apart from the non-probing variable, no significant differences were observed between results obtained with distilled lemon oil-treated plants and the other bioactives treated plants (Table 1 and Fig. 4). The total duration of the phloem ingestion (E2) was significantly lower for *M. persicae* fed on distilled lemon oil-treated plants (Table 1, time duration of E2, and Fig. 5).

Some differences were also obtained with the distilled lemon oil for some EPG variables related to ingestion activity in the xylem (G). The proportion of *M. persicae* individuals that reached the xylem vessels was higher for aphids on distilled lemon oil-treated pepper plants (Table 1, G variables PPW columns) than for the other treatments. Moreover, both the number of times that aphids reached the xylem and the percentage of the probing spent ingesting from the xylem were higher on distilled lemon oil-treated plants than on the controls (Table 1, number of G and percentage of probing spent in G).

Finally, some sequential EPG variables were also modified by some of the treatments. *Myzus persicae* feeding on sulfoxaflor and distilled lemon oil-treated pepper plants spent more time to make sustained phloem ingestion ( $t E2 > 10$  min) than those that on control plants (Table 1, sequential EPG variables).

No relevant differences were found when comparing the results obtained with the other nanoemulsions tested. Results of the whole of set variables (including those not showing significant differences) are provided in Supplementary material (Appendices Tables 1 to 5).

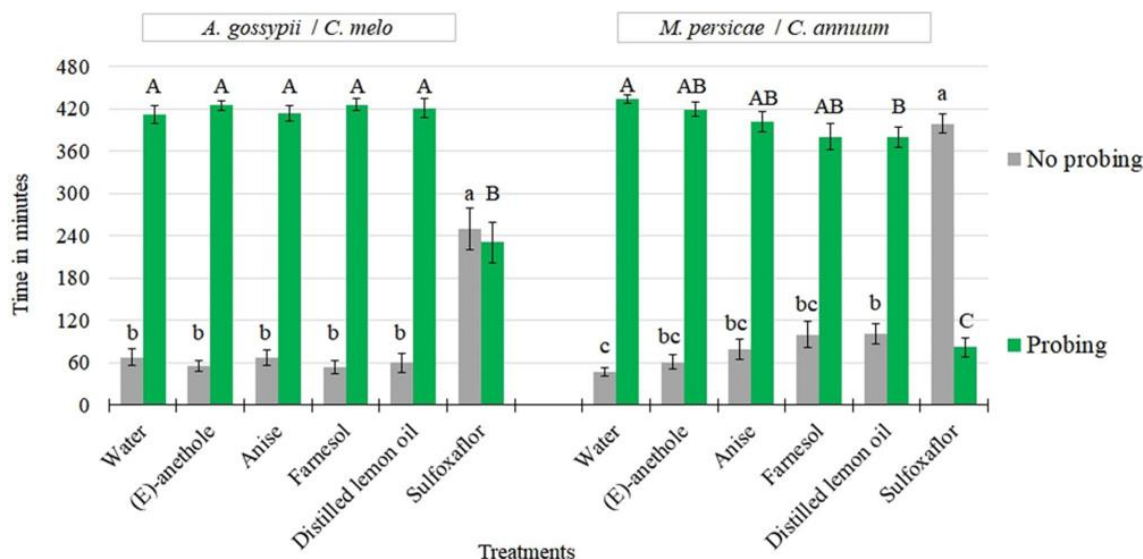
**Table 1.** Non-sequential and sequential EPG variables with statistically significant effects on the feeding behaviour of *M. persicae* on pepper after spraying the treatments

|                                                  |        |    |         | Treatments <sup>a</sup> |                        |             |                   |       |                   |          |                   |                     |                  |             |                  |
|--------------------------------------------------|--------|----|---------|-------------------------|------------------------|-------------|-------------------|-------|-------------------|----------|-------------------|---------------------|------------------|-------------|------------------|
|                                                  |        |    |         | Water                   |                        | (E)-anetole |                   | Anise |                   | Farnesol |                   | Distilled lemon oil |                  | Sulfoxaflor |                  |
| Non-sequential EPG variables <sup>b</sup>        | H      | gl | P-value | PPW                     | MEAN ± SE <sup>c</sup> | PPW         | MEAN ± SE         | PPW   | MEAN ± SE         | PPW      | MEAN ± SE         | PPW                 | MEAN ± SE        | PPW         | MEAN ± SE        |
| Total duration (min) of np                       | 62.005 | 5  | 0.000   | 21/21                   | 47.05 ± 5.76 c         | 22/22       | 61.00 ± 9.91 bc   | 21/21 | 78.75 ± 13.94 bc  | 22/22    | 99.68 ± 19.07 bc  | 22/22               | 100.53 ± 14.73 b | 23/23       | 398.36 ± 13.49 a |
| Mean duration (min) of np                        | 60.674 | 5  | 0.000   | 21/21                   | 2.25 ± 0.24 c          | 22/22       | 2.72 ± 0.34 bc    | 21/21 | 3.11 ± 0.36 bc    | 22/22    | 3.76 ± 0.57 b     | 22/22               | 4.98 ± 1.42 bc   | 23/23       | 50.89 ± 9.63 a   |
| Total duration (min) of probe                    | 62.005 | 5  | 0.000   | 21/21                   | 432.95 ± 5.76 a        | 22/22       | 419.00 ± 9.91 ab  | 21/21 | 401.25 ± 13.94 ab | 22/22    | 380.32 ± 19.07 ab | 22/22               | 379.47 ± 14.73 b | 23/23       | 81.64 ± 13.49 c  |
| Total duration (min) of E2                       | 48.543 | 5  | 0.000   | 20/21                   | 210.39 ± 27.34 a       | 20/22       | 182.13 ± 26.73 ab | 21/21 | 202.39 ± 26.42 ab | 20/22    | 189.38 ± 31.84 ab | 18/22               | 125.80 ± 23.71 b | 6/23        | 2.57 ± 1.63 c    |
| Number of G                                      | 16.354 | 5  | 0.006   | 5/21                    | 0.24 ± 0.09 bc         | 7/22        | 0.36 ± 0.12 ab    | 7/21  | 0.48 ± 0.18 ab    | 6/22     | 0.36 ± 0.14 ab    | 12/22               | 0.59 ± 0.13 a    | 0/23        | 0.00 ± 0.00 c    |
| Percentage of probing spent in G                 | 15.301 | 5  | 0.009   | 5/21                    | 5.64 ± 3.47 bc         | 7/22        | 7.97 ± 3.41 ab    | 7/21  | 5.72 ± 2.03 ab    | 6/22     | 4.64 ± 2.04 ab    | 12/22               | 7.08 ± 1.73 a    | 0/23        | 0.00 ± 0.00 c    |
| Sequential EPG variables                         |        |    |         |                         |                        |             |                   |       |                   |          |                   |                     |                  |             |                  |
| Time (min) from start EPG to 1st E2 (t > 10 min) | 30.275 | 5  | 0.000   | 19/21                   | 178.09 ± 30.86 c       | 18/22       | 211.33 ± 32.22 bc | 18/21 | 214.26 ± 36.74 bc | 17/22    | 235.81 ± 35.99 bc | 16/22               | 291.41 ± 35.21 b | 2/23        | 440.98 ± 26.96 a |
| Time (min) from 1st probe to 1st E2 (t > 10 min) | 28.702 | 5  | 0.000   | 19/21                   | 174.07 ± 30.96 c       | 18/22       | 207.72 ± 32.29 bc | 18/21 | 212.64 ± 36.65 bc | 17/22    | 231.96 ± 35.95 bc | 16/22               | 288.65 ± 35.19 b | 2/23        | 435.57 ± 27.12 a |

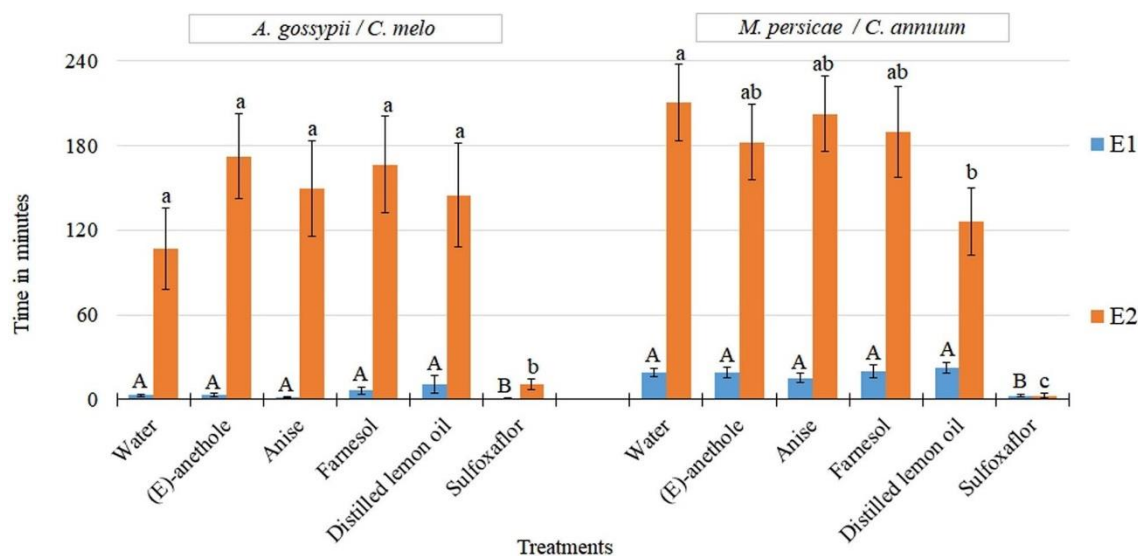
<sup>a</sup> The bioactive compounds were applied at a dose of 0.2% with Tween80® (1:2) as an oil-in-water nanoemulsion. Sulfoxaflor was applied at a dose of 24 mg ai/L diluted in water

<sup>b</sup> np = Non-probing. probe= Stylet contact with any plant tissue. E2 = Passive ingestion of phloem sap. E2 (t > 10 min) = Phloem sap ingestion with a duration greater than 10 min. G = Active ingestion of xylem sap.

<sup>c</sup> H = Kruskal–Wallis test statistic for variables whose residuals do not follow a normal distribution and/or are not homoscedastic. df = Degrees of freedom. P value = Probability of H. PPW = Proportion of individuals that produced a specific waveform. MEAN ± SE = Mean ± standard error of the mean of the untransformed data. Different letters within a row indicate significant differences amongst the treatments at p value ≤ 0.05 using mean comparison of Dunn's test in Kruskal–Wallis



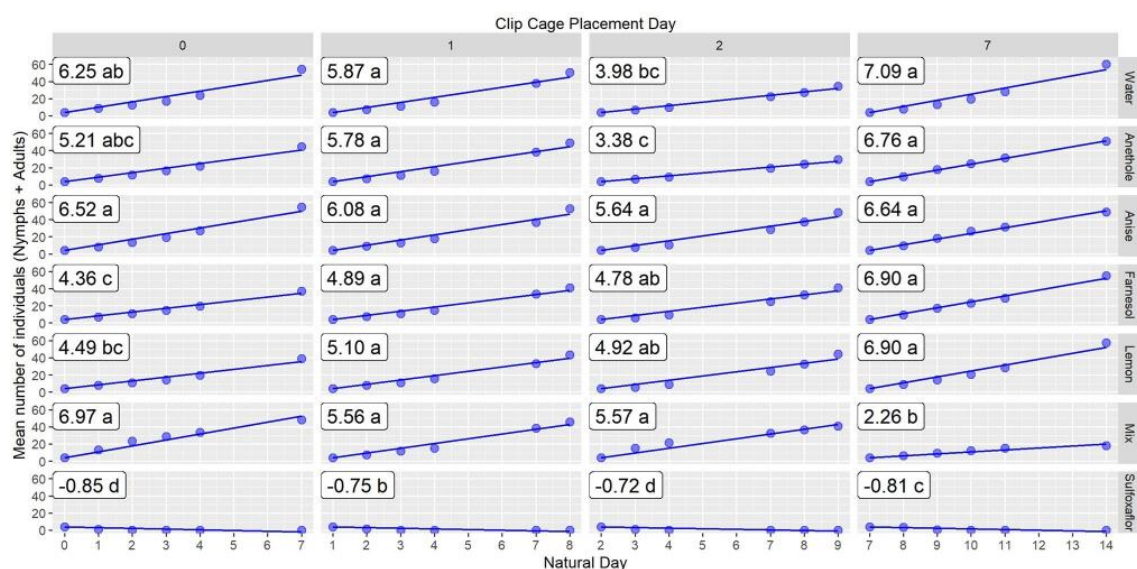
**Fig. 4** Total duration of probing and no probing for each insect<sup>a,b,c,d</sup>. <sup>a</sup>The bioactive compounds were applied at a dose of 0.2% with Tween80® (1:2) as a water nanoemulsion. Sulfoxaflor was applied at a dose of 24 mg ai/L diluted in water. <sup>b</sup>Error bars represent the standard error of the mean. <sup>c</sup>Different capital letters indicate significant differences (p value ≤ 0.05) using mean comparison of Dunn's test between treatments for the probing variable, in the case of *A. gossypii* on melon or for the case of *M. persicae* on pepper since the statistical analysis was done separately for each aphid species on its host plant. <sup>d</sup>Different lowercase letters indicate significant differences (p value ≤ 0.05) using mean comparison of Dunn's test between treatments for the no probing variable, in the case of *A. gossypii* on melon or for the case of *M. persicae* on pepper since the statistical analysis was done separately for each aphid species on its host plant



**Fig. 5** Total duration of waveforms related to phloem activity (E1 and E2) for each insect<sup>a,b,c,d</sup>. <sup>a</sup>The bioactive compounds were applied at a dose of 0.2% with Tween80® (1:2) as a water nanoemulsion. Sulfoxaflor was applied at a dose of 24 mg ai/L diluted in water. <sup>b</sup>Error bars represent the standard error of the mean. <sup>c</sup>Different capital letters indicate significant differences (p value ≤ 0.05) using mean comparison of Tukey's Test in ANOVA or Dunn's test in Kruskal–Wallis between treatments for the E1 waveform (salivation at the beginning of the phloem phase), in the case of *A. gossypii* on melon or for the case of *M. persicae* on pepper since the statistical analysis was done separately for each aphid species on its host plant. <sup>d</sup>Different lowercase letters indicate significant differences (p value ≤ 0.05) using mean comparison of Dunn's test between treatments for the E2 waveform (passive ingestion of phloem sap), in the case of *A. gossypii* on melon or for the case of *M. persicae* on pepper since the statistical analysis was done separately for each aphid species on its host plant

## Nanoemulsion persistance assay

These results are shown in Fig. 6. The trend of the aphid population growth (nymphs plus adults) has been plotted, on a linear scale, based on the data generated from *M. persicae* colonies released in clip cages on the same pepper plants, at different times after spraying: on day 0 (the same day plants were treated) or days 1, 2, and 7 afterwards.



**Fig. 6** Insect population growth (mean number of insects, nymphs plus adults)<sup>a</sup> after plant spraying with 0.2% nanoemulsions<sup>b</sup> of bioactive products on day 0 followed by aphid release in clip cages on days 0, 1, 2, or 7. <sup>a</sup>The points represent the mean (n = 20) number of individuals (nymphs plus adults) for each sampling day. The lines are fitted by linear regression, as a function of time, with an initial value set at 4 (corresponding to the four females placed in the clip cage on the same plant, each clip-cage placement day). The values of the slopes are indicated in the boxes, and the different letters by columns indicate significant differences between treatments (p value ≤ 0.05). <sup>b</sup>The bioactive compounds were applied at a dose of 0.2% with Tween80® (1:2) as a water nanoemulsion. Mix was applied at a dose of 0.2% diluted in water. Sulfoxaflor was applied at a dose of 24 mg ai/L diluted in water. A minimum of 20 records were taken for each treatment

Sulfoxaflor was the most effective treatment to control aphid populations, causing the death of all individuals of *M. persicae* from the day of application until the end of the assay, with a persistence of at least 14 days.

Considering the results obtained on the day of application (day 0), the slope of the data obtained with farnesol shows slower aphid population growth than under control conditions. The populations of aphids on farnesol-treated pepper plants reach their maximum seven days after the application, with an average of 37 aphids/plant, whilst the maximum population reached in the controls was 54 aphids/ plant (P = 0.034; t ratio = 3.092; df = 693), indicating that farnesol has an effect on aphid populations up to day

seven. For (E)-anethole or distilled lemon oil, the slope of population growth is also lower than that of the control, but without differences reaching significance. With anise and the mixture of bioactive volatiles, aphids grew even more than under control conditions.

When aphids were released (on day one), no differences were found for treatments with bioactive volatiles, the aphid population growth on treated plants being similar to that observed on controls (41–53 aphids/plant eight days after spraying).

For aphids released two days after treatment application, the population grew faster with anise and the mixture of bioactives (with a maximum of 48 aphids/plant in anise,  $P = 0.002$ ;  $t$  ratio =  $-3.953$ ;  $df = 693$  and 41 aphids/plant in mixture,  $P = 0.003$ ;  $t$  ratio =  $-3.791$ ;  $df = 693$ ) than the control treatment (maximum population of 34 aphids/plant) after nine days. (E)-anethole was the only nanoemulsion treatment associated with slower population growth (29 aphids/plant) than control conditions, although the difference was not statistically significant.

Finally, some effect was observed against aphids released on day seven after treatment application in the case of plants sprayed with the mixture of bioactive volatiles, with a maximum population of 18 aphids/plant after 14 days on treated plants and 60 aphids/plant on the control plants ( $p < 0.001$ ;  $t$  ratio =  $7.347$ ;  $df = 693$ ). This could indicate that the product mixture begins to take effect on the populations of *M. persicae* on pepper from seven days after application, due to a controlled release of the bioactives over that time.

#### Assessment of systemic effects of nanoemulsions

Only sulfoxaflor showed a systemic effect, with reductions in the aphid population at four and seven days after the treatment (Table 2). No significant differences were found in the number of individuals alive or the instantaneous rate of population growth with any of the nanoemulsions of bioactive volatiles tested.

**Table 2** Test of systemic effects. Insect population growth (nymphs plus adults) after plant spraying the treatments<sup>a</sup>

| Treatments          | Alive aphids/plan <sup>b</sup> |                      |                       | Instantaneous rate of population growth (ri) <sup>d</sup> |                      |                      |
|---------------------|--------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|
|                     | Day 1                          | Day 4                | Day 7                 | Day 1                                                     | Day 4                | Day 7                |
| Water               | 5.45 ± 0.41                    | 10.90 ± 1.81 a       | 20.30 ± 3.50 a        | 0.256 ± 0.074                                             | 0.173 ± 0.052 a      | 0.154 ± 0.042 a      |
| Farnesol            | 4.70 ± 0.34                    | 9.35 ± 1.49 a        | 19.00 ± 3.16 a        | 0.086 ± 0.102                                             | 0.112 ± 0.055 a      | 0.172 ± 0.033 a      |
| Distilled lemon oil | 4.65 ± 0.27                    | 11.70 ± 1.33 a       | 24.30 ± 3.01 a        | 0.118 ± 0.056                                             | 0.232 ± 0.032 a      | 0.222 ± 0.029 a      |
| Mix                 | 5.25 ± 0.43                    | 12.80 ± 1.14 a       | 26.40 ± 3.46 a        | 0.182 ± 0.110                                             | 0.254 ± 0.038 a      | 0.241 ± 0.024 a      |
| Sulfoxaflor         | 4.40 ± 0.46                    | 0.80 ± 0.35 b        | 0.20 ± 0.12 b         | -0.011 ± 0.112                                            | -0.046 ± 0.026 b     | -0.025 ± 0.014 b     |
| <i>Statistic</i>    | 3.159 <sup>c</sup>             | 75.499 <sup>c</sup>  | 1284.200 <sup>c</sup> | 5.344 <sup>e</sup>                                        | 25.299 <sup>e</sup>  | 33.521 <sup>e</sup>  |
| <i>df</i>           | 4                              | 4                    | 4                     | 4                                                         | 4                    | 4                    |
| <i>P value</i>      | 0.532                          | 0.000 <sup>***</sup> | 0.000 <sup>***</sup>  | 0.254                                                     | 0.000 <sup>***</sup> | 0.000 <sup>***</sup> |

<sup>a</sup> The bioactive compounds were applied at a dose of 0.2% with Tween80® (1:2) as a water nanoemulsion. The product mixture (Mix) was applied at a dose of 0.2% total bioactive products ((Z)-jasmone, citral, distilled lemon oil, farnesol, and (E)-anethole) diluted in water. Sulfoxaflor was applied at a dose of 24 mg ai/L diluted in water

<sup>b</sup> Four females per plant were released in clip cages located on untreated leaves on day 0 (n = 20). Means ± standard error of the mean followed by different letters within the column indicate significant differences amongst the treatments (p value ≤ 0.05) using mean comparison of Tukey's test from the negative binomial generalised linear model (GLM)

<sup>c</sup> Statistic: likelihood ratio statistic (LR Stat) and Chi-square probability (P value)

<sup>d</sup> 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 number of aphids before treatments and ΔT is the number of days between them. Means ± standard error of the mean followed by different letters within the column indicate significant differences between the treatments (p value ≤ 0.05) using mean comparison of Dunn's test in Kruskal–Wallis

<sup>e</sup> Statistic: Kruskal–Wallis statistic (H) and Chi-square probability (P value)

## Discussion

### Effects of lemon essential oil on feeding behaviour of aphids

Considering the EPG results obtained for each variable, it can be said that the bioactive volatiles do not generally alter the feeding behaviour of the aphids studied in their corresponding host plants. The exception is distilled lemon oil that does seem to have some effect on some aspects of the feeding behaviour of *M. persicae*. Individuals of *M. persicae* placed on pepper plants treated with distilled lemon oil have shown longer periods of non-probing activity (np) and longer probing durations until phloem ingestion (E2), including longer times in the stylet pathway (C) and xylem sap ingestion (G) phases. In addition, we know from the literature (Wroblewska-Kurdyk 2020) that if aphids spend prolonged periods of time in non-phloematic tissues (C and G) or have a large number of probes or long periods of probes until the first phloem phase (E1), and ultimately, have difficulty in finding elements of the phloem (E), it could mean that the aphids are experiencing some effect at pre-ingestion of phloem sap. Therefore, our results indicate that distilled lemon oil may have pre-ingestion effects on *M. persicae* on pepper plants. Similarly, the lower total and average duration of phloem sap ingestion and the high proportion of salivation during phloem sieve elements penetration may indicate food deterrence at the level of phloem sap ingestion (Mayoral et al., 1996; Gabrys and Magdalena 1999). For this reason, in view of our results, it can be stated that distilled lemon oil may have some effect during ingestion, individuals of *M. persicae* on treated pepper plants showing shorter phloem sap ingestion (E2) times than those on control plants.

Since one of the main compounds of lemon oil is limonene, our results are in agreement with that of other authors (Halarewicz-Pacan et al., 2003), who reported that S-limonene inhibited phloem sap ingestion and reduced the number of phloem sap ingestion phases during aphid (*M. persicae*) stylet penetration. Another study (Gabrys et al., 2005) also demonstrated that various compounds present in lemon oil, such as citral, linalool, and S-limonene, were feeding deterrents and reduced the number, as well as the total and mean duration, of probes of *M. persicae*. In previous studies (Canto-Tejero et al., 2022a), we did not observe settlement inhibition of *M. persicae* or *M. euphorbiae*

associated with lemon oil or its main component, limonene. Therefore, we interpret that distilled lemon oil has no postingestive effect, but possibly (in light of the results we are presenting herein) lemon oil affects aphid feeding.

#### Effects of farnesol and aniseed compounds

Concerning the aniseed compounds (anise and (E)-anethole), we know from previous research that, like farnesol, they inhibit the settlement of *R. padi* on barley leaves (Pascual-Villalobos et al., 2017) and *M. persicae* or *M. euphorbiae* (Pascual-Villalobos et al., 2019; Canto-Tejero et al., 2022a) on pepper leaves in choice assays. A similar effect was reported in another publication on farnesol (Gutierrez et al., 1997). The G variable relates to activity in xylem tissues, and the results obtained (a greater number of G and higher percentage of probing in G) could indicate that aniseed compounds cause dehydration in aphids. The xylem is a lignified tissue that transports sap composed mainly of water and other dissolved substances, called raw sap, and hence, it is less useful for nutrient uptake in aphids. Therefore, they may be looking for the water carried by these conductive vessels, but more studies are needed.

On the other hand, in our EPG experiment, farnesol did not alter the feeding behaviour of either of the aphid species studied. Nonetheless, in choice tests (Canto-Tejero et al., 2022a), we observed settlement inhibition of *M. persicae* and *M. euphorbiae* when farnesol diluted in acetone was applied to pepper leaf discs. In the literature (Wroblewska-Kurdyk et al., 2020), similar results have been described, the feeding behaviour of *M. persicae* on Chinese cabbage plants treated with farnesol not being prevented by this sesquiterpenoid though settlement was inhibited in a choice test by spraying farnesol diluted in ethanol on the leaves. Besides, in a previous study (Pascual-Villalobos et al., 2017), we observed a mortality rate of 32.5% due to volatiles and/or the residual effect of farnesol against *R. padi* in barley leaves. In conclusion, the effects observed in other studies in terms of mortality and/or repellency (or inhibition of settlement) of aphids when exposed to farnesol (and other bioactive volatiles) are not due to changes in insect feeding, but probably due to direct contact with the product (topical activity), olfactory repellence, and/or post-feeding behavioural effects.

Compounds that interfere with insect feeding can function as pre-ingestive inhibitors, which affect the activity of taste receptors, ingestives that suppress salivary enzymes or food transport, and/or post-ingestive inhibitors that affect physiological processes after ingestion of such compounds during feeding (Frazier and Chyb 1995). Our results can be linked to those of Dancewicz et al., (2008) in which it was demonstrated that R-pulegone prevented aphids (*M. persicae*) from settling on treated leaves of Chinese cabbage and this was due to its post-ingestional deterrence activity. In addition, by EPG, it was found that the aphids' total time of probing was shorter on pulegone-treated leaves and they also took more time to reach the phloem vessels and did not show sustained sap ingestion, indicating that the treatment also had pre-ingestive and ingestive effects.

In the literature, some research (Dancewicz et al., 2016) reports the effects of volatiles as gustatory stimuli of aphids and therefore their potential as antifeedants. Linalool inhibited *M. persicae* settling on Chinese cabbage in choice assays; the probing behaviour (by EPG) was not altered, but possibly it had a long-term effect on digestion, and according to the authors, its activity was post-ingestive.

Regarding contact toxicity, in a growth chamber trial with pepper pots (Canto-Tejero et al., 2022a), we obtained mortality rates in *M. persicae* of 27–58% and in *M. euphorbiae* of 46–60% with 0.2% farnesol. In another assay (Canto-Tejero et al., 2022b), the dose was increased to 0.6%, and the mortality rate of *M. persicae* rose to 94% in a laboratory assay with pepper leaf discs. In addition, in a greenhouse with pepper pots, the efficacies obtained were between 61–67% with 0.4% farnesol and 61–99% with 0.6% farnesol, but at this latter dose, the product turned out to be phytotoxic to plants. Farnesol at 0.4% was less effective against *N. ribisnigri* on lettuce (Canto-Tejero et al., 2022c), with an efficacy of 44.1–49.2% in a trial in a growth chamber and 12–26.3% in a greenhouse. According to the results in our persistence assay, farnesol has a residual effect, since the individuals of *M. persicae* released on pepper plants after the treatments produced fewer progeny than the controls up to the seventh day.

In one of our previous studies (Pascual-Villalobos et al., 2019), we showed that spraying 0.1% citral or anise was not toxic to *M. persicae* in an assay with pepper pots in a greenhouse but the combination of both reduced the number of aphids/plant, compared

to the control. Recently, we have shown (Pascual-Villalobos et al., 2022) that a mixture of five bioactive volatiles (citral, (E)-anethole, farnesol, (Z)-jasmone, and lemon essential oil) had an insecticidal effect against *M. persicae* both in a bioassay in Petri dishes with pepper leaves and in experiments on a pepper crop in a greenhouse. That formulated mixture is the same as the one we have tested in this study. The results obtained from the persistence assay suggest that the product mixture has a toxic effect on the populations of *M. persicae* on pepper 14 days after application, attributable to a controlled release. This is particularly interesting and could be directly related to the stability of the nanoemulsion.

In previous experiments (Pascual-Villalobos et al., 2019), we tested other formulations. Soy lecithin improves stability and maintains insecticidal activity for six months if stored at 4 °C. Nanoemulsions of farnesol or (E)-anethole made with soy lecithin were more active (higher repellency index) against *M. persicae* in a choice bioassay. In a field trial on a pepper crop in a greenhouse, the product mixture had better insecticidal effect against *M. persicae* when soy lecithin was used in the formulation, with similar results to the use of Tween80®, although phytotoxicity on plants was also more pronounced. On the other hand, when sunflower oil was used in the formulation, there were fewer symptoms of phytotoxicity (Pascual-Villalobos et al., 2022).

#### Systemic effect of volatile products

The assessment of systemic effects of nanoemulsions gave negative results for the bioactive volatiles in our experiment. Little has been published about translocation of essential oils on plants. Werrie et al. (2020) considered that the interactions between a monoterpene and epicuticular waxes and stomata in plant leaves have a main role. Once the monoterpene enters, it accumulates and diffuses according to oil/water partition coefficients. In another study, it was demonstrated that thymol translocated in plants from root uptake, but the mechanism was not explained (Wong and Coats 2018). This subject is also linked with that of Delfine et al. (2000) in which by fumigation, monoterpenes ( $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene) diffused inside the leave and the content was still measurable 12 h after the treatments. In addition, exogenous monoterpenes (myrcene and limonene) were also found in the leaves, maybe the product of stimulated endogenous synthesis, in *Quercus suber*. In relation to our EPG study, a lower total duration of phloem sap ingestion (E2)

may be due to distilled lemon oil also increasing the non-probing (np) time. It is also possible that distilled lemon oil is absorbed by the pepper plant and transported through the phloem, in turn, resulting in changes in the composition of the phloem sap that influence the response of the insect. *Myzus persicae* individuals come into contact with the nanoemulsion of distilled lemon oil in phloem plant tissues but do not feed particularly well, likely due to an effect on ingestion itself.

#### Antifeedant effect of sulfoxaflor

Based on the results of EPG recordings, we have verified the antifeedant effect of sulfoxaflor. The values of np (low number of times, the total and mean high duration, the high percentage and the duration of np just after probing of first E2 [t > 10 min]) and the notably low values in the variables related to phloem activity (E1 and E2) are attributable to it being a systemic insecticide that circulates through the sap-conducting vessels. When the aphids come into contact with the product in this tissue, they quickly remove their stylet and cease feeding after ingesting the active ingredient since they are unable to reintroduce the stylet into the leaf tissues. The antifeedant effect of sulfoxaflor in aphids has previously been demonstrated with *M. persicae* on pepper (Garzo et al., 2016) and kohlrabi (Samara et al., 2021) plants.

The phloem is known to be the conductive tissue of elaborated sap that contains mainly carbohydrates as a result of photosynthesis, and presumably because it is rich in nutrients, aphids usually spend most feeding time on this tissue. As stated before, salivation at the beginning of the phloem stage (E1) has been associated with the inoculation of persistent viruses by aphids and the E2 waveform (ingestion of phloem sap) has been associated with the acquisition of persistent viruses by aphids (Prado and Tjallingii 1994). Sulfoxaflor was the only treatment with which there was practically no activity in the phloem, and therefore, amongst the treatments tested, it is the only one that would be useful to prevent the transmission of persistent viruses by the vectors studied. Specifically, the inoculation and acquisition times of such viruses vary from minutes to hours (Brault et al., 2010), and the use of sulfoxaflor is associated with salivation and ingestion times of just a few minutes. In this study, we have been able to verify the systemic mode of action of this insecticide, sulfoxaflor, results indicating that it had a toxic effect on the insect and that this effect is maintained for at least 14 days.

## Concluding remarks

Distilled lemon oil is the only product amongst the bioactive volatiles tested that alters the feeding behaviour of *M. persicae*. Aniseed compounds including (E)-anethole might cause dehydration in aphids. Farnesol had a residual effect and produced fewer progeny in *M. persicae* colonies on treated pepper plants. The lethal effects of sulfoxaflor were confirmed, being the only treatment that had a systemic mode of action.

Foliar applications of nanoemulsions of mixtures of bioactive volatiles at low doses that are not phytotoxic to crops could be a good strategy in pepper crop management systems to reduce aphid populations (either by repellent effects, settlement inhibition, or contact toxicity). It is important to continue working with bioactive volatiles to learn more about their mode of action and insecticidal properties. Further studies are needed on the persistence of such products and their translaminar properties. Future lines of research in the area of the formulation of insecticides of botanical origin should be aimed at developing products that have activity at lower doses, have better storage stability, and are safer to use.

## Author contributions

All authors conceived and designed research. Felix Martin conducted experiments. Felix Martin, Elisa Garzo, Pedro Guirao, Alberto Fereres, and Aranzazu Moreno performed statistical analysis. María Jesús Pascual-Villalobos helped in funding acquisition and manuscript editing. Felix Martin wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to writing and read and approved the manuscript.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10340-024-01746-5>.

**Funding** This work was funded by a research project (RTA2017- 00022) supported by the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA, Madrid, Spain), the research project PID2020-117074RB-I00 supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación, and by a pre-doctoral research fellowship (PRE2018- 084296) awarded to Felix Martin.

**Data availability** The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## **Declarations**

**Conflict of interest** The authors have no conflicts of interests to declare.

**Ethics approval** This article does not contain any studies with human participants or animals (other than insects) performed by any of the authors.

## **References**

Alvarez AE, Broglia VG, Alberti D'Amato AM, Wouters D, van der Vossen E, Garzo E, Tjallingii WF, Dicke M, Vosman B (2013) Comparative analysis of *Solanum stoloniferum* responses to probing by the green peach aphid *Myzus persicae* and the potato aphid *Macrosiphum euphorbiae*. J Insect Sci 20:207–227. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieu017>

Anton N, Vandamme TF (2011) Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. Pharm Res 28:978–985. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0309-1>

Backus EA, Guedes RNC, Reif KE (2021) AC-DC electropenetography: fundamentals, controversies, and perspectives for arthropod pest management. Pest Manag Sci 77(3):1132–1149. <https://doi.org/10.1002/ps.6087>

Blackman RL, Eastop VF (2000) Aphids on the world's crops: an identification and information guide, 2nd edn. Wiley, Chichester, p 466

Blackman RL, Eastop VF (2017) Taxonomic issues. In: van Emden HF, Harrington R (eds) Aphids as crop pests, 2nd edn. CABI, Wallingford, pp 1–36. <https://doi.org/10.1079/9780851998190.0001>

Braut V, Uzest M, Monsion B, Jacquot E, Blanc S (2010) Aphids as transport devices for plant viruses. CR Biol 333:524–538. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.04.001>

- Butnariu M, Sarac I (2018) Essential oils from plants. J Biotechnol Biomed Sci 1:35–43. <https://doi.org/10.14302/issn.2576-6694.jbbs-18-2489>
- Canto-Tejero M, Casas JL, Marcos-Garcia MA, Pascual-Villalobos MJ, Florencio-Ortiz V, Guirao P (2022a) Essential oils-based repellents for the management of *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*. J Pest Sci 95(1):365–379. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01380-5>
- Canto-Tejero M, Guirao P, Pascual-Villalobos MJ (2022b) Aphicidal activity of farnesol against the green peach aphid: *Myzus persicae*. Pest Manag Sci 78(6):2714–2721. <https://doi.org/10.1002/ps.6902>
- Canto-Tejero M, Pascual-Villalobos MJ, Guirao P (2022c) Aniseed essential oil botanical insecticides for the management of the currant-lettuce aphid. Ind Crops Prod 181:114804. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114804>
- Dancewicz K, Gabrys B, Dams I (2008) Enantiospecific effect of pulegone and pulegone derived lactones on *Myzus persicae* (Sulz.) settling and feeding. J Chem Ecol 34:530–538. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9448-9>
- Dancewicz K, Sznajder K, Zaluski D, Kordan B, Gabrys B (2016) Behavioral sensitivity of *Myzus persicae* to volatile isoprenoids in plant tissues. Entomol Exp Appl 160:229–240. <https://doi.org/10.1111/eea.12480>
- Delfine S, Csiky O, Seufert G, Loreto F (2000) Fumigation with exogenous monoterpenes of a non-isoprenoid-emitting oak (*Quercus suber*): monoterpene acquisition, translocation, and effect on the photosynthetic properties at high temperatures. New Phytol 146:27–36. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00612.x>
- Fereres A, Moreno A (2009) Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. Virus Res 141(2):158–168. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.10.020>

- Fereres A, Perez P, Gemeno C, Ponz F (1993) Transmission of Spanish pepper and potato PVY isolates by aphid (Homoptera: Aphididae) vectors: epidemiological implications. *Environ Entomol* 22(6):1260–1265. <https://doi.org/10.1093/ee/22.6.1260>
- Frazier JL, Chyb S (1995) Use of feeding inhibitors in insect control. In: Chapman RF, de Boer G (eds) *Regulatory mechanisms in insect feeding*. Chapman and Hall, New York, pp 364–381
- Gabrys B, Magdalena P (1999) Acceptability of different species of Brassicaceae as hosts for the cabbage aphid. *Entomol Exp Appl* 91:105–109. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1999.00471.x>
- Gabrys B, Dancewicz K, Halarewicz-Pacan A, Janusz E (2005) Effect of natural monoterpenes on the behavior of the peach potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.). Breeding for plant resistance to pests and diseases. *IOBC-WPRS Bull* 28(10):29–34
- Gahukar RT (2014) Potential and utilization of plant products in pest control. In: Abrol DP (ed) *Integrated pest management: current concepts and ecological perspectives*. Academic Press, San Diego, pp 125–139. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398529-3.00009-9>
- García-Mari F, Costa-Comelles J, Ferragut F (1994) *Las plagas agrícolas*, 2nd ed. M.V. Phytoma-España, S.L. pp 376
- Garzo EI, Duque M, Fereres A (2004) Transmission efficiency of different non-persistent viruses infecting melon by four aphid species. *Span J Agric Res* 2(3):369–376. <https://doi.org/10.5424/sjar/2004023-91>
- Garzo E, Moreno A, Hernando S, Mariño V, Torne M, Santamaria E, Díaz I, Fereres A (2016) Electrical penetration graph technique as a tool to monitor the early stages of aphid resistance to insecticides. *Pest Manag Sci* 72(4):707–718. <https://doi.org/10.1002/ps.4041>
- Guerrieri E, Digilio MC (2008) Aphid-plant interactions: a review. *J Plant Interact* 3:223–232. <https://doi.org/10.1080/17429140802567173>

- Gutierrez C, Fereres A, Reina M, Cabrera R, Gonzalez-Coloma A (1997) Behavioral and sublethal effects of structurally related lower terpenes on *Myzus persicae*. J Chem Ecol 23:1641–1650. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006428.00568.c5>
- Halarewicz-Pacan A, Gabrys B, Dancewicz K, Wawrzeczyk C (2003) Enantiospecific effect of limonene and limonene-derived bicyclic lactones on settling and probing behaviour of the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.). J Plant Protect Res 43(2):133–142
- Harrewijn P, Kayser H (1997) Pymetrozine, a fast-acting and selective inhibitor of aphid feeding. In-situ studies with electronic monitoring of feeding behaviour. Pestic Sci 49:130–140. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199702\)49:2%3C130::AID-PS509%3E3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199702)49:2%3C130::AID-PS509%3E3.0.CO;2-U)
- Isman MB (2000) Plant essential oils for pest and disease management. Crop Prot 19:603–608. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00079-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00079-X)
- Jacobson AL, Kennedy GG (2014) Electrical penetration graph studies to investigate the effects of cyantraniliprole on feeding behaviour of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) on *Capsicum annuum*. Pest Manag Sci 70:836–840. <https://doi.org/10.1002/ps.3626>
- Kassem MA, Juarez M, Gomez P, Mengual CM, Sempere RN, Plaza M, Elena SF, Moreno A, Fereres A, Aranda MA (2013) Genetic diversity and potential vectors and reservoirs of cucurbit aphid borne yellows virus in southeastern Spain. Phytopathology 103:1188–1197. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-12-0280-R>
- Khandelwal N, Barbole RS, Banerjee SS, Chate GP, Biradar AV, Khandare JJ, Giri AP (2016) Budding trends in integrated pest management using advanced micro and nanomaterials: challenges and perspectives. J Environ Manage 184:157–169. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.09.071>
- Lebonne G, Quiot JB, Monestiez P (1982) Contribution of different aphid species to the spread of cucumber mosaic virus (CMV) in a muskmelon plot. Agronomie 2:797–804

Lecoq H, Bourdin D, Wipe-Scheibel C, Bon M, Lot H (1992) A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathol* 41:749–761. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1992.tb02559.x>

Lenth RV (2022) emmeans: estimated marginal means, aka least- squares means. R package version 1.8.3. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>.

Lisa V, Boccardo G (1996) Fabaviruses: broad bean wilt virus and allied viruses. In: Harrison BH, Murant AF (eds) Polyhedral virions and bipartite RNA genomes, The plant viruses, vol 5. Plenum Press, New York, pp 229–250. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1772-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1772-0_9)

Matthews REF, Hull R (2002) Matthews plant virology, 4th edn. Academic Press, San Diego, p 1056

Mayoral AM, Tjallingii WF, Castañera P (1996) Probing behaviour of *Diuraphis noxia* on five cereal species with different hydroxamic acid levels. *Entomol Exp Appl* 78:341–348. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1996.tb00799.x>

Miao J, Du ZB, Wu YQ, Gong ZJ, Jiang YL, Duan Y, Li T, Lei CL (2014) Sub-lethal effects of four neonicotinoid seed treatments on the demography and feeding behaviour of the wheat aphid *Sitobion avenae*. *Pest Manag Sci* 70(1):55–59. <https://doi.org/10.1002/ps.3523>

Moreno A, Tjallingii WF, Fernandez-Mata G, Fereres A (2012) Differences in the mechanism of inoculation between a semi-persistent and a non-persistent aphid-transmitted plant virus. *J Gen Virol* 93(3):662–667. <https://doi.org/10.1099/vir.0.037887-0>

Ngegba PM, Cui G, Khalid MZ, Zhong G (2022) Use of botanical pesticides in agriculture as an alternative to synthetic pesticides. *Agriculture* 12:600. <https://doi.org/10.3390/agriculture12050600>

Nollet LML, Rathore HS (2017) Green pesticides handbook: essential oils for pest control. CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, p 571. <https://doi.org/10.1201/9781315153131>

Park Y, Tak JH (2016) Essential oils for arthropod pest management in agricultural production systems. In: Preedy VR (ed) Essential oils in food preservation, flavor and safety. Academic Press, San Diego, pp 61–70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00006-7>

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

Pascual-Villalobos MJ, Guirao P, Diaz-Baños FG, Canto-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, San Diego, pp 223–247. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815829-6.00009-7>

Pascual-Villalobos MJ, Diaz I, Martin F, Canto-Tejero M, Villora G, Guirao P (2022) Plant bioactive volatile products and their efficiency in aphid control. Ind Crops Prod 183:114975. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114975>

Perez P, Duque M, Collar JL, Avilla C, Fereres A (2003) Activity of alatae aphids landing on open-field pepper crops in Spain. J Plant Dis Prot 110(2):195–202

Prado E, Tjallingii WF (1994) Aphid activities during sieve element punctures. Entomol Exp Appl 72:157–165. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1994.tb01813.x>

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

Rathore HS (2017) Green pesticides for organic farming: occurrence and properties of essential oils for use in pest control. In: Nollet LML, Rathore HS (eds) Green pesticides handbook: essential oils for pest control. CRC Press, Boca Raton, pp 3–25. <https://doi.org/10.1201/9781315153131>

- Regnault-Roger C (2013) Essential oils in insect control. In: Ramawat K, Merillon JM (eds) Natural products. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 4087–4107. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6\\_181](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_181)
- Remaudiere G, Remaudiere M (1997) Catalogue des aphididae du monde/Catalogue of the world's aphididae (Homoptera, Aphidoidea), INRA Editions (Collection Techniques et Pratiques), Paris, pp 475
- Samara R, Lowery TD, Stobbs LW, Vickers PM, Bittner LA (2021) Assessment of the effects of novel insecticides on green peach aphid (*Myzus persicae*) feeding and transmission of turnip mosaic virus (TuMV). *Pest Manag Sci* 77:1482–1491. <https://doi.org/10.1002/ps.6169>
- Sanchez JA, La-Spina M, Michelena JM, Lacasa A, Hermoso de Mendoza A (2011) Ecology of the aphid pests of protected pepper crops and their parasitoids. *Biocontrol Sci Tech* 21:171–188. <https://doi.org/10.1080/09583157.2010.530641>
- Sarria E, Cid M, Garzo E, Fereres A (2009) Excel workbook for automatic parameter calculation of EPG data. *Comput Electron Agric* 67:35–42. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2009.02.006>
- Tjallingii WF (1985) Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by aphid stylets. *Entomol Exp Appl* 38:187–193. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1985.tb03517.x>
- Tjallingii WF, Garzo E, Fereres A (2010) New structure in cell puncture activities by aphid stylets: a dual-mode EPG study. *Entomol Exp Appl* 135:193–207. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2010.00983.x>
- Tjallingii F (2023) EPG systems. Measuring principles. <https://www.epgsystems.eu/> Accessed March 2023
- van Helden M, Tjallingii WF (1993) Tissue localisation of lettuce resistance to the aphid *Nasonovia ribisnigri* using electrical penetration graphs. *Entomol Exp Appl* 68:269–278. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1993.tb01713.x>

Walker GP, Backus EA (2000) Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of homopteran feeding behaviour. Entomological Society of America, College Park, p 137

Wang L, Wang Q, Wang Q, Rui C, Cui L (2020) The feeding behaviour and life history changes in imidacloprid-resistant *Aphis gossypii* glover (Homoptera: Aphididae). Pest Manag Sci 76:1402–1412. <https://doi.org/10.1002/ps.5653>

Werrie P-Y, Durenne B, Delaplace P, Fauconnier M-L (2020) Phytotoxicity of essential oils: opportunities and constraints for the development of biopesticides. Rev Foods 9(9):1291. <https://doi.org/10.3390/foods9091291>

Wong CL, Coats JR (2018) Movement of thymol in citrus plants. In: Beck JJ, Rering CC, Duke SO (eds) Roles of natural products for biorational pesticides in agriculture. American Chemical Society, Washington, p 175

Wroblewska-Kurdyk A, Dancewicz K, Gliszczynska A, Gabrys B (2020) New insight into the behaviour modifying activity of two natural sesquiterpenoids farnesol and nerolidol towards *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). Bull Entomol Res 110:249–258. <https://doi.org/10.1017/S0007485319000609>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

### 4.3. Publicación 3.

#### **Repellent effects of coconut fatty acid methyl esters and their blends with bioactive volatiles on winged *Myzus persicae* (Sulzer) aphids (Hemiptera: Aphididae)**

Insects (2024) 15(9): 731

Factor de impacto: 2,7

Q1

Félix Martín <sup>1,2</sup>, Pedro Guirao <sup>2</sup>, María Jesús Pascual-Villalobos <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA), C/Mayor s/n, La Alberca, 30150 Murcia, Spain.

<sup>2</sup> Universidad Miguel Hernández, E.P.S.Orihuela, Carretera de Beniel Km. 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain.

Submission received: 11 September 2024 / Accepted: 23 September 2024 / Published: 23 September 2024

© 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license

<https://doi.org/10.3390/insects15090731>

## Article

# Repellent Effects of Coconut Fatty Acid Methyl Esters and Their Blends with Bioactive Volatiles on Winged *Myzus persicae* (Sulzer) Aphids (Hemiptera: Aphididae)

Félix Martín <sup>1,2,\*</sup> , Pedro Guirao <sup>2</sup>  and María Jesús Pascual-Villalobos <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA), c/Mayor s/n, 30150 La Alberca, Murcia, Spain; mjesus.pascual@carm.es

<sup>2</sup> Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO), Universidad Miguel Hernández, Carretera de Beniel km. 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain; pedro.guirao@umh.es

\* Correspondence: felix.martin@carm.es

**Simple Summary:** Aphids (Hemiptera: Aphididae) are among the most damaging pests for crops, due to the direct damage they cause and their ability to transmit viral diseases. Direct control of viral diseases is not possible, and hence, it is necessary to avoid the arrival of vectors to the crop. The objective of this study is to test whether spraying nanoemulsions of botanical products repel winged individuals of *Myzus persicae* (Sulzer) in a bioassay in culture chambers. Some of the bioactive volatiles tested, such as farnesol (similar to the aphid alarm pheromone), (*E*)-anethole (the major compound in anise and fennel essential oils) and a compound derived from coconut oil, have shown repellent effects both individually and in blends. This is valuable information for further research.

**Abstract:** *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) is one of the most important aphid crop pests, due to its direct damage and its ability to transmit viral diseases in crops. The objective is to test whether spraying nanoemulsions of botanical products repels winged individuals of *M. persicae* in a bioassay in culture chambers. The bioactive volatiles were applied on pepper plants at a dose of 0.2% alone or at 0.1% of each component in blends. A treated plant and a control plant were placed at each side of an entomological cage inside a growth chamber. The winged individuals were released between the plants, in a black-painted Petri dish suspended by wires in the upper half of the cage. The most repellent products were farnesol (repellency index, RI = 40.24%), (*E*)-anethole (RI = 30.85%) and coconut fatty acid methyl ester (coconut FAME) (RI = 28.93%), alone or in the following blends: farnesol + (*E*)-anethole + distilled lemon oil (RI = 36.55%) or (*E*)-anethole + distilled lemon oil + coconut FAME (RI = 30.63%). The observed effect of coconut FAME on aphids is the first report of this product having a repellent effect on a crop pest. Repellent substances for viral disease vectors should be further investigated to develop new strategies for plant protection.

**Keywords:** nanoemulsions; farnesol; (*E*)-anethole; pepper plants; choice bioassay; virus-transmitting sucking pests



**Citation:** Martín, F.; Guirao, P.; Pascual-Villalobos, M.J. Repellent Effects of Coconut Fatty Acid Methyl Esters and Their Blends with Bioactive Volatiles on Winged *Myzus persicae* (Sulzer) Aphids (Hemiptera: Aphididae). *Insects* **2024**, *15*, 731. <https://doi.org/10.3390/insects15090731>

Academic Editors: George J. Stathas and Panagiotis J. Skouras

Received: 11 September 2024

Accepted: 23 September 2024

Published: 23 September 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

According to the final report issued by the Food and Agriculture Organization of the United Nations in 2021 [1] following the commemoration of the International Year of Plant Health 2020, agricultural diseases and pests are responsible for as much as 40% of losses in global food crop production, and for losses in agricultural commodity trade worth more than USD 220 billion each year.

One of the most important crop pests are aphids (Hemiptera: Aphididae). There are more than 5000 species of Aphididae in the world [2]. Of these, about 450 species have been recorded from crop plants [3]. Direct damage is due to aphid feeding and the honeydew they secrete, which is colonised by saprophytic fungi that reduce plant photosynthetic

capacity and growth, and reduce the commercial value of crops, among other effects. On the other hand, they may cause major indirect damage in that they are the main vectors of plant viruses (circulative and non-circulative) [4,5]. Aphid-borne viruses belong to 19 of the 70 recognized genera of plant pathogenic viruses and comprise approximately 275 species of viruses that affect plants [6]. The green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer) is among the 14 aphid species of most agricultural importance and is highly efficient as a virus vector. It is the principal pest of protected pepper crops in southeastern Spain [7–9]. Specifically in pepper, *M. persicae* very effectively transmits CMV (cucumber mosaic virus, *Cucumovirus*) [10] and PVY (potato virus Y, *Potyvirus*) [11] in a non-persistent way, and PeVYV (pepper vein yellows virus, *Polerovirus*) [12] in a persistent way, among other viruses.

Direct control of viral diseases is not possible, and hence, it is necessary to anticipate the problem by implementing preventive measures such as the use of healthy or resistant plant material, weed control, the elimination of diseased plants and strict compliance with hygiene measures, as well as the monitoring of greenhouse enclosures. All of these factors can play an important role in the spread of viruses and allow for some degree of control, but for more effective prevention of viral diseases transmitted by insects, it is essential to avoid the arrival of the vector to the crop since the acquisition and transmission times of certain types of viruses are very short [13]. Curative treatments once aphids have settled on a crop are ineffective in preventing virus transmission, and therefore the use of phytosanitary products, with a repellent mode of action, is especially important for preventing the arrival of winged aphids to crops.

Winged aphids migrate looking for host plants to colonise. In recent years, winged aphids have been migrating earlier and earlier due to climate change and unusual periods of mild temperatures during the winter [14]. Winged aphid colonies are now seen as early as in the initial stages of cultivation in the organic pepper crops of Campo de Cartagena (Murcia, southeastern Spain), and this is a real problem.

Aphids locate plant material mainly by colour, but also by odour. Probably due to the evolutionary process, winged individuals have more developed olfactory antennal receptors than wingless individuals [15]. In these olfactory receptors, called rhinarium, odorant-binding proteins (OBPs) are concentrated, which participate in the perception of odours in the antennae. Electroantennography (EAG) has been shown to detect a response to a wide variety of volatile organic compounds (VOCs) in plants. Nonetheless, the role of these olfactory organs in aphid–plant interaction is still poorly understood [16].

Several studies have been carried out to identify VOCs such as ethers, phenols, monoterpenes and sesquiterpenes that repel aphids of horticultural importance. Most of these volatile compounds are found in the essential oils of plants which are extracted from various plant organs (roots, wood, leaves, flowers, fruits and seeds). They have historically been used in the food and perfumery industry, but not so much in agriculture [17–19]. Some studies show that essential oils and their compounds affect the physiological, nutritional and behavioural processes of insects. In particular, they cause mortality, are antifeedants, growth regulators and oviposition deterrents, reduce fertility, have ovicidal and fungicidal properties and/or prevent root penetration by nematodes [18,20–24].

It has also been shown that two species of *Ocimum* sp., associated with plants of *Amaranthus hybridus* L., had repellent effects on apterous individuals of *Aphis craccivora* Koch, *A. fabae* and *M. persicae* [25]. Furthermore, in olfactometry tests with apterous individuals of *M. persicae*, the repellent effects of basil plants (*Ocimum basilicum* L.) and also of *Tagetes patula* L. have also been demonstrated, when the volatiles were released individually. It has been found that eugenol and (*E*)- $\beta$ -farnesene had good repellent properties against *M. persicae* [26]. Notably, (*E*)- $\beta$ -farnesene was found to be the main component of the alarm pheromone of many aphids [16].

It has been reported that oils of rosemary, thyme, lavender, peppermint, ginger, white pepper, black pepper, carrot seeds, cardamom, bitter orange, citronella, celery seeds, cedarwood and laurel, as well as some compounds present in rosemary oil such as linalool, D,L-camphor and  $\alpha$ -terpineol, showed repellent activity in an olfactometer test with winged

individuals of *M. persicae* [27,28]. In addition, rosemary and ginger oils repelled winged forms of *M. persicae* and inhibited the transmission of potato virus Y (PVY, *Potyvirus*) in a tobacco plants greenhouse assay. Other potentially repellent substances for *M. persicae* were tested [29], and findings showed that crude fish oil, a summer mineral oil, and refined soy and rapeseed oils prevented the settlement of wingless individuals of *M. persicae* on pepper leaf discs, with fish oil having the greatest repellent effect. Nonetheless, in a trial with winged individuals (released into entomological cages), they did not observe significant differences in aphid settlement between treated and control pepper plants.

Concerning the effects on winged individuals of other aphid species [28], it has been demonstrated that rosemary oil repelled *Aphis gossypii* Glover and *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), and ginger oil showed significant repellency against *A. craccivora* Koch, *M. euphorbiae* and *Capitophorus formosartemisiae* (Takahashi). Furthermore, a test with winged individuals of *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) released in a box containing untreated control tiles and others treated with  $\beta$ -citronellol, oils from several species of *Artemisia* sp., farnesol, geraniol, linalool, or *Achillea millefolium* L. oil (known as yarrow or milfoil) has been carried out, and it has reported promising repellent results [30]. In addition, it has been demonstrated that the essential oils of anise, basil and *Cymbopogon* sp., and several pure compounds such as (*E*)-anethole, geraniol, farnesol and (*Z*)-jasmone, inhibit the settlement of wingless individuals of *M. persicae* and *M. euphorbiae* in Petri dish choice bioassays with pepper leaves, with farnesol and (*Z*)-jasmone being the most repellent for both wingless and winged forms of both aphid species in olfactometry assays [31]. Recently, it has been reported that the essential oils of three Lamiaceae plants (*Mentha arvensis* L., *Mentha x piperita* L. and *Lavandula angustifolia* Miller) significantly repelled winged individuals of *A. gossypii* in a Y-tube olfactometer experiment [32].

After conducting a literature search, we found studies on substances that are repellents against other types of insects. In particular, compounds derived from coconut oil have been shown to have repellent properties against a broad array of blood-sucking arthropods including flies, ticks, bed bugs and mosquitoes [33].

Essential oils and their compounds, being oily substances, are frequently insoluble in water, and they exhibit rapid environmental degradation, high volatility and thermal decomposition and/or evaporation due to their poor physicochemical stability, which significantly decreases their activity [20,34–36]. Other types of substances such as surfactants, emulsifiers, or adjuvants, which provide greater protection of the active ingredient against rapid degradation or volatilization, may be able to improve the bioavailability of the active compounds for longer periods of time [37]. The stability of the mixture depends on the particle size in addition to its composition: if particles are within the nanometric range ( $<1\ \mu\text{m}$ ), the impact of Brownian movement is reduced and therefore, aggregation is less frequent [38]. Oil-in-water nanoemulsions are 200 to 1000 nm diameter oil droplets dispersed in aqueous media (surrounded by the surfactant) [39]. In recent years, O/W emulsions have attracted much attention due to the need to reduce toxic and flammable solvents from conventional phytosanitary formulations and replace them with substances of natural or plant origin. Plant-based substances have been used since ancient times as insecticides or adjuvants to fat-soluble molecules [40].

The mode of action of plant-based products is not well known. Studies focus on mortality, control of insecticide resistance and behavioural responses related to interference with virus transmission, but rarely on repellency. Therefore, the objective of this study was to test whether spraying nanoemulsions of bioactive volatiles (alone and as mixtures) on pepper plants repelled winged individuals of *M. persicae*, thereby preventing the arrival of this vector to the crop.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Insects and Plants

To evaluate the repellent and reproductive effects of the bioactive volatiles on winged aphids, pepper plants were grown in growth chambers at the Instituto Murciano de Inves-

tigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA, Murcia, Spain) under controlled conditions at a constant temperature of 23 °C and with a light/dark cycle of 16:8 h.

The aphids used in these assays were adult winged individuals of the species *M. persicae* from cultures at IMIDA (Murcia, Spain), reared under controlled conditions at a constant temperature of 23 °C and with a light/dark cycle of 16:8 h. The *M. persicae* population was originally collected from a pepper crop in Campo de Cartagena (Murcia, Spain) and had been maintained on pepper at IMIDA since 2016.

The nymphs found in this experiment were born during the choice bioassay after the released winged aphids settled on the pepper plants.

## 2.2. Bioactive Volatile Products

The bioactive volatiles used were (*E*)-anethole, farnesol (Sigma-Aldrich®, San Louis, MI, USA), distilled lemon oil (Citromil S.L., Santomera, Murcia, Spain) and waxy starch-coconut fatty acid methyl ester composite (code 19391-122), hereinafter coconut FAME, and this product was provided by the researchers James A. Kenar and Steven C. Cermak (National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Peoria, IL, USA). Another bioactive used was the product mixture formulated by Idai Nature S.L. (La Pobla de Vallbona, Valencia, Spain) using an undisclosed method.

The distilled lemon oil is composed of 71.1% limonene, 11.5%  $\beta$ -pinene, 8.2%  $\gamma$ -terpinene, 2.1%  $\alpha$ -pinene +  $\alpha$ -thuyene, 0.7% geraniol, 0.5% geraniol acetate and 0.4% neral [41]. The coconut FAME formulation is composed of 88.42% water, 6.98% waxy starch/pectin and 4.60% coconut fatty acid, and the Idai Nature S.L. product mixture contains equal amounts of (*Z*)-jasnone, citral, distilled lemon oil, farnesol and (*E*)-anethole, at a dose of 0.2% of the total of the product.

## 2.3. Preparation of Oil-in-Water (O/W) Nanoemulsions

Oil-in-water (O/W) nanoemulsions were prepared using a high-speed dispersion machine IKA® Labor-Pilot Controller 2000/4 (IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Germany) programmed to work each batch of 100 mL for 10 min at a rotor speed of 7941 rpm and a cooling temperature of 15 °C, which prevents overheating of the machine, maintaining the temperature in the mixing chamber at  $20 \pm 5$  °C and thus preventing losses of the bioactives by volatilisation during the process.

For the experiment, the O/W nanoemulsions were formulated at 0.2% alone or at 0.1% in blends of more than one product, with Tween® 80 (1:2, and for the blends, 1:1:2, 1:1:1:2, 1:1:1:1:2,) in distilled water, and used immediately for spraying.

## 2.4. Repellent and Reproductive Effects of Bioactive Volatile Nanoemulsions on Winged Individuals of *M. persicae* on Pepper Plants

Bioactive volatile nanoemulsions of (*E*)-anethole, farnesol, distilled lemon oil and coconut FAME, at 0.2% or 0.1% in blends of more than one product, with Tween® 80 in distilled water or the product mixture diluted to 0.2%, were sprayed onto pepper plants 25–30 cm high and at a BBCH growth stage of 501 (first flower bud visible) with a handheld sprayer (Polita 7, Matabi; Grupo Goizper, Gipuzkoa, Spain) at a rate of approximately 100 mL/plant. Plants were then placed into a 100 × 55 × 70 cm entomological cage inside a growth chamber. A treated plant was placed at one end of the cage and a control plant (treated with water) at the other, the plants being separated by a distance of 70 cm. The choice test was conducted under controlled conditions at a constant temperature of 23 °C and a with light/dark cycle of 16:8 h. In each cage, 25 winged aphids were released from a Petri dish placed in the middle of the cage, suspended about 35 cm high with the help of wires attached to the wooden frame of the cage (Figure 1). The Petri dish was previously painted black to avoid providing visual cues for aphids when choosing a plant, enhancing the odour cue. After 24 h, the winged individuals and nymphs on each plant were recorded.

The aphids and plants were renewed every day. The positions of the control plant and the treated plant were alternated in each cage and in each replicate to avoid bias in the choices.



**Figure 1.** Entomological cage with choice bioassay (control plant and treated plant) and the winged aphid shuttle.

In each replicate, six cages were used. A total of four replicates (applications) were performed per treatment per week (Monday to Thursday). Each treatment was evaluated in the same week. For each treatment, a total of 24 repetitions (cages) were carried out, using 24 control plants and 24 treated plants, and a total of 600 winged aphids were released (25 per cage).

The repellency index (%) (RI) was calculated after 24 h using the following formula [42]:

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

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

### 2.5. Statistical Analysis

For each treatment, the distribution of choices (expressed as a percentage) was calculated, i.e., the number of aphids that had chosen the treated plant or the number of aphids that had chosen the control plant divided by the total number of aphids that had chosen any plant. For statistical analysis, R software R version 4.2.2 was used [43]. The statistical significance of differences between each treatment and its control were assessed using an exact two-sided binomial test (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns  $p > 0.05$ ) with Clopper–Pearson 95% confidence intervals.

The average number of nymphs per female 24 h after the release of winged individuals of *M. persicae* was also counted for each treatment and its control. The *t*-test for paired samples was used for mean comparison, with a *p*-value  $\leq 0.05$  set as the threshold for statistical significance.

## 3. Results

### 3.1. Choice Distribution of Winged Individuals of *M. persicae* on Pepper Plants

Table 1 and Figure 2 show the choice distribution (treated (T) or control (C) plant) 24 h after the release of winged individuals of *M. persicae* in cages with pepper plants. The overall average percentage of individuals that made a choice was 78.1%, indicating that the methodology used to conduct this assay was appropriate. The percentage of choice

in all treatments was always greater than 40% and therefore, none of the treatments were excluded from the analysis.

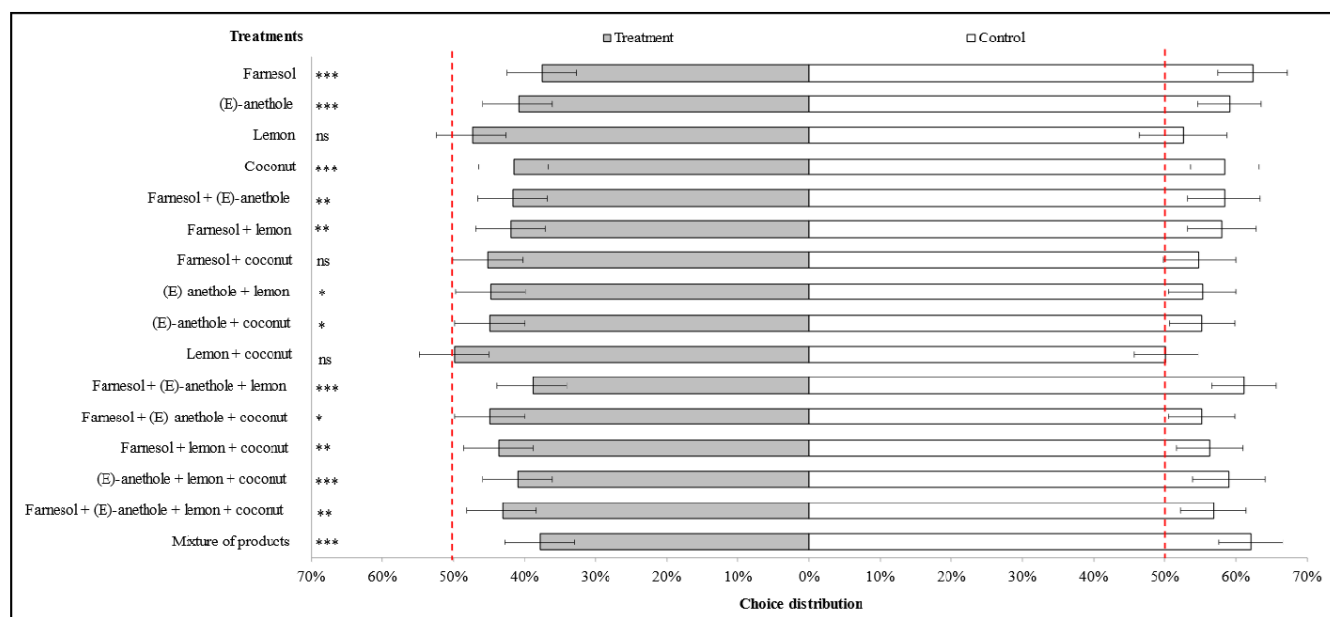
**Table 1.** Choice distribution and repellence index (RI) after 24 h of *M. persicae* winged individuals released in cages<sup>1</sup> with treated (T) and control (C) pepper plants.

| Treatments <sup>2</sup>                   | Number of Aphids |     |        |           | % Choice | % No Choice | RI (%) <sup>3</sup> |
|-------------------------------------------|------------------|-----|--------|-----------|----------|-------------|---------------------|
|                                           | C                | T   | Choice | No Choice |          |             |                     |
| Farnesol                                  | 245              | 147 | 392    | 208       | 65.33    | 34.67       | 40.24               |
| (E)-anethole                              | 282              | 195 | 477    | 123       | 79.50    | 20.50       | 30.85               |
| Lemon                                     | 141              | 127 | 268    | 332       | 44.67    | 55.33       | 9.93                |
| Coconut                                   | 242              | 172 | 414    | 186       | 69.00    | 31.00       | 28.93               |
| Farnesol + (E)-anethole                   | 219              | 156 | 375    | 225       | 62.50    | 37.50       | 28.77               |
| Farnesol + lemon                          | 245              | 177 | 422    | 178       | 70.33    | 29.67       | 27.76               |
| Farnesol + coconut                        | 213              | 175 | 388    | 212       | 64.67    | 35.33       | 17.84               |
| (E)-anethole + lemon                      | 249              | 201 | 450    | 150       | 75.00    | 25.00       | 19.28               |
| (E)-anethole + coconut                    | 264              | 214 | 478    | 122       | 79.67    | 20.33       | 18.94               |
| Lemon + coconut                           | 255              | 253 | 508    | 92        | 84.67    | 15.33       | 0.78                |
| Farnesol + (E)-anethole + lemon           | 290              | 184 | 474    | 126       | 79.00    | 21.00       | 36.55               |
| Farnesol + (E)-anethole + coconut         | 260              | 211 | 471    | 129       | 78.50    | 21.50       | 18.85               |
| Farnesol + lemon + coconut                | 247              | 191 | 438    | 162       | 73.00    | 27.00       | 22.67               |
| (E)-anethole + lemon + coconut            | 222              | 154 | 376    | 224       | 62.67    | 37.33       | 30.63               |
| Farnesol + (E)-anethole + lemon + coconut | 264              | 200 | 464    | 136       | 77.33    | 22.67       | 24.24               |
| Mixture of products <sup>4</sup>          | 288              | 175 | 463    | 137       | 77.17    | 22.83       | 39.24               |

<sup>1</sup> For each treatment, 24 cages were set up ( $n = 24$ ), and in each cage, 25 winged aphids were released. That is, a total of 600 aphids per treatment. <sup>2</sup> O/W nanoemulsions of bioactive volatiles at 0.2% or 0.1% in blends of more than one product, with Tween 80 (1:2 or 1:1:2, 1:1:1:2, 1:1:1:1:2 for the blends). <sup>3</sup> Repellency index (RI) =  $[1 - (T/C)] \times 100$ . Number of *M. persicae* winged on control plants (C) or treated plants (T) 24 h after aphid release. <sup>4</sup> The mixture of product is a combination of (Z)-jasmone, citral, distilled lemon oil, farnesol and (E)-anethole formulated by an undisclosed method in equal amounts, at a dose of 0.2% of the total of the bioactive products.

Most treatments caused repellency (Table 1 and Figure 2). The most active compounds, with a very highly significant probability ( $p < 0.001$ ) according to an exact two-sided binomial test, were farnesol (T = 147 individuals; 37% vs. C = 246 individuals; 63%), (E)-anethole (T = 195 individuals; 41% vs. C = 282 individuals; 59%) and coconut FAME (T = 172 individuals; 42% vs. C = 242 individuals; 58%). The mixtures that provided the best results were farnesol + (E)-anethole + distilled lemon oil (T = 184 individuals; 39% vs. C = 290 individuals; 61%) and (E)-anethole + distilled lemon oil + coconut FAME (T = 154 individuals; 41% vs. C = 222 individuals; 59%), as well as the five-product mixture treatment (T = 175 individuals; 38% vs. C = 288 individuals; 62%).

The binary mixtures of farnesol + (E)-anethole (T = 156 individuals; 42% vs. C = 219 individuals; 58%) and farnesol + distilled lemon oil (T = 177 individuals; 42% vs. C = 245 individuals; 58%), the ternary mixture of farnesol + distilled lemon oil + coconut FAME (T = 191 individuals; 44% vs. C = 247 individuals; 56%) and the quaternary mixture of farnesol + (E)-anethole + distilled lemon oil + coconut FAME (T = 200 individuals; 43% vs. C = 264 individuals; 57%) also showed highly significant levels of repellency ( $p < 0.01$ ). Binary mixtures without farnesol seemed to be less repellent (Figure 2). In the treatments with just distilled lemon oil or the binary mixtures of farnesol + coconut FAME and distilled lemon oil + coconut FAME, differences between the number of aphids found on control and treated plants were non-significant, indicating that they had no repellent or attractant effects (Figure 2).



**Figure 2.** Distribution of choice percentage of aphids (*M. persicae* winged) 24 h after release in cages ( $n = 24$ ) with treated and control pepper plants. The bioactive volatiles were formulated as nanoemulsions at 0.2% or 0.1% in blends of more than one product, with Tween 80. Statistical significance according to an exact two-sided binomial test (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns  $p > 0.05$ ). When the confidence interval crosses the red dashed line at 50%, there is no significant repellency or attraction. Error bars correspond to the Clopper–Pearson 95% confidence intervals.

The repellency index (RI) is shown in Table 1, expressed as a percentage (%). The treatment with the highest RI was farnesol (RI = 40.24%), followed by the mixture of product treatment (RI = 39.24%) and the mixture of farnesol + (E)-anethole + distilled lemon oil (RI = 36.55%), while (E)-anethole and the mixture of (E)-anethole + distilled lemon oil + coconut FAME both provided RIs of around 31%. Finally, another treatment with interesting repellent effects but with a slightly lower RI was coconut FAME (RI = 28.93%).

In short, the most repellent products were found to be farnesol, coconut FAME and (E)-anethole if applied alone, and the mixtures of farnesol with (E)-anethole alone or also with distilled lemon oil, and (E)-anethole with coconut FAME and distilled lemon oil. Distilled lemon oil alone showed no activity, but it enhanced the repellent properties of the blends. With the mixture of products (farnesol, citral, (E)-anethole, (Z)-jasmone and distilled lemon oil), the results were also very good.

### 3.2. Reproduction of Winged Individuals of *M. persicae* on Pepper Plants

Table 2 shows the average number of nymphs per female 24 h after the release of winged individuals of *M. persicae* in cages with pepper plants (control and treated). Significant differences were only observed for the mixture with farnesol + distilled lemon oil + coconut FAME ( $p = 0.031$ ), with the average number of nymphs on the treated plants (0.65 nymphs/female per day) being lower than that found in the control plants (0.97 nymphs/female per day). The treatments with the lowest mean were distilled lemon oil (0.40 nymphs/female) followed by (E)-anethole + distilled lemon oil + coconut FAME (0.44 nymphs/female), but differences with the corresponding controls did not reach significance in any cases. On the contrary, (E)-anethole alone stood out for being the treatment with which aphids reproduced in the largest numbers (1.16 nymphs/female per day), followed by the mixture of distilled lemon oil + coconut FAME (0.99 nymphs/female).

**Table 2.** Reproduction after 24 h of *M. persicae* winged individuals released in cages <sup>1</sup> with treated (T) and control (C) pepper plants.

| Treatments <sup>2</sup>                            | Mean Number of Nymphs/Adult per Day <sup>3</sup> |             | <i>t</i> -Test | <i>p</i> -Value <sup>4</sup> |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------|----------------|------------------------------|
|                                                    | T                                                | C           |                |                              |
| Farnesol                                           | 0.54 ± 0.10                                      | 0.68 ± 0.09 | 1.841          | 0.079                        |
| ( <i>E</i> )-anethole                              | 1.16 ± 0.15                                      | 0.99 ± 0.13 | −1.700         | 0.103                        |
| Lemon                                              | 0.40 ± 0.07                                      | 0.34 ± 0.09 | −0.898         | 0.379                        |
| Coconut                                            | 0.55 ± 0.06                                      | 0.54 ± 0.08 | −0.175         | 0.863                        |
| Farnesol + ( <i>E</i> )-anethole                   | 0.75 ± 0.12                                      | 0.72 ± 0.09 | −0.290         | 0.774                        |
| Farnesol + lemon                                   | 0.73 ± 0.07                                      | 0.79 ± 0.07 | 0.468          | 0.645                        |
| Farnesol + coconut                                 | 0.76 ± 0.15                                      | 0.70 ± 0.11 | −0.571         | 0.574                        |
| ( <i>E</i> )-anethole + lemon                      | 0.66 ± 0.07                                      | 0.78 ± 0.08 | 1.235          | 0.229                        |
| ( <i>E</i> )-anethole + coconut                    | 0.89 ± 0.09                                      | 0.78 ± 0.08 | −0.941         | 0.356                        |
| Lemon + coconut                                    | 0.99 ± 0.12                                      | 0.89 ± 0.11 | −0.817         | 0.422                        |
| Farnesol + ( <i>E</i> )-anethole + lemon           | 0.60 ± 0.09                                      | 0.67 ± 0.07 | 0.901          | 0.377                        |
| Farnesol + ( <i>E</i> )-anethole + coconut         | 0.58 ± 0.07                                      | 0.57 ± 0.06 | −0.266         | 0.792                        |
| Farnesol + lemon + coconut                         | 0.65 ± 0.10                                      | 0.97 ± 0.13 | 2.301          | 0.031 *                      |
| ( <i>E</i> )-anethole + lemon + coconut            | 0.44 ± 0.10                                      | 0.41 ± 0.05 | −0.266         | 0.793                        |
| Farnesol + ( <i>E</i> )-anethole + lemon + coconut | 0.69 ± 0.11                                      | 0.66 ± 0.07 | −0.424         | 0.676                        |
| Mixture of products <sup>5</sup>                   | 0.60 ± 0.07                                      | 0.52 ± 0.06 | −1.095         | 0.285                        |

<sup>1</sup> For each treatment, 24 cages were set up (*n* = 24), and in each cage, 25 winged aphids were released. That is, a total of 600 aphids per treatment. <sup>2</sup> O/W nanoemulsions of bioactive volatiles at 0.2% or 0.1% in blends of more than one product, with Tween 80 (1:2 or 1:1:2, 1:1:1:2, 1:1:1:1:2 for the blends). <sup>3</sup> Mean ± standard error of the mean number of nymphs per adult per day. <sup>4</sup> Asterisks indicate significant differences (*p*-value ≤ 0.05) between T (treated plants) and C (control plants). The *t*-test for paired samples was used for comparison of means in T and C within each treatment. <sup>5</sup> The mixture of product is a combination of (*Z*)-jasmone, citral, distilled lemon oil, farnesol and (*E*)-anethole formulated by an undisclosed method in equal amounts, at a dose of 0.2% of the total of the bioactive products.

#### 4. Discussion

Since the repellency of winged aphids is not well studied in the literature, nor is the repellent effect of nanoemulsions of bioactive volatiles on *M. persicae*, the results obtained herein provide new knowledge. Essential oils and their volatile compounds interact with insect olfactory receptors and therefore could act as repellents [17].

The essential oil of fennel and *Mentha suaveolens* Ehrhart inhibited the settlement of adult apterous individuals of *A. gossypii* in a choice bioassay with zucchini (*Cucurbita pepo* L.) leaves [44]. In addition, it has been found that peppermint (*Mentha x piperita* L.) essential oil and its main compounds menthol and menthone are repellents against apterous individuals of pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris), being the most promising substances together with (*E*)-cinnamaldehyde, estragole, carvone and (*E*)-anethole [45]. In our study, (*E*)-anethole (a major compound in anise and fennel essential oil) also showed repellent properties against the winged forms of *M. persicae*. This is consistent with findings [31,46] showing that anise essential oils and their major compound (*E*)-anethole, among others, inhibited the settlement of wingless individuals of *M. persicae* and *M. euphorbiae* in a choice test with pepper leaves. Although winged aphids have more developed olfactory receptors on their antennae than wingless individuals [16], (*E*)-anethole is perceived as a negative signal by both forms (wingless and winged), and hence, it can be considered a promising substance as an aphid repellent.

In field conditions, the potential repellent effect of bioactive volatiles has been tested, and findings showed that the release of garlic extract and (*E*)-β-farnesene was effective for *Metopolophium dirhodum* Walker and *Sitobion avenae* Fabricius, the predominant aphid

species in the wheat fields of Belgium [47]. Based on our results from the choice bioassay with potted pepper plants, farnesol (similar to the aphid alarm pheromone, (*E*)- $\beta$ -farnesene) notably repels the winged forms of *M. persicae*, which confirms previous findings of repellent effects of this substance on winged [30,31] and apterous aphids [31,41,42,46].

On the other hand, spraying methyl esters of coconut fatty acids provided good results both in terms of repellency index and choice distribution. This is the first report on the repellent activity of this product against an aphid crop pest. Some preliminary data were obtained by our group [48] concerning the impact on winged individuals of *M. persicae* of coconut FAME, alone or combined with (*E*)-anethole alone, at a dose of 0.1–0.2% of the active ingredient (nanoemulsion 1:2) sprayed on pepper plants. Previously, the repellent properties of coconut oil-derived compounds were tested [33] against blood-sucking arthropods, such as flies, ticks, bed bugs and mosquitoes in laboratory bioassays. These authors found that their effect can last up to two weeks after application, indicating that these compounds have longer residual activity than that of *N,N*-diethyl-meta-toluamide (DEET), considered the standard insect repellent since its development in 1944. It is known that the use of DEET causes health problems in humans, particularly infants and pregnant women, and hence, it is necessary to find alternatives [49]. It has also been shown that an aqueous starch-based formulation containing natural coconut fatty acids protects cattle from fly bites for up to 96 h, which, according to the authors, is the longest reported protection by a natural repellent product [33]. For all these reasons, compounds derived from coconut oil seem to be a good alternative to DEET. It would be interesting to continue investigating the repellent properties of coconut oil-derived compounds on other insect vectors that transmit diseases to humans, animals and plants.

Several veterinary products for flea and tick control in pets contain D-limonene (from citrus peel) as an active ingredient [49]. In aphids, it has been demonstrated by a choice bioassay with pomegranate and grapevine leaf discs that the essential oils of *Citrus x aurantium* L. and *C. reticulata* Blanco showed repellent effects against the pomegranate aphid *Aphis punicae* Passerini and the vine aphid *A. illinoisensis* Shimer [50]. Furthermore, it has been shown that the essential oil of caraway seeds (*Carum carvi* L.), rich in D-carvone and D-limonene, exhibits repellent activity against apterous individuals of *M. persicae* on white cabbage plants (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) [51]. In another study [31], no settlement inhibition of apterous individuals of *M. persicae* or *M. euphorbiae* in pepper leaves associated with lemon oil or its main component, limonene, was observed. Another compound present in citrus essential oils is citral, and it has been demonstrated, through choice bioassays with leaf discs and by recording antennal and body movements, that several organic compounds derived from citral inhibited settlement and had repellent effects against apterous individuals of *M. persicae* [52]. In our experiments, distilled lemon oil was not a good aphid repellent against winged forms of *M. persicae*, but it did improve the repellent properties of the mixtures when added as an ingredient.

The repellent effect of aromatic plant essential oil on aphids was tested [53], and it was reported that the essential oils of *Cymbopogon citratus* (from Candolle) Stapf, *Salvia officinalis* L. and *Origanum majorana* L., repelled apterous individuals of *M. persicae*, *A. gossypii*, *A. spiraeicola* Patch and *A. fabae* Scopoli in choice bioassays. On the other hand, it has been observed that the essential oils of two species of *Mentha* sp. and *Salvia* sp. have repellent effects and nymph production deterrence effects against apterous individuals of *A. punicae* in choice bioassays with pomegranate leaves [54].

In the part of the study assessing the reproduction of winged individuals of *M. persicae* on pepper plants after spraying with the bioactive volatile nanoemulsions, promising results were obtained with farnesol + distilled lemon oil + coconut FAME, with this mixture reducing the fecundity of winged individuals of *M. persicae*. Among the possible modes of action of essential oils, the reduction in the fertility of insects [18] should be considered, but in the case of our bioassay, the exposure to the treatment (just 24 h) seems too short a time to be able to appreciate such an effect. Another possible explanation for this reproduction inhibition is that females have doubts about the suitability of the host to establish a colony

due to their perception of volatiles. That is, having already landed on the treated plant, they do not like it, perhaps due to its odour or the taste of the plant tissue. Maybe the treatment modifies the composition of the sap and/or cell juices, the insects are confused by the volatiles masking the host plant odour, or they have been made uncomfortable by the residual contact effect of the treatment. Whatever the reasons, it seems that reproduction is inhibited in some instances, but to confirm and understand this effect, there is a need for further research.

## 5. Conclusions

Based on our findings, we can conclude that the methyl esters of coconut fatty acids are slightly repellent to winged individuals of *M. persicae*, which is an innovation in the potential use of this product against an agricultural pest providing the candidate substance is registered as an active ingredient for plant protection.

The pure compounds farnesol and (*E*)-anethole also slightly repelled the winged forms of *M. persicae*. Distilled lemon oil, despite not showing repellent activity on its own, is an interesting substance to consider in a formulation, in blends with other bioactives. More research is needed on the repellent properties of the aforementioned products on aphid pests.

**Author Contributions:** Conceptualization, F.M., P.G. and M.J.P.-V.; methodology, F.M.; validation, P.G. and M.J.P.-V.; formal analysis, F.M. and P.G.; investigation, F.M., P.G. and M.J.P.-V.; writing—original draft preparation, F.M.; writing—review and editing, P.G. and M.J.P.-V.; visualization, P.G. and M.J.P.-V.; supervision, P.G. and M.J.P.-V.; project administration, M.J.P.-V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the European Regional Development Fund (FEDER 2021–2027) through the IMIDA research project 50463 “Desarrollo de modelos sostenibles de producción agrícola, ganadera y acuícola” and its subproject “Actividad de sustancias de origen botánico en áfidos vectores de virus fitopatógenos y desarrollo de nanoformulaciones para la protección de cultivos”.

**Data Availability Statement:** The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

**Acknowledgments:** The authors extend their appreciation to the European Regional Development Fund for funding this research through the IMIDA research project 50463.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. IPPC Secretariat. International Year of Plant Health—Final report. In *Protecting Plants, Protecting Life*; FAO on behalf of the Secretariat of the International Plant Protection Convention; FAO: Rome, Italy, 2021. [CrossRef]
2. Remaudiere, G.; Remaudiere, M. *Catalogue des Aphididae du Monde/Catalogue of the World's Aphididae (Homoptera, Aphidoidea)*; INRA Editions (Collection Techniques et Pratiques); Editions Quae: Paris, France, 1997; p. 475.
3. Blackman, R.L.; Eastop, V.F. *Aphids on the World's Crops: An Identification and Information Guide*, 2nd ed.; Wiley: Chichester, UK, 2000; p. 466.
4. Matthews, R.E.F.; Hull, R. *Matthews Plant Virology*, 4th ed.; Elsevier Academic Press: San Diego, CA, USA, 2002; p. 1056.
5. Blackman, R.L.; Eastop, V.F. Taxonomic issues. In *Aphids as Crop Pests*, 2nd ed.; van Emden, H.F., Harrington, R., Eds.; CABI: Wallingford, UK, 2017; pp. 1–36. [CrossRef]
6. Nault, L.R. Arthropod transmission of plant viruses: A new synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1997**, *90*, 521–541. [CrossRef]
7. Garcia-Mari, F.; Costa-Comelles, J.; Ferragut, F. *Las Plagas Agrícolas*, 2nd ed.; M.V. Phytoma-España, S.L.: Valencia, Spain, 1994; p. 376.
8. Perez, P.; Duque, M.; Collar, J.L.; Avilla, C.; Fereres, A. Activity of alatae aphids landing on open-field pepper crops in Spain. *J. Plant Dis. Prot.* **2003**, *110*, 195–202.
9. Sanchez, J.A.; La-Spina, M.; Michelena, J.M.; Lacasa, A.; Hermoso de Mendoza, A. Ecology of the aphid pests of protected pepper crops and their Parasitoids. *Biocontrol Sci. Technol.* **2011**, *21*, 171–188. [CrossRef]
10. De Blas, C.; Carazo, G.; Castro, C.; Romero, J. Estudios epidemiológicos sobre el virus del mosaico del pepino en diferentes cultivos y provincias españolas; identificación serológica de los subgrupos DTL y ToRS. *Bol. San. Veg. Plagas* **1993**, *19*, 345–353.
11. Pérez, P.; Gemenó, C.; Verdugo, M.; Soto, M.J.; Ponz, F.; Fereres, A. Dinámica de poblaciones de vectores y transmisión del virus Y de la patata en cultivos de pimiento. *Bol. San. Veg. Plagas* **1992**, *18*, 225–235.

12. Villanueva, V.; Castillo, P.; Font, M.I.; Alfaro-Fernández, A.; Moriones, E.; Navas-Castillo, J. First report of pepper vein yellows virus infecting sweet pepper in Spain. *Plant Dis.* **2013**, *97*, 1261. [\[CrossRef\]](#)
13. Katis, N.I.; Tsitsipis, J.A.; Stevens, M.; Powell, G. Transmission of plant viruses. In *Aphids as Crop Pests*, 2nd ed.; van Emden, H.F., Harrington, R., Eds.; CABI: Wallingford, UK, 2017; pp. 353–390.
14. Harrington, R.; Clark, S.J.; Welham, S.J.; Verrier, P.J.; Denholm, C.H.; Hullé, M.; Maurice, D.; Rounsevell, M.D.; Cocu, N. Environmental change and the phenology of European aphids. *Glob. Chang. Biol.* **2007**, *13*, 1550–1564. [\[CrossRef\]](#)
15. Petterson, J.; Tjallingii, W.F.; Hardie, J. Host-plant selection and feeding. In *Aphids as Crop Pests*, 2nd ed.; van Emden, H.F., Harrington, R., Eds.; CABI: Wallingford, UK, 2017; pp. 87–114.
16. Pickett, J.A.; Bruce, T.B.A.; Glinwood, R.T. Chemical Ecology. In *Aphids as Crop Pests*, 2nd ed.; van Emden, H.F., Harrington, R., Eds.; CABI: Wallingford, UK, 2017; pp. 235–260.
17. Rathore, H.S. Section I: Essential Oils as Green Pesticides. Chapter 1: Green pesticides for organic farming: Occurrence and properties of essential oils for use in pest control. In *Green Pesticides Handbook: Essential Oils for Pest Control*; Nolle, L.M.L., Rathore, H.S., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2017; pp. 3–25.
18. Nolle, L.M.L.; Rathore, H.S. *Green Pesticides Handbook: Essential Oils for Pest Control*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2017; p. 571.
19. Butnariu, M.; Sarac, I. Essential oils from plants. *J. Biotechnol. Biomed. Sci.* **2018**, *1*, 35–43. [\[CrossRef\]](#)
20. Isman, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* **2000**, *19*, 603–608. [\[CrossRef\]](#)
21. Regnault-Roger, C. Essential oils in insect control. In *Natural Products*; Ramawat, K., Mérillon, J.M., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; pp. 4087–4107. [\[CrossRef\]](#)
22. Park, Y.L.; Tak, J.H. Essential oils for arthropod pest management in agricultural production systems. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*; Preedy, V.R., Ed.; Academic Press: London, UK, 2016; pp. 61–70. [\[CrossRef\]](#)
23. Ngegba, P.M.; Cui, G.; Khalid, M.Z.; Zhong, G. Use of botanical pesticides in agriculture as an alternative to synthetic pesticides. *Agriculture* **2022**, *12*, 600. [\[CrossRef\]](#)
24. Martín, F.; Garzo, E.; Guirao, P.; Pascual-Villalobos, M.J.; Ferreres, A.; Moreno, A. Persistence of nanoemulsions of bioactive volatiles and their impact on aphid feeding behaviour. *J. Pest. Sci.* **2024**, *97*, 1–15. [\[CrossRef\]](#)
25. Yarou, B.B.; Bokonon-Ganta, A.H.; Verheggen, F.J.; Lognay, G.C.; Francis, F. Aphid behavior on *Amaranthus hybridus* L. (Amaranthaceae) associated with *Ocimum* spp. (Lamiaceae) as repellent plants. *Agronomy* **2020**, *10*, 736. [\[CrossRef\]](#)
26. Dardouri, T.; Gautier, H.; Ben Issa, R.; Costagliola, G.; Gomez, L. Repellence of *Myzus persicae* (Sulzer): Evidence of two modes of action of volatiles from selected living aromatic plants. *Pest. Manag. Sci.* **2019**, *75*, 1571–1584. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Hori, M. Repellency of rosemary oil against *Myzus persicae* in a laboratory and in a greenhouse. *J. Chem. Ecol.* **1998**, *24*, 1425–1432. [\[CrossRef\]](#)
28. Hori, M. 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. *Appl. Entomol. Zool.* **1999**, *34*, 351–358. [\[CrossRef\]](#)
29. Martín-López, B.; López-López, V.; Cabaleiro Sobrino, C. Short communication: Repellency and toxicity of oils from different origins on *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) in pepper. *Span. J. Agric. Res.* **2003**, *1*, 73–77. [\[CrossRef\]](#)
30. Halbert, S.E.; Corsini, D.; Wiebe, M.; Vaughn, S.F. Plant-derived compounds and extracts with potential as aphid repellents. *Ann. Appl. Biol.* **2009**, *154*, 303–307. [\[CrossRef\]](#)
31. Cantó-Tejero, M.; Casas, J.L.; Marcos-García, M.A.; Pascual-Villalobos, M.J.; Florencio-Ortiz, V.; Guirao, P. Essential oils-based repellents for the management of *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*. *J. Pest. Sci.* **2022**, *95*, 365–379. [\[CrossRef\]](#)
32. Zhang, Y.; Zhang, T.; Wang, X.; Bian, Z.; Zhang, X.; Yang, G.; Lu, Y. Volatiles from essential oils of three Lamiaceae plants repel the winged cotton aphid, disturb its feeding behavior and reduce its fecundity. *Pest. Manag. Sci.* **2024**, *80*, 9. [\[CrossRef\]](#)
33. Zhu, J.J.; Cermak, S.C.; Kenar, J.A.; Brewer, G.; Haynes, K.F.; Boxler, D.; Bajer, P.D.; Wang, D.; Wang, C.; Li, A.Y.; et al. Better than DEET repellent compounds derived from coconut oil. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14053. [\[CrossRef\]](#)
34. Koul, O.; Walia, S.; Dhaliwal, G.S. Essential oils as green pesticides: Potential and constraints. *Biopestic. Int.* **2008**, *4*, 63–84.
35. Turek, C.; Stintzing, F.C. Stability of essential oils: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2013**, *12*, 40–53. [\[CrossRef\]](#)
36. Benelli, G.; Lukehart, C.M. Special issue: Applications of green-synthesized nanoparticles in pharmacology, parasitology and entomology. *J. Clust. Sci.* **2017**, *28*, 1–2. [\[CrossRef\]](#)
37. Tadros, T.; Izquierdo, P.; Esquena, J.; Solans, C. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv. Colloid. Interface Sci.* **2004**, *108–109*, 303–318. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. McClements, D.J. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences and similarities. *Soft Matter* **2012**, *8*, 1719–1729. [\[CrossRef\]](#)
39. Anton, N.; Vandamme, T.F. Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 978–985. [\[CrossRef\]](#)
40. Philògene, B.J.R.; Regnault-Roger, C.; Vincent, C. Productos fitosanitarios insecticidas de origen vegetal: Promesas de ayer y hoy. In *Biopesticidas de Origen Vegetal*; Regnault-Roger, C., Philògene, B.J.R., Vincent, C., Eds.; Ediciones Mundi Prensa: Madrid, Spain, 2004; pp. 1–18.
41. Pascual-Villalobos, M.J.; Cantó-Tejero, M.; Vallejo, R.; Guirao, P.; Rodríguez-Rojo, S.; Cocero, M.J. Use of nanoemulsions of plant essential oils as aphid repellents. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *110*, 45–57. [\[CrossRef\]](#)

42. Gutierrez, C.; Fereres, A.; Reina, M.; Cabrera, R.; Gonzalez-Coloma, A. Behavioral and sublethal effects of structurally related lower terpenes on *Myzus persicae*. *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 1641–1650. [CrossRef]
43. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2022. Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 23 March 2024).
44. Taglienti, A.; Donati, L.; Dragone, I.; Ferretti, L.; Gentili, A.; Araniti, F.; Sapienza, F.; Astolfi, R.; Fiorentino, S.; Vecchiarelli, V.; et al. In vivo antiphytoviral and aphid repellency activity of essential oils and hydrosols from *Mentha suaveolens* and *Foeniculum vulgare* to control Zucchini Yellow Mosaic Virus and its vector *Aphis gossypii*. *Plants* **2023**, *12*, 1078. [CrossRef]
45. Lacotte, V.; Rey, M.; Peigner, S.; Mercier, P.E.; Rahioui, I.; Sivignon, C.; Razy, L.; Benhamou, S.; Livi, S.; da Silva, P. Bioactivity and chemical composition of forty plant essential oils against the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* revealed peppermint oil as a promising biorepellent. *Ind. Crops Prod.* **2023**, *197*, 116610. [CrossRef]
46. Pascual-Villalobos, M.J.; Guirao, P.; Diaz-Baños, F.G.; Cantó-Tejero, M.; Villora, G. Oil in water nanoemulsion formulations of botanical active substances. In *Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives*; Koul, O., Ed.; Elsevier Academic Press: San Diego, CA, USA, 2019; pp. 223–247. [CrossRef]
47. Zhou, H.; Chen, L.; Liu, Y.; Chen, J.; Francis, F. Use of slow-release plant infochemicals to control aphids: A first investigation in a Belgian wheat field. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31552. [CrossRef] [PubMed]
48. Martín Pérez, F.; Pascual-Villalobos, M.J.; Guirao, P.; Kenar, J.A.; Cermak, S.C. Setting up preliminary tests to prove the effect of coconut fatty acid as an aphid repellent in pepper. In Proceedings of the 32nd Annual Meeting AAIC, Bologna, Italy, 5–8 September 2021.
49. Isman, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* **2006**, *51*, 45–66. [CrossRef] [PubMed]
50. Alotaibi, S.S.; Darwish, H.; Alzahrani, A.K.; Alharthi, S.; Alghamdi, A.S.; Al-Barty, A.M.; Helal, M.; Maghrabi, A.; Baazeem, A.; Alamari, H.A.; et al. Environment-friendly control potential of two citrus essential oils against *Aphis punicae* and *Aphis illinoisensis* (Hemiptera: Aphididae). *Agronomy* **2022**, *12*, 2040. [CrossRef]
51. Girardi, J.; Berke-Lubinska, K.; Mežaka, I.; Nakurte, I.; Skudrinš, G.; Pastare, L. In vivo bioassay of the repellent activity of caraway essential oil against green peach aphid. *Insects* **2023**, *14*, 876. [CrossRef] [PubMed]
52. Danciewicz, K.; Szumny, A.; Wawrzęńczyk, C.; Gabrys, B. Repellent and antifeedant activities of citral-derived lactones against the peach potato aphid. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8029. [CrossRef]
53. Khaled-Gasmi, W.; Hamouda, A.B.; Chaieb, I.; Souissi, R.; Ascrizzi, R.; Flamini, G.; Boukhris-Bouhachem, S. Natural repellents based on three botanical species essential oils as an eco-friendly approach against aphids. *S. Afr. J. Bot.* **2021**, *141*, 133–141. [CrossRef]
54. Sayed, S.; Soliman, M.M.; Al-Otaibi, S.; Hassan, M.M.; Elarmouty, S.-A.; Abozeid, S.M.; El-Shehawi, A.M. Toxicity, deterrent and repellent activities of four essential oils on *Aphis punicae* (Hemiptera: Aphididae). *Plants* **2022**, *11*, 463. [CrossRef]

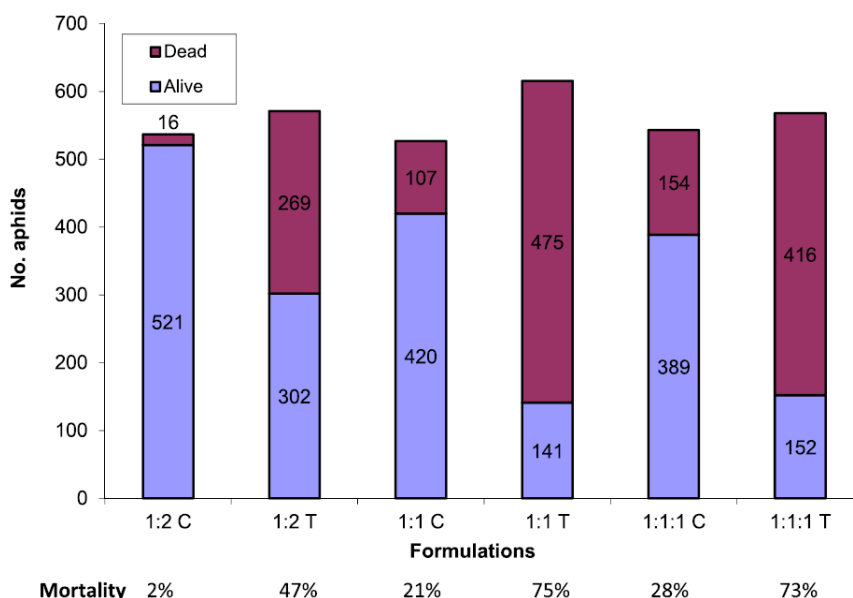
**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## **5. Resultados generales**

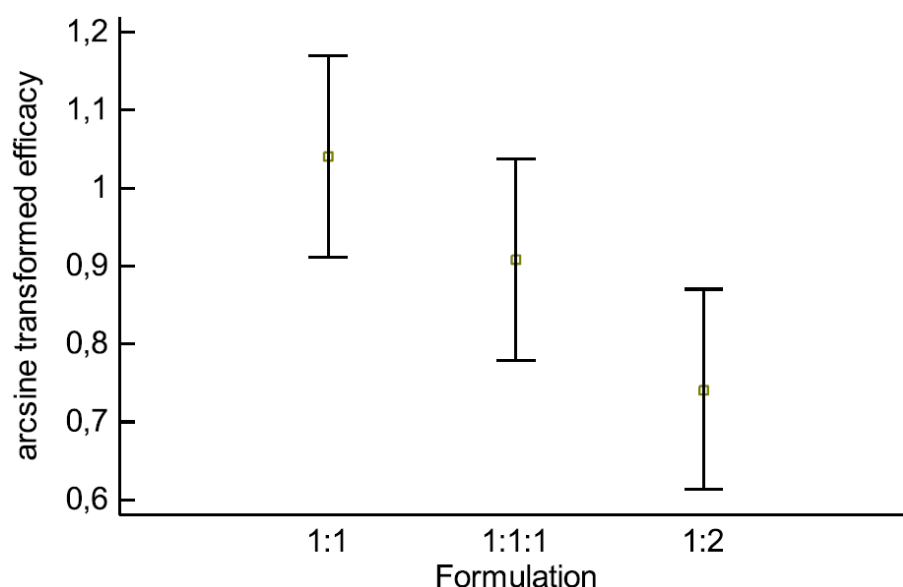
## 5.1. Efecto insecticida.

Para la consecución de uno de los objetivos de esta tesis doctoral, se ha evaluado, en condiciones de laboratorio, la eficacia insecticida sobre individuos ápteros de *M. persicae* en discos de hoja de pimiento en placa Petri, de una mezcla de 5 bioactivos volátiles (cital, (E)-anetol, (Z)-jasmona, farnesol y aceite esencial de limón (*Citrus limon* L.) a partes iguales formulada de 3 maneras distintas dependiendo de los surfactantes utilizados para elaborar la nanoemulsión mediante un homogeneizador de alta velocidad IKA Labor Pilot 2000/4 (IKA-Werke GmbH and Co. Staufen, Germany): formulación 1:2 con Tween80®, formulación 1:1 con lecitina de soja y formulación 1:1:1 con lecitina de soja y aceite de girasol.

La Figura 17 muestra el número de pulgones vivos y muertos, así como la mortalidad obtenida en cada una de las formulaciones 1:2 (Tween80®), 1:1 (lecitina de soja) y 1:1:1 (lecitina de soja y aceite de girasol). Se ha calculado la eficacia con la fórmula de Henderson-Tilton, obteniéndose valores del 45%, 71% y 63% respectivamente, por lo que el producto mezcla tuvo un mejor efecto insecticida cuando se utilizó lecitina de soja en la formulación, habiendo diferencias estadísticamente significativas entre la formulación 1:2 y la 1:1 según el test LSD (Figura 18).

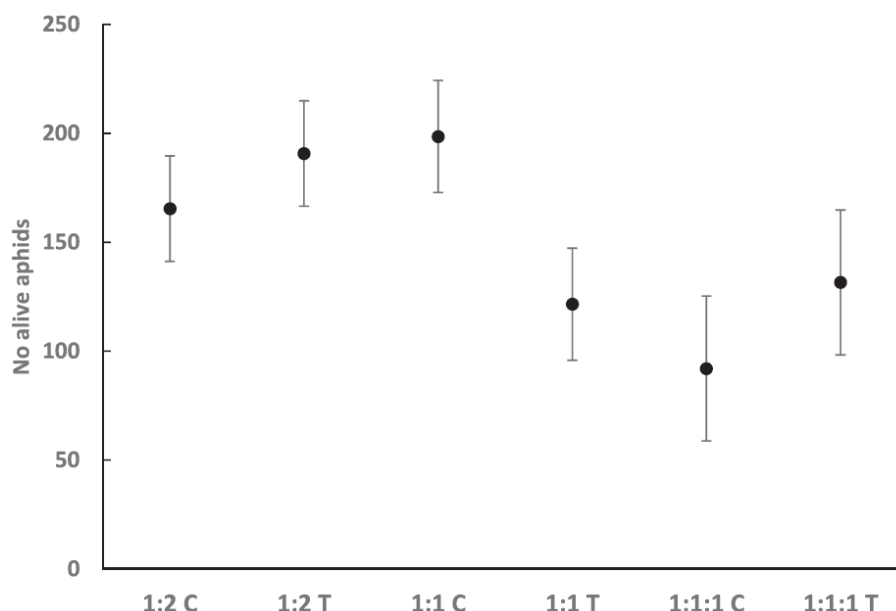


**Figura 17.** Número de pulgones vivos y muertos y porcentaje de mortalidad cuatro días después de la pulverización con 3 formulaciones (1:2 Tween80®, 1:1 lecitina de soja y 1:1:1 lecitina de soja y aceite de girasol) de nanoemulsiones del producto mezcla de bioactivos volátiles al 1% en placas Petri con *Myzus persicae* (n = 30 y aproximadamente 20 pulgones/placa). La letra C corresponde al control sin bioactivo y la T a los tratamientos con bioactivos.



**Figura 18.** Medias e intervalos de LSD del 95% de los datos de eficacia (transformación de la raíz cuadrada del arcoseno), cuatro días después del tratamiento, de las placas Petri con *Myzus persicae* en hoja de pimiento y pulverizados con el producto mezcla al 1%.

También se evaluó la efectividad de estas mismas formulaciones en condiciones de campo, mediante un experimento llevado a cabo en abril de 2020 en dos invernaderos de pimiento. En la Figura 19 se representan las medias e intervalos de LSD del 95% del número de pulgones vivos de *M. persicae*, 4 días después del tratamiento con las 3 formulaciones (1:2, 1:1 y 1:1:1) del producto mezcla al 1%.



**Figura 19.** Experimento de campo 2020: medias e intervalos de LSD del 95% del número de pulgones vivos de *Myzus persicae* 4 días después del tratamiento (T) con 3 formulaciones (1:2 Tween80®, 1:1 lecitina de soja y 1:1:1 lecitina de soja y aceite de girasol) del producto mezcla al 1% y sus respectivos controles (C).

Como se puede apreciar en la figura anterior (Figura 19), las formulaciones 1:2 (Tween 80®) y 1:1:1 (lecitina de soja y aceite de girasol) no mostraron diferencias significativamente estadísticas respecto a sus controles en cuanto al número de pulgones vivos a los 4 días, pero si se obtuvo una reducción de las poblaciones de pulgones mediante la pulverización del producto mezcla al 1% formulado con lecitina de soja (1:1), con diferencias significativamente estadísticas respecto a su control según la prueba de Kruskal-Wallis ( $H = 5.451$ ,  $df = 1$ ,  $p \text{ valor} = 0.0195$ ), por lo que esto fue consistente con los resultados de la prueba de eficacia en el laboratorio.

Por otro lado, en lo que respecta al número de pulgones muertos, tal y como muestra el diagrama de caja y bigotes de la Figura 20, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el número de pulgones muertos en las plantas tratadas con la formulación 1:2 con Tween80® al compararlas con su control cuatro días después de la pulverización ( $F = 18,62^{**}$ ), pero en este caso no se encontraron diferencias en las otras dos formulaciones y sus controles (Figura 20). En la Figura 21, se puede ver una hoja de pimienta con pulgones muertos.

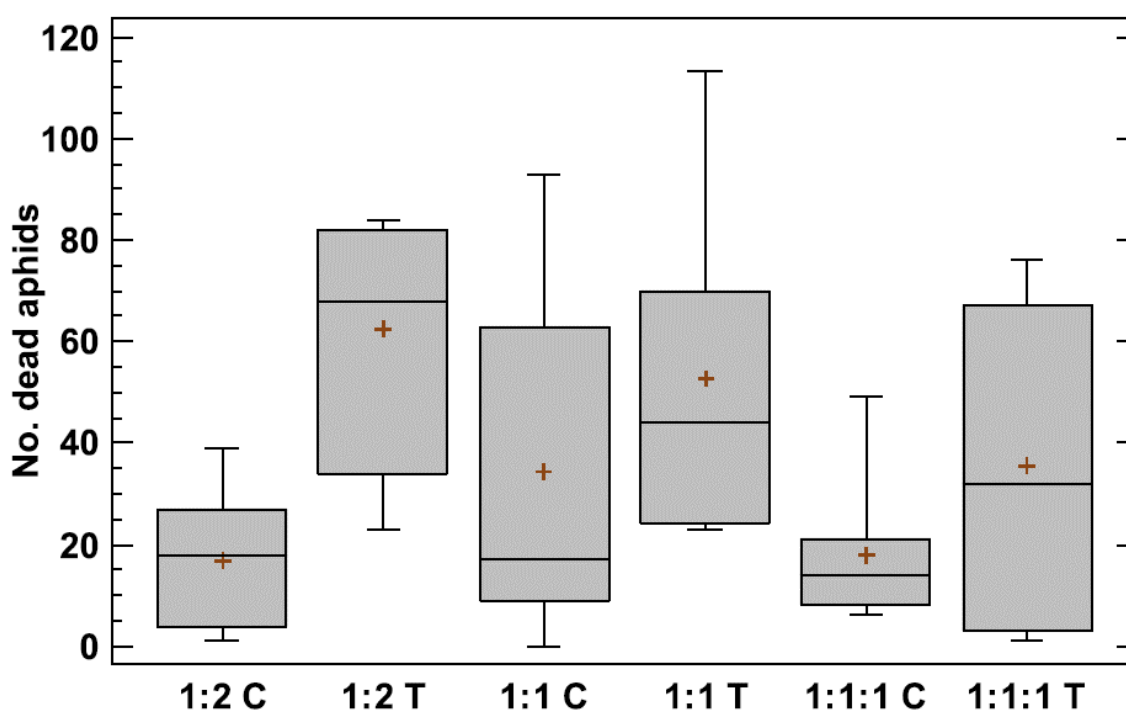


Figura 20. Experimento de campo 2020: Diagrama de caja y bigotes de pulgones muertos de *Myzus persicae* 4 días después del tratamiento (T) con 3 formulaciones (1:2 Tween80®, 1:1 lecitina de soja y 1:1:1 lecitina de soja y aceite de girasol) del producto mezcla al 1% y sus respectivos controles (C).



**Figura 21. Mortalidad de pulgones tras la pulverización de nanoemulsiones del producto mezcla al 1%.**

También se observaron síntomas de fitotoxicidad en los días siguientes a la aplicación de los bioactivos volátiles: ligera sequedad de las puntas de las hojas y pétalos de las flores en algunos casos o manchas secas en las hojas. Sin embargo, no se observaron daños en los frutos de pimiento. Tales síntomas fueron evidentes tanto con la formulación con Tween 80® 1:2 como con lecitina de soja 1:1, pero no con la formulación con lecitina de soja y aceite de girasol 1:1:1. Además, se comprobó que, si la dosis de aplicación se reducía del 1% al 0,5% o incluso al 0,25%, también disminuía la eficacia insecticida y los daños por fitotoxicidad.

Dado que la actividad de las nanoemulsiones dependen del tamaño de partícula y de la estabilidad de la mezcla, se decidió profundizar más acerca de las propiedades de las nanoemulsiones y se caracterizaron las formulaciones 1:2 (Tween80®) y 1:1:1 (lecitina de soja y aceite de girasol).

En la Tabla 4 se muestra un resumen de los resultados de las caracterizaciones a diferentes concentraciones de las 2 nanoemulsiones citadas, además también se muestra la caracterización de sus respectivos controles (sin los productos volátiles).

**Tabla 4. Caracterización<sup>a</sup> de nanoemulsiones de mezcla de productos volátiles de plantas y sus controles.**

| Producto                                                     | Concentración (%)              | Tamaño de partícula medio (Z average, nm) | PdI      | Distribución poblaciones de partículas (Peaks <sup>b</sup> , %) | Tamaño de partícula (nm) | Potencial Z (mV) | Partículas/ml          |        |                        |
|--------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------|----------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------|------------------------|--------|------------------------|
| Formulación 1:1:1 (con lecitina de soja y aceite de girasol) |                                |                                           |          |                                                                 |                          |                  |                        |        |                        |
| Mezcla <sup>c</sup>                                          | 5                              | 434 ± 10,9                                | 0,725    | 85<br>15                                                        | 559<br>4671              | -28,78           | 7,0 x 10 <sup>15</sup> |        |                        |
|                                                              | 1                              | 254 ± 3,132                               | 0,429    | 55<br>39<br>6                                                   | 490<br>143<br>4733       |                  |                        |        |                        |
|                                                              | 0,25                           | 216 ± 2,974                               | 0,401    | 84<br>16                                                        | 259<br>2474              |                  |                        |        |                        |
|                                                              | 5                              | 324 ± 16,918                              | 0,512    | 80<br>13<br>7                                                   | 424<br>4035<br>61        |                  |                        |        |                        |
|                                                              | 2                              | 394 ± 19,568                              | 0,753    | 42<br>37<br>21                                                  | 591<br>180<br>4541       |                  |                        |        |                        |
|                                                              | 1                              | 250 ± 8,876                               | 0,533    | 82<br>18                                                        | 295<br>3550              |                  |                        |        |                        |
| Control <sup>d</sup>                                         | 0,25                           | 282 ± 1,531                               | 0,692    | 76<br>24                                                        | 324<br>4118              | -28,15           | 8,1 x 10 <sup>10</sup> |        |                        |
|                                                              | Formulación 1:2 (con Tween80®) |                                           |          |                                                                 |                          |                  |                        |        |                        |
|                                                              | 5                              | 303 ± 12,319                              | 0,729    | 80<br>7                                                         | 336<br>74                |                  |                        | -17,17 | 5,8 x 10 <sup>12</sup> |
|                                                              | 1                              | 70 ± 7,069                                | 0,802    | 75<br>20                                                        | 179<br>16                |                  |                        |        |                        |
| 0,25                                                         | 201 ± 61,768                   | 0,298                                     | 63<br>37 | 161<br>15                                                       |                          |                  |                        |        |                        |
| Control <sup>d</sup>                                         | 5                              | 341 ± 21,764                              | 0,667    | 85<br>8                                                         | 405<br>5169              | -7,29            | 3,7 x 10 <sup>15</sup> |        |                        |
|                                                              | 2                              | 10 ± 0,194                                | 0,294    | 87<br>10                                                        | 9<br>650                 |                  |                        |        |                        |
|                                                              | 1                              | 10 ± 0,044                                | 0,268    | 88<br>12                                                        | 10<br>1452               |                  |                        |        |                        |
|                                                              | 0,25                           | 121 ± 92,442                              | 0,298    | 83<br>15                                                        | 9<br>285                 |                  |                        |        |                        |

<sup>a</sup> El tamaño de partícula y el PdI se midieron con un Zetasizer Nano ZS. El potencial Z y las partículas/ml se midieron con un Zetasizer Advance Ultrared (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, Worcestershire, United Kingdom).

<sup>b</sup> Solo se incluyeron las poblaciones con > 5% de representación.

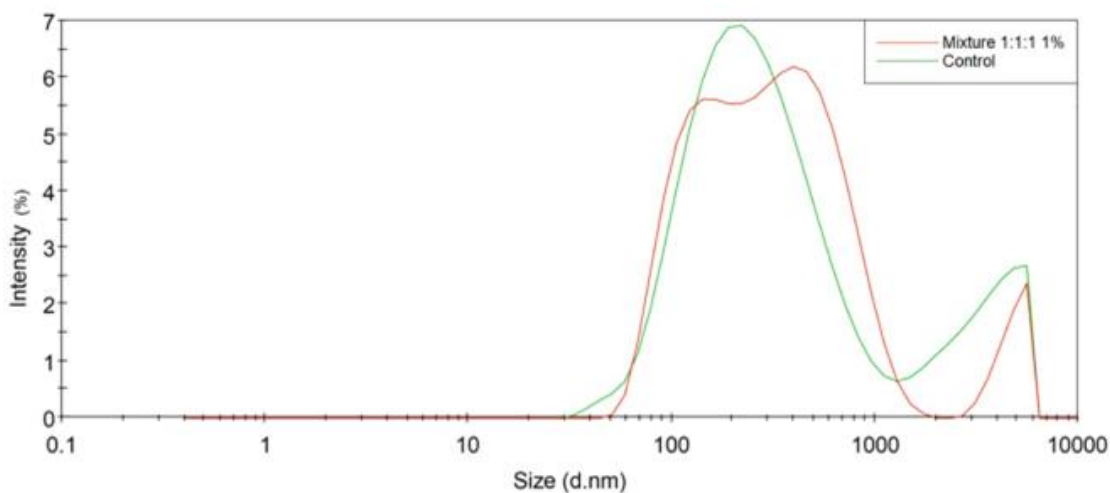
<sup>c</sup> La mezcla contenía cinco productos bioactivos ((E)-anetol, (Z)-jasmona, citral, farnesol y aceite esencial de limón) en cantidades iguales. Las emulsiones se prepararon al 5% y luego se diluyeron.

<sup>d</sup> El control se preparó de la misma manera, excepto los productos bioactivos.

Se encontraron unas nanoemulsiones polidispersas con 2-3 poblaciones de partículas que variaban de 15 a 336 nm de tamaño, en la formulación 1:2, siendo de mayor tamaño (143-4733 nm) en la formulación 1:1:1, la cual tenía una mayor estabilidad (28,78 mV de potencial-Z). El índice de polidispersidad (PdI) estuvo dentro del rango de 0,401-0,725 para la formulación 1:1:1 y de 0,298-0,802 para la formulación 1:2. Dichos valores indican muestras polidispersas, excepto para el control con Tween80® (formulación 1:2) y sus diluciones al 2%, 1% y 0,25% en las que PdI < 0,3.

En la Figura 22 se representa la distribución del tamaño de partícula de la nanoemulsión del producto mezcla (formulación 1:1:1) al 1% y su control. Como se puede apreciar, el tratamiento presenta principalmente dos tamaños de partículas, uno de

490 nm y otro de 143 nm de tamaño (size), mientras que el control muestra una población de partículas de 295 nm. Aunque, si bien es cierto, en ambos casos se encontraron poblaciones minoritarias de partículas, de más de 3500 nm de tamaño.



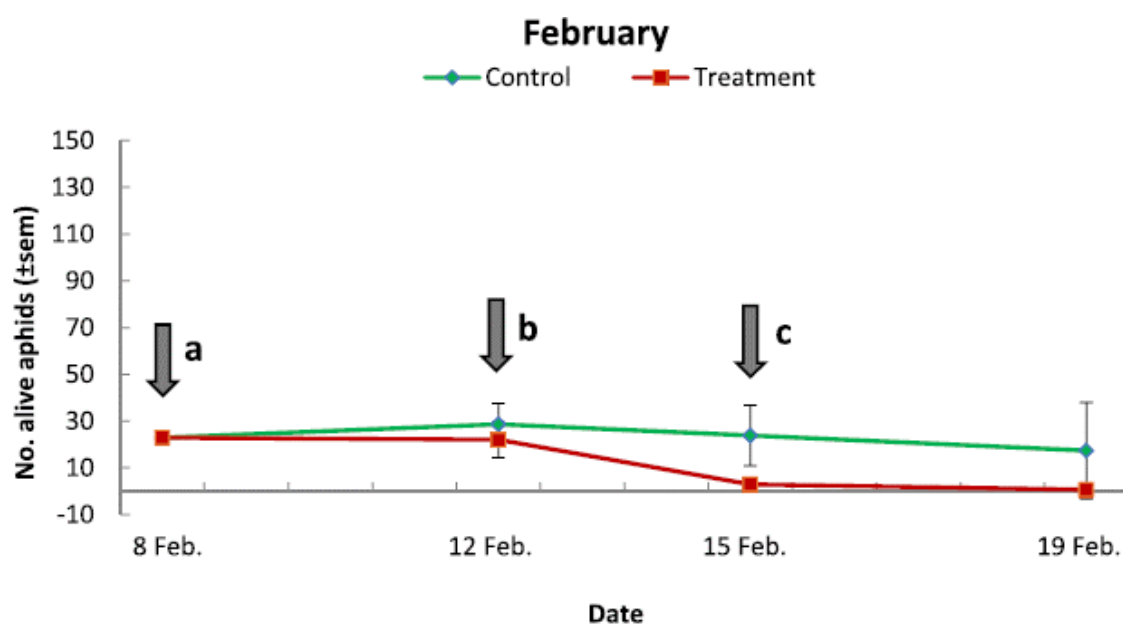
**Figura 22. Distribución de las poblaciones de partículas (intensity, %) y tamaño (size, nm) de la formulación 1:1:1 (lecitina de soja y aceite de girasol) de la nanoemulsión del producto mezcla al 1% y su control.**

Por todo lo anterior, se seleccionó la formulación 1:1:1 (lecitina de soja y aceite de girasol) para los experimentos de campo del año siguiente (2021), ya que tuvo un rendimiento equilibrado en cuanto a la reducción de las poblaciones de pulgones con menor fitotoxicidad para el cultivo además de presentar buenas propiedades fisicoquímicas.

El experimento de campo de 2021 se llevó a cabo en dos invernaderos de pimiento infestados con pulgones. Las poblaciones iniciales se mantuvieron más bajas (20-50 pulgones/planta) que el año anterior (28-200 pulgones/planta). Las mismas plantas se pulverizaron secuencialmente (cada 4 días) con lo siguiente: a) formulación del producto mezcla 1:1:1 (lecitina de soja y aceite de girasol) al 0,5% aplicado al aire (no directamente a las plantas para evitar fitotoxicidad), b) aceite de semilla de algodón al 3% en una dilución de agua y jabón potásico al 3% (febrero) o aceite de semilla de algodón al 1,5% en una dilución de agua y jabón potásico al 1,5% (abril) (directamente a las plantas) y c) formulación (Z)-jasmona 1:2 (Tween 80®) al 0,25% (directamente a las plantas). Los controles sin ingredientes activos fueron tratados de la misma manera.

En la Figura 23 se muestra la evolución de los pulgones. En febrero, durante todo el periodo de muestreos se observó una reducción de los pulgones en las plantas tratadas en comparación con los controles, aunque sin diferencias significativamente estadísticas, y en abril, no hubo efecto insecticida después del primer tratamiento, aunque si se observó cierto efecto después del segundo y tercer tratamiento, pero sin diferencias estadísticamente significativas.

Otro parámetro estudiado fue la tasa instantánea de crecimiento ( $r_i$ ). En febrero, las poblaciones de pulgones sufrieron una reducción significativa cuando las plantas fueron pulverizadas con el aceite de semilla de algodón (b): la prueba de Wilcoxon resultó altamente significativa ( $W = 64$ ;  $p = 0,0009^{***}$ ) y también el ANOVA ( $F = 48,8$ ;  $df = 1, 13$ ;  $p < 0,000009$ ). En abril, no hubo diferencias estadísticamente significativas, pero fue cercana al 5% ( $W = 49$ ;  $p = 0,083$ ; y  $F = 4,12$ ;  $df = 1, 13$ ;  $p = 0,0633$ ). Además, la pulverización con (Z)-jasmona (c) en febrero (aunque con variabilidad en los datos) también produjo mortalidad en pulgones ( $W = 7$ ;  $p = 0,0322^*$ ; y  $F = 5,28$ ;  $df = 1, 13$ ;  $p = 0,0422$ ).



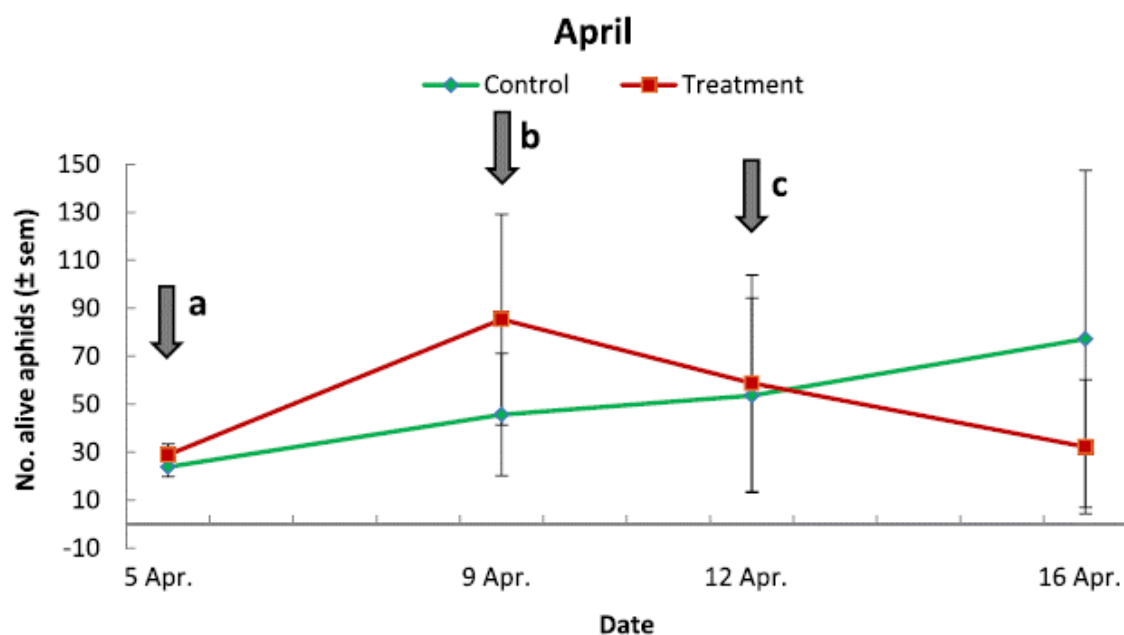


Figura 23. Experimento de campo 2021: Evolución de la dinámica poblacional de los pulgones sobre un cultivo de pimiento cv. Herminio. Las flechas indican los días de aplicación de los tratamientos: a) producto mezcla (formulación 1:1:1 con lecitina de soja y aceite de girasol) al 0,5%, b) aceite de semilla de algodón al 3% en dilución de agua con jabón potásico al 3% (febrero) o aceite de semilla de algodón al 1,5% en dilución de agua con jabón potásico al 1,5% (abril) y c) (Z)-jasmona (formulación 1:2 con Tween80®) al 0,25%.

En la Tabla 5 se presentan los datos sobre la mortalidad media de los pulgones a los 4 días de la aplicación de los tratamientos. En febrero, se produjo un efecto insecticida en todos los tratamientos, con valores de mortalidad superiores al 80% después de la pulverización con aceite de semilla de algodón al 3% o (Z)-jasmona al 0,25%. Sin embargo, en abril estos efectos fueron mucho menores, aunque el tratamiento con aceite de semillas de algodón al 1,5% presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a su control.

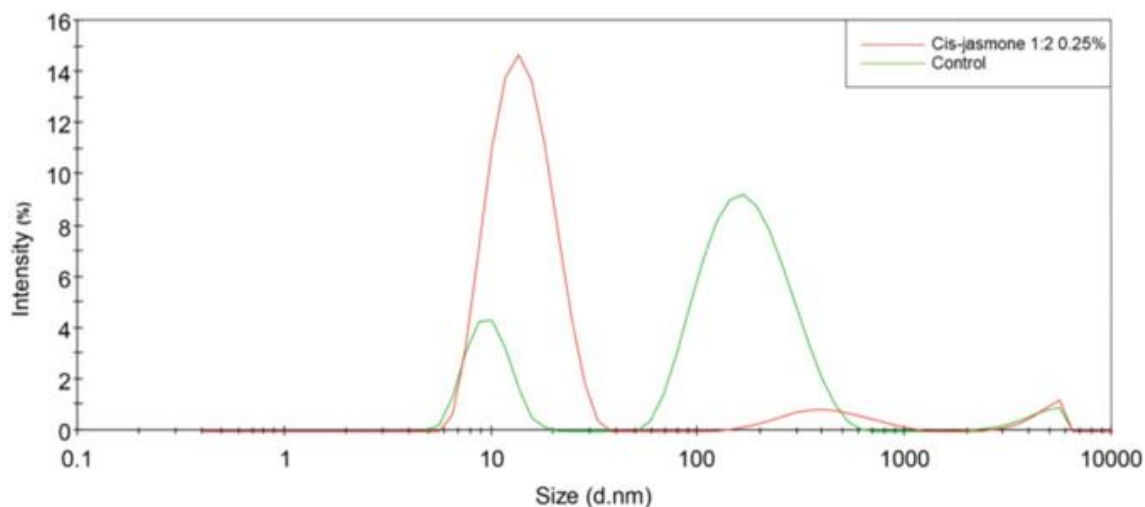
Tabla 5. Experimento de campo 2021: Mortalidad de *M. persicae* (%) (Media ± error estándar) a los 4 días de aplicación.

|                               | Febrero        |             | Abril       |          |
|-------------------------------|----------------|-------------|-------------|----------|
|                               | Tratamiento    | Control     | Tratamiento | Control  |
| Producto mezcla               | 30,3 ± 8,49    | 24,1 ± 6,54 | 0 ± 0       | 1 ± 0,63 |
| Aceite de semillas de algodón | 82,0 ± 5,40*** | 18,3 ± 2,69 | 20 ± 5,32** | 2 ± 1,97 |
| (Z)-jasmona                   | 83,3 ± 16,67*  | 9,7 ± 2,61  | 14 ± 12,29  | 1 ± 1,03 |

Prueba de Wilcoxon para comparar el tratamiento y el control. Valores para tratamientos estadísticamente significativos: W = 0; p = 0,000931; y W = 4; p = 0,002571; para el aceite de semilla de algodón en febrero y abril, respectivamente y W = 7; p = 0,02862 para (Z)-jasmona en febrero.

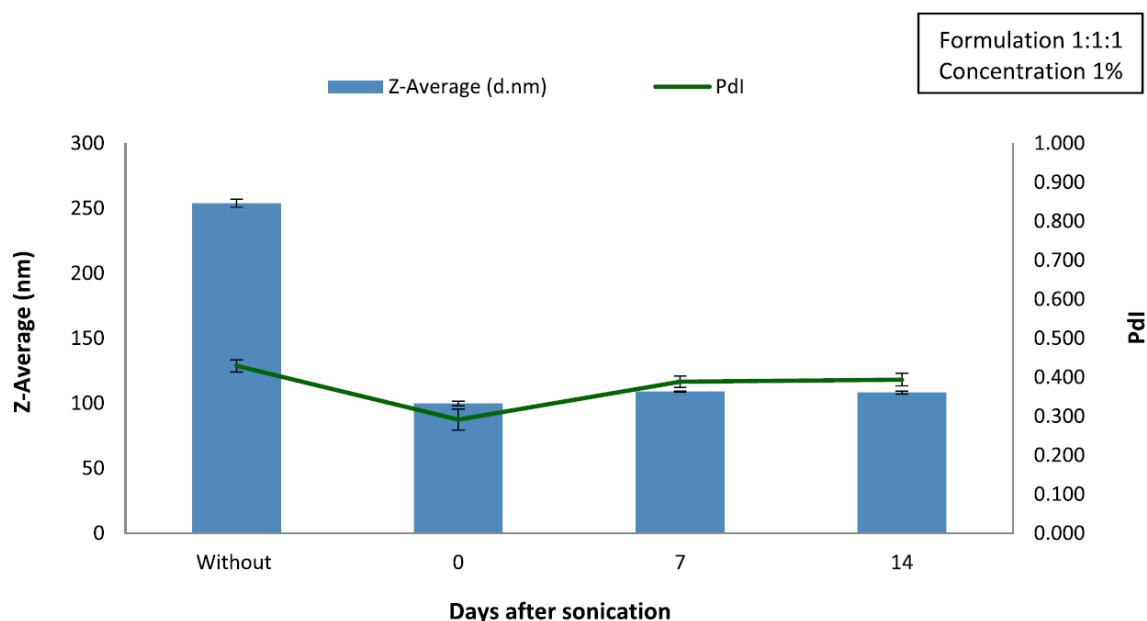
La caracterización de la nanoemulsión de (Z)-jasmona con Tween80® (1:2) como se puede apreciar en la Figura 24, presentó una población mayoritaria de 15 nm de tamaño

y un  $PdI = 0,289$ , lo que indica que el (Z)-jasmona hace buena emulsión con Tween80® en proporción 1:2.



**Figura 24. Distribución de las poblaciones de partículas (intensity, %) y tamaño (size, nm) de la nanoemulsión de (Z)-jasmona al 0,25% en la formulación 1:2 con Tween80® y su control.**

Para comparar el efecto de la aplicación de ultrasonidos sobre las nanoemulsiones y la variación que puedan sufrir las propiedades fisicoquímicas de las mismas con el paso del tiempo, se realizaron caracterizaciones de la nanoemulsión 1:1:1 del producto mezcla de bioactivos con lecitina de soja y aceite de girasol. Los resultados se muestran en la Figura 25, en ella se puede apreciar como la aplicación de ultrasonidos reduce el tamaño de partícula medio (Z average) de 252 nm a 100 nm en la formulación 1:1:1 del producto mezcla, el cual presentó una buena estabilidad durante al menos 14 días. Por lo tanto, para fabricar nanoemulsiones con tamaños de partícula pequeños, la aplicación de ultrasonidos ofrece una ventaja.



**Figura 25.** Promedio del tamaño de partícula (Z average, nm) e índice de polidispersidad (PdI) de nanoemulsiones del producto mezcla (formulación 1:1:1 con lecitina de soja y aceite de girasol) al 1% con y sin aplicación de ultrasonidos y almacenamiento durante siete y catorce días.

Con relación a lo anterior, también se quiso conocer la persistencia del efecto insecticida de las nanoemulsiones de bioactivos volátiles con el paso del tiempo. La Figura 26 muestra la tendencia del crecimiento poblacional de los pulgones (ninfas más adultos) trazada a escala lineal, a partir de los datos obtenidos de las colonias de *M. persicae* liberados en jaulas clip sobre las mismas plantas de pimiento, pero en diferentes momentos: el día 0 (el mismo día en que se trataron las plantas) o a los 1, 2 y 7 días después de la pulverización.

En la Figura 26, se puede observar que sulfoxaflor fue el tratamiento más efectivo para el control de poblaciones de pulgones, causando la muerte de todos los individuos de *M. persicae* desde el día de la aplicación hasta el final del ensayo, con una persistencia de al menos 14 días.

Considerando los resultados obtenidos el día de la aplicación (día 0), la pendiente de farnesol muestra un crecimiento poblacional más lento que en el control. Las poblaciones de pulgones en plantas de pimiento tratadas con farnesol alcanzan su máximo a los siete días después de la aplicación, con un promedio de 37 pulgones/planta, mientras que la población máxima alcanzada en los controles fue de 54 pulgones/planta ( $P = 0,034$ ;  $t \text{ ratio} = 3,092$ ;  $df = 693$ ), lo que indica que el farnesol tiene un efecto sobre las

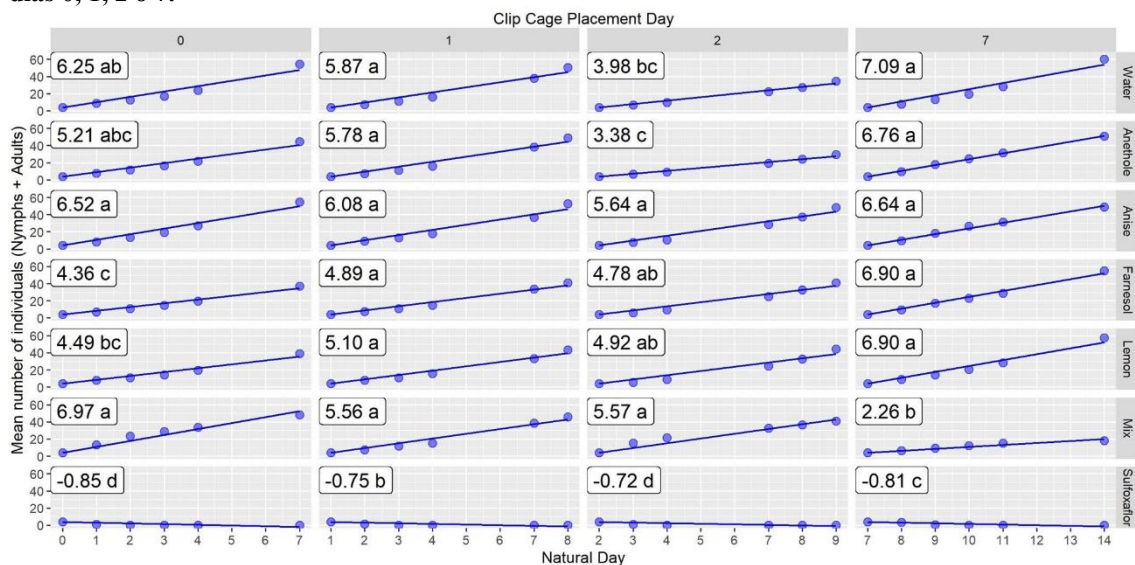
poblaciones de pulgón hasta el séptimo día. En el caso del (E)-anetol o del aceite destilado de limón, la pendiente de crecimiento de la población es también menor que la del control, pero sin diferencias significativas. Con el anís y la mezcla de bioactivos volátiles, los pulgones crecieron aún más que en el control.

Cuando se liberaron pulgones (en el día 1), no se encontraron diferencias para los tratamientos con bioactivos volátiles, siendo el crecimiento de la población de pulgones en las plantas tratadas similar al observado en los controles (41-53 pulgones/planta) a los ocho días después de la pulverización.

En el caso de los pulgones liberados dos días después de la aplicación de los tratamientos, las poblaciones crecieron más rápidamente en el anís y la mezcla de bioactivos (con un máximo de 48 pulgones/planta en anís,  $P = 0,002$ ;  $t \text{ ratio} = -3,953$ ;  $df = 693$  y 41 pulgones/planta en el producto mezcla,  $P = 0,003$ ;  $t \text{ ratio} = -3,791$ ;  $df = 693$ ) que en el tratamiento control (población máxima de 34 pulgones/planta) después de nueve días. El (E)-anetol fue el único tratamiento con un crecimiento poblacional más lento (29 pulgones/planta) que en el control, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Finalmente, se observó cierto efecto contra los pulgones liberados al séptimo día después de la aplicación del tratamiento en el caso de plantas tratadas con la mezcla de bioactivos volátiles, con una población máxima de 18 pulgones/planta después de 14 días en las plantas tratadas y 60 pulgones/planta en las plantas control ( $p < 0,001$ ;  $t \text{ ratio} = 7,347$ ;  $df = 693$ ). Esto podría indicar que la mezcla del producto comienza a hacer efecto sobre las poblaciones de *M. persicae* en pimiento a partir de los siete días posteriores a la aplicación, debido a una liberación controlada de los bioactivos durante ese tiempo.

**Figura 26.** Crecimiento poblacional de *Myzus persicae* (número medio de ninfas y adultos)<sup>a</sup> después de la pulverización de las plantas con nanoemulsiones<sup>b</sup> al 0,2 % de (E)-anetol, aceite esencial de anís, farnesol, aceite destilado de limón y el producto mezcla de bioactivos (farnesol, (E)-anetol, citral, (Z)-jasmóna y aceite de limón) en el día 0, seguida de la liberación de pulgones en jaulas de clip en los días 0, 1, 2 o 7.



<sup>a</sup> Los puntos representan la media ( $n = 20$ ) del número de individuos (ninfas más adultos) para cada día de muestreo. Las líneas se ajustan por regresión lineal, en función del tiempo, con un valor inicial establecido en 4 (correspondiente a las cuatro hembras colocadas en la jaula clip en la misma planta, cada día de colocación de la jaula clip). Los valores de las pendientes se indican en los recuadros, y las diferentes letras por columnas indican diferencias significativas entre los tratamientos (valor de  $p \leq 0,05$ ).

<sup>b</sup> Los compuestos bioactivos se aplicaron a una dosis del 0,2% con Tween80® (1:2) como nanoemulsión en agua. El producto mezcla (Mix) se aplicó a una dosis de 0,2% diluida en agua. Sulfoxafloor se aplicó a una dosis de 24 mg i.a./L diluido en agua. Se tomaron un mínimo de 20 registros para cada tratamiento.

Por último, con la intención de comprobar si los ésteres metílicos de ácidos grasos de coco tienen propiedades insecticidas, aparte de producir otros efectos sobre el pulgón como se verán en los siguientes apartados. Aquí conviene destacar que se ha evaluado la mortalidad de una nanoemulsión al 1% de esta sustancia y se ha demostrado que no tiene apenas propiedades insecticidas al aplicarse por contacto sobre *M. persicae* en condiciones de laboratorio con discos de hoja de pimienta en placas Petri, ya que se obtuvo una mortalidad del 3,4%, mientras que en el control con agua se obtuvo una mortalidad del 2,7% y en el insecticida de referencia, que en este caso fueron piretrinas, se obtuvo una mortalidad del 85,8%.

## 5.2. Efecto repelente.

Otro de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido demostrar las propiedades repelentes de las nanoemulsiones de bioactivos volátiles sobre *M. persicae*, más concretamente sobre las formas aladas de esta especie, ya que estos individuos son los

primeros que aterrizan sobre las plantas y los encargados de colonizar los cultivos, con el riesgo añadido de que puedan ser portadores de algún virus del que sean vector y lo transmitan propagando la enfermedad, es por ello por lo que la repelencia es un modo de acción interesante a la hora de evitar enfermedades transmitidas por vectores.

La Tabla 6 y la Figura 27 muestran los resultados del bioensayo de elección 24 h después de la liberación de individuos alados de *M. persicae* en las jaulas entomológicas con las plantas de pimiento tratadas con las nanoemulsiones (T) y plantas control tratadas sólo con agua (C). La media global del porcentaje de individuos que eligieron fue del 78,1%, lo que indica que la metodología utilizada para realizar este ensayo fue adecuada. El porcentaje de elección en todos los tratamientos fue siempre superior al 40%, por lo que ninguno de los tratamientos quedó excluido del análisis estadístico.

La mayoría de los tratamientos causaron repelencia (Tabla 6 y Figura 27). Los compuestos más repelentes, con diferencias muy significativas ( $p < 0,001$ ) según la prueba binomial bilateral exacta, fueron farnesol (T = 147 individuos; 37% vs C = 246 individuos; 63%), (E)-anetol (T = 195 individuos; 41% vs C = 282 individuos; 59%) y coco (T = 172 individuos; 42% vs C = 242 individuos; 58%). Las mezclas que dieron mejores resultados fueron farnesol + (E)-anetol + aceite destilado de limón (T = 184 individuos; 39% vs C = 290 individuos; 61%) y (E)-anetol + aceite destilado de limón + coco (T = 154 individuos; 41% vs C = 222 individuos; 59%), así como el tratamiento de mezcla de 5 productos (T = 175 individuos; 38% vs C = 288 individuos; 62%).

Las mezclas binarias de farnesol + (E)-anetol (T = 156 individuos; 42% vs C = 219 individuos; 58%), y farnesol + aceite destilado de limón (T = 177 individuos; 42% vs C = 245 individuos; 58%), la mezcla ternaria de farnesol + aceite destilado de limón + coco (T = 191 individuos; 44% vs C = 247 individuos; 56%) y la mezcla cuaternaria de farnesol + (E)-anetol + aceite destilado de limón + coco (T = 200 individuos; 43% vs C = 264 individuos; 57%) también mostraron un alto nivel significativo de repelencia ( $p < 0,01$ ). Las mezclas binarias sin farnesol mostraron menor repelencia (Figura 27). En los tratamientos con aceite destilado de limón solo, o las mezclas binarias de farnesol + coco y aceite destilado de limón + coco, las diferencias entre el número de pulgones encontrados en las plantas control y tratadas no fueron significativas, lo que indica que no tuvieron efectos repelentes ni atrayentes (Figura 27).

El índice de repelencia (IR) se muestra en la Tabla 6 expresado como porcentaje (%). El tratamiento con mayor IR fue el farnesol (IR = 40,24%), seguido del producto mezcla (IR = 39,24%) y la mezcla de farnesol + (E)-anetol + aceite destilado de limón (IR = 36,55%), mientras que el (E)-anetol y la mezcla de (E)-anetol + aceite destilado de limón + coco, mostraron un IR de alrededor del 31%. Y, por último, otro tratamiento con interesantes efectos repelentes pero con una IR ligeramente inferior fue el coco (IR = 28,93%).

En resumen, los tratamientos más repelentes han sido farnesol, coco y (E)-anetol, aplicados de manera individual, y la mezcla de farnesol con (E)-anetol solos o también con aceite destilado de limón, y la mezcla ternaria de (E)-anetol, coco y aceite destilado de limón. El aceite destilado de limón por sí solo no mostró actividad, pero mejoró las propiedades repelentes de las mezclas. La mezcla de productos (farnesol, citral, (E)-anetol, (Z)-jasmona y aceite destilado de limón), también mostró buenos resultados.

**Tabla 6. Distribución de los individuos e índice de repelencia (IR) después de 24 h de la liberación de alados de *Myzus persicae* en jaulas<sup>a</sup> con plantas de pimienta tratadas (T) y control tratado con agua (C).**

| Tratamientos <sup>b</sup>            | Nº pulgones |     |       |              | % Elección | % Sin elección | IR (%) <sup>c</sup> |
|--------------------------------------|-------------|-----|-------|--------------|------------|----------------|---------------------|
|                                      | C           | T   | Total | Sin elección |            |                |                     |
| Farnesol                             | 245         | 147 | 392   | 208          | 65,33      | 34,67          | 40,24               |
| (E)-anetol                           | 282         | 195 | 477   | 123          | 79,50      | 20,50          | 30,85               |
| Limon                                | 141         | 127 | 268   | 332          | 44,67      | 55,33          | 9,93                |
| Coco                                 | 242         | 172 | 414   | 186          | 69,00      | 31,00          | 28,93               |
| Farnesol + (E)-anetol                | 219         | 156 | 375   | 225          | 62,50      | 37,50          | 28,77               |
| Farnesol + limon                     | 245         | 177 | 422   | 178          | 70,33      | 29,67          | 27,76               |
| Farnesol + coco                      | 213         | 175 | 388   | 212          | 64,67      | 35,33          | 17,84               |
| (E)-anetol + limon                   | 249         | 201 | 450   | 150          | 75,00      | 25,00          | 19,28               |
| (E)-anetol + coco                    | 264         | 214 | 478   | 122          | 79,67      | 20,33          | 18,94               |
| Limon + coco                         | 255         | 253 | 508   | 92           | 84,67      | 15,33          | 0,78                |
| Farnesol + (E)-anetol + limon        | 290         | 184 | 474   | 126          | 79,00      | 21,00          | 36,55               |
| Farnesol + (E)-anetol + coco         | 260         | 211 | 471   | 129          | 78,50      | 21,50          | 18,85               |
| Farnesol + limon + coco              | 247         | 191 | 438   | 162          | 73,00      | 27,00          | 22,67               |
| (E)-anetol + limon + coco            | 222         | 154 | 376   | 224          | 62,67      | 37,33          | 30,63               |
| Farnesol + (E)-anetol + limon + coco | 264         | 200 | 464   | 136          | 77,33      | 22,67          | 24,24               |
| Producto mezcla <sup>d</sup>         | 288         | 175 | 463   | 137          | 77,17      | 22,83          | 39,24               |

<sup>a</sup> Se utilizaron 24 jaulas/tratamiento (n = 24), y se liberaron 25 pulgones alados/jaula. Es decir, un total de 600 pulgones/tratamiento.

<sup>b</sup> Nanoemulsiones O/W de bioactivos volátiles al 0,2% o 0,1% en mezclas de más de un producto, con Tween 80 (1:2 o 1:1:2, 1:1:1:2, 1:1:1:1:2 para las mezclas).

<sup>c</sup> Índice de repelencia (IR) =  $[1 - (T/C)] \times 100$ . Número de individuos alados de *M. persicae* en plantas control (C) o plantas tratadas (T) 24 h después de la liberación.

<sup>d</sup> El producto mezcla es una combinación de (Z)-jasmona, citral, aceite destilado de limón, farnesol y (E)-anetol formulada por un método desconocido en cantidades iguales, a una dosis del 0,2% del producto bioactivo total.

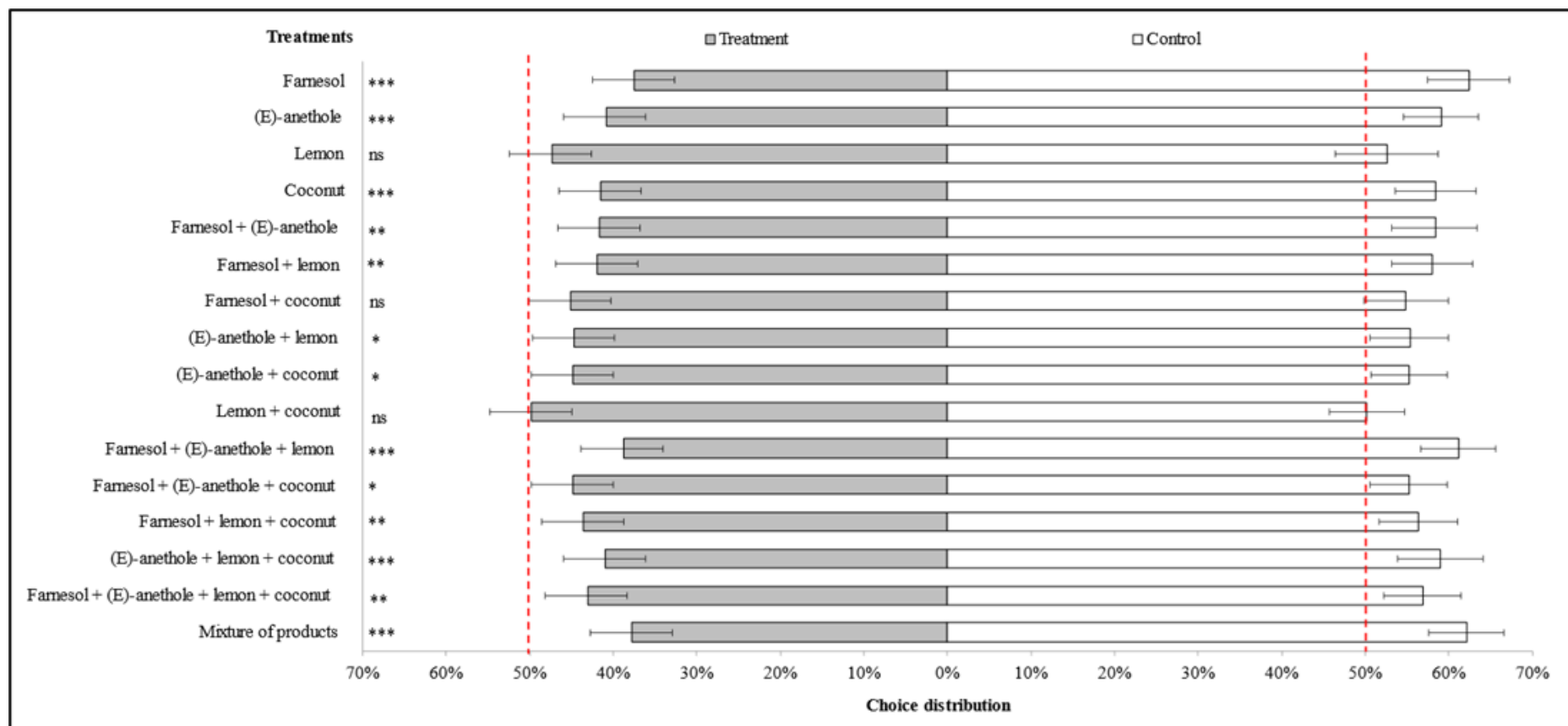


Figura 27. Distribución de los individuos que eligen alguna opción (expresado en porcentaje, %), 24 horas después de la liberación de individuos alados de *Myzus persicae* en jaulas entomológicas ( $n = 24$ ) con plantas de pimienta tratadas y control. Los bioactivos volátiles se formularon como nanoemulsiones al 0,2% o al 0,1% en mezclas de más de un producto, con Tween 80. Se indican los niveles de significación estadística según una prueba binomial bilateral exacta (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ns  $p > 0,05$ ). Las barras de error corresponden a los intervalos de confianza al 95% de Clopper-Pearson.

Por otro lado, una forma adicional de evaluar la repelencia o disuasión y el posible efecto de las nanoemulsiones de bioactivos volátiles sobre la reproducción de los individuos alados de *M. persicae*, es comparar y analizar la fecundidad. En la Tabla 7 se muestra el número medio de ninfas por hembra 24 h después de la liberación de individuos alados de *M. persicae* en jaulas entomológicas con plantas de pimienta (control y tratadas). Los tratamientos con el menor valor medio fueron el aceite destilado de limón (0,40 ninfas/hembra), seguido del (E)-anetol + aceite destilado de limón + coco (0,44 ninfas/hembra), pero las diferencias con los correspondientes controles no fueron significativas en ninguno de los casos. Por el contrario, el (E)-anetol solo destaca por ser el tratamiento en el que los pulgones se reprodujeron en mayor número (1,16 ninfas/hembra y día), seguido de la mezcla de aceite destilado de limón + coco (0,99 ninfas/hembra). Solo se observaron diferencias significativas para la mezcla con farnesol + aceite destilado de limón + coco ( $p = 0,031$ ), siendo el número medio de ninfas en las plantas tratadas (0,65 ninfas/hembra y día) menor que las encontradas en las plantas control (0,97 ninfas/hembra y día).

**Tabla 7. Reproducción después de 24 h de la liberación de individuos alados de *M. persicae* en jaulas entomológicas<sup>a</sup> con plantas de pimienta tratadas (T) y control (C).**

| Tratamientos <sup>b</sup>            | Nº medio de ninfas/adulto y día <sup>c</sup> |             | t-test p-valor <sup>d</sup> |         |
|--------------------------------------|----------------------------------------------|-------------|-----------------------------|---------|
|                                      | T                                            | C           |                             |         |
| Farnesol                             | 0,54 ± 0,10                                  | 0,68 ± 0,09 | 1,841                       | 0,079   |
| (E)-anetol                           | 1,16 ± 0,15                                  | 0,99 ± 0,13 | -1,700                      | 0,103   |
| Limon                                | 0,40 ± 0,07                                  | 0,34 ± 0,09 | -0,898                      | 0,379   |
| Coco                                 | 0,55 ± 0,06                                  | 0,54 ± 0,08 | -0,175                      | 0,863   |
| Farnesol + (E)-anetol                | 0,75 ± 0,12                                  | 0,72 ± 0,09 | -0,290                      | 0,774   |
| Farnesol + limon                     | 0,73 ± 0,07                                  | 0,79 ± 0,07 | 0,468                       | 0,645   |
| Farnesol + coco                      | 0,76 ± 0,15                                  | 0,70 ± 0,11 | -0,571                      | 0,574   |
| (E)-anetol + limon                   | 0,66 ± 0,07                                  | 0,78 ± 0,08 | 1,235                       | 0,229   |
| (E)-anetol + coco                    | 0,89 ± 0,09                                  | 0,78 ± 0,08 | -0,941                      | 0,356   |
| Limon + coco                         | 0,99 ± 0,12                                  | 0,89 ± 0,11 | -0,817                      | 0,422   |
| Farnesol + (E)-anetol + limon        | 0,60 ± 0,09                                  | 0,67 ± 0,07 | 0,901                       | 0,377   |
| Farnesol + (E)-anetol + coco         | 0,58 ± 0,07                                  | 0,57 ± 0,06 | -0,266                      | 0,792   |
| Farnesol + limon + coco              | 0,65 ± 0,10                                  | 0,97 ± 0,13 | 2,301                       | 0,031 * |
| (E)-anetol + limon + coco            | 0,44 ± 0,10                                  | 0,41 ± 0,05 | -0,266                      | 0,793   |
| Farnesol + (E)-anetol + limon + coco | 0,69 ± 0,11                                  | 0,66 ± 0,07 | -0,424                      | 0,676   |
| Producto mezcla <sup>e</sup>         | 0,60 ± 0,07                                  | 0,52 ± 0,06 | -1,095                      | 0,285   |

<sup>a</sup> Se utilizaron 24 jaulas/tratamiento ( $n = 24$ ), y se liberaron 25 pulgones alados/jaula. Es decir, un total de 600 pulgones/tratamiento.

<sup>b</sup> Nanoemulsiones O/W de bioactivos volátiles al 0,2% o 0,1% en mezclas de más de un producto, con Tween 80 (1:2 o 1:1:2, 1:1:1:2, 1:1:1:1:2 para las mezclas).

<sup>c</sup> Media ± error estándar del número medio de ninfas por adulto y día.

<sup>d</sup> Los asteriscos indican diferencias significativas (valor de  $p \leq 0,05$ ) entre plantas tratadas (T) y plantas control (C). Se utilizó la prueba t para muestras pareadas para la comparación de medias entre T y C para cada tratamiento.

<sup>e</sup> El producto mezcla es una combinación de (Z)-jasmona, citral, aceite destilado de limón, farnesol y (E)-anetol formulada por un método desconocido en cantidades iguales, a una dosis del 0,2% del producto bioactivo total.

Siguiendo con la repelencia de pulgones alados, recientemente se han realizado otros trabajos en los que, por un lado, se ha probado el efecto repelente de ésteres metílicos de ácidos grasos de coco solo o combinado con aceite destilado de limón y fibroína de seda en la formulación, con la intención de comprobar si se mejora el efecto repelente y las propiedades de fisicoquímicas de la nanoemulsión del compuesto derivado de ácido graso de coco, dado que se trata de una sustancia prometedora por los resultados obtenidos previamente. La Tabla 8 y la Figura 28 muestran los resultados del bioensayo de elección y el índice de repelencia 24 h después de la liberación de individuos alados de *M. persicae* en las jaulas entomológicas.

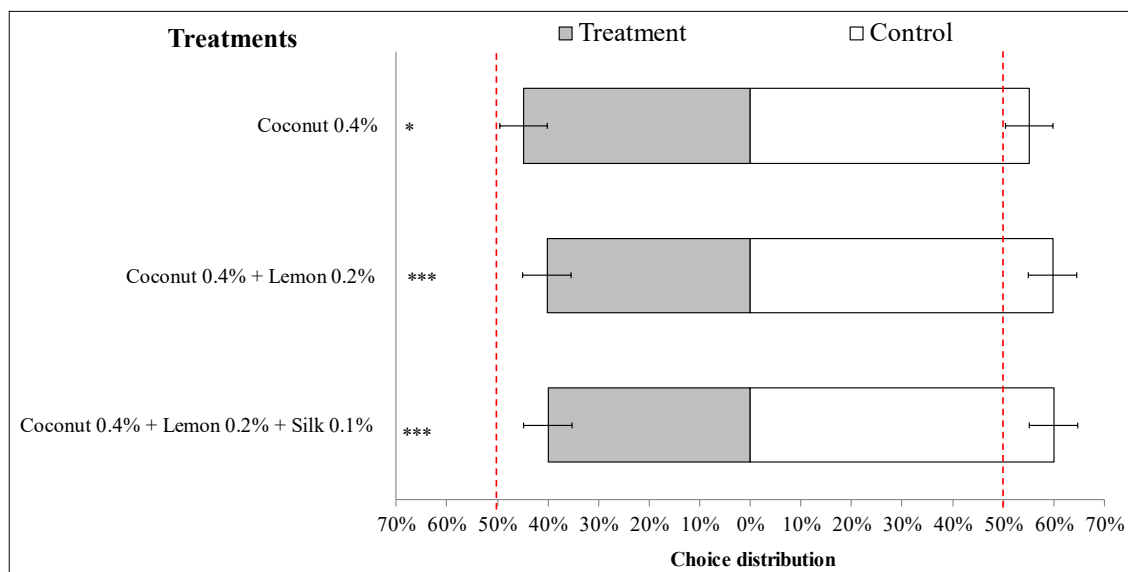
**Tabla 8. Distribución de los individuos e índice de repelencia (IR) después de 24 h de la liberación de alados de *Myzus persicae* en jaulas<sup>a</sup> con plantas de pimienta tratadas (T) y control tratado con agua (C).**

| Tratamientos <sup>b</sup> | Nº pulgones |     |            |              | % Elección | % Sin elección | IR (%) <sup>c</sup> |
|---------------------------|-------------|-----|------------|--------------|------------|----------------|---------------------|
|                           | C           | T   | Elecciones | Sin elección |            |                |                     |
| Coco                      | 243         | 197 | 440        | 160          | 73,33      | 26,67          | 18,93               |
| Coco + limón              | 260         | 175 | 435        | 165          | 72,50      | 27,50          | 32,69               |
| Coco + limón + seda       | 318         | 212 | 530        | 70           | 88,33      | 11,67          | 33,34               |

<sup>a</sup> Se utilizaron 24 jaulas/tratamiento (n = 24), y se liberaron 25 pulgones alados/jaula. Es decir, un total de 600 pulgones/tratamiento.

<sup>b</sup> Nanoemulsiones de ésteres metílicos de ácidos grasos de coco (coco 0,4%), aceite destilado de limón (limón 0,2%) y fibroína de seda (seda 0,1%) en agua.

<sup>c</sup> Índice de repelencia (IR) =  $[1 - (T/C)] \times 100$ . Número de individuos alados de *M. persicae* en plantas control (C) o plantas tratadas (T) 24 h después de la liberación.



**Figura 28.** Distribución de los individuos que eligen alguna opción (expresado en porcentaje, %), 24 horas después de la liberación de individuos alados de *Myzus persicae* en jaulas entomológicas (n = 24) con plantas de pimienta tratadas y control. Los tratamientos se formularon como nanoemulsiones en agua al 0,4% en el caso del coco, al 0,2% en el caso del limón y al 0,1% de fibroína de seda. Se indican los niveles de significación estadística según una prueba binomial bilateral exacta (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; ns p > 0,05). Las barras de error corresponden a los intervalos de confianza al 95% de Clopper-Pearson.

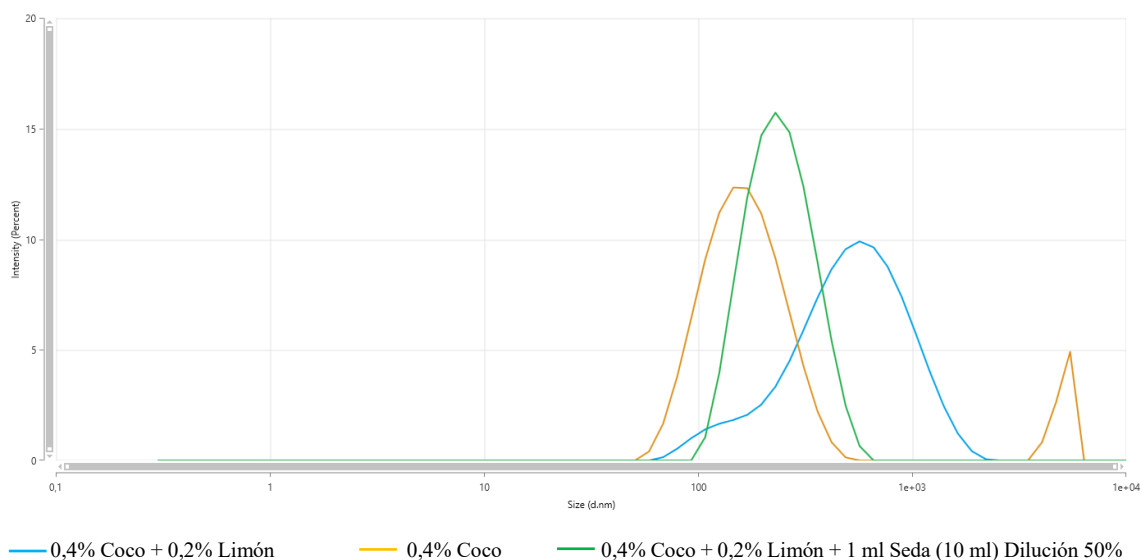
Como se puede apreciar en la figura (Figura 28), los compuestos más activos, con diferencias muy significativas ( $p < 0,001$ ) según la prueba binomial bilateral exacta del análisis estadístico, han sido la mezcla de coco + limón que ha presentado un índice de repelencia de 32,69% (Tabla 8) y la mezcla de coco + limón + seda (IR = 33,34%). En cambio, los esteres metílicos de ácidos grasos por si solo mostró un nivel de significación menor ( $p < 0,05$ ) y por consiguiente un índice de repelencia más bajo (IR = 18,93%).

Además, se caracterizaron las 3 nanoemulsiones para conocer el tamaño de partícula y la estabilidad de la mezcla, los resultados se muestran en la Tabla 9 y en la Figura 29 se representa la distribución del tamaño de partícula de las nanoemulsiones.

**Tabla 9.** Caracterización de nanoemulsiones de ésteres metílicos de ácidos grasos de coco solo o en combinación con aceite destilado de limón y fibroína de seda.

| Productos <sup>a</sup> | Tamaño de partícula medio (Z average, nm) | PdI   | Distribución de las poblaciones de partículas (Peaks, %) | Tamaño de partícula (nm) | Potencial Z (mV) |
|------------------------|-------------------------------------------|-------|----------------------------------------------------------|--------------------------|------------------|
| Coco                   | 197,2                                     | 0,469 | 92<br>8                                                  | 174<br>5087              | -12,21           |
| Coco + limón           | 416,4                                     | 0,279 | 100                                                      | 589                      | -28,36           |
| Coco + limón + seda    | 229,3                                     | 0,139 | 100                                                      | 252                      | -19,74           |

<sup>a</sup> Nanoemulsiones de ésteres metílicos de ácidos grasos de coco (coco 0,4%), aceite destilado de limón (limón 0,2%) y fibroína de seda (seda 0,1%) en agua.



**Figura 29. Distribución de las poblaciones de partículas (intensity, %) y tamaño (size, nm) de las nanoemulsiones de ésteres metílicos de coco solo al 0,4% o en combinación con aceite destilado de limón (1:0,5) y fibroina de seda (1:0,5:0,25).**

Se ha encontrado que la nanoemulsión de ésteres metílicos de ácidos grasos de coco al 0,4% en agua presenta 2 poblaciones de partículas, una mayoritaria (92% de las partículas) de 174 nm y un 8% de las partículas presentan un tamaño de aproximadamente 5100 nm, el índice de polidispersidad resultó ser elevado ( $PdI = 0,469$ ) y la estabilidad tampoco fue muy buena (-12,81 mV de potencial Z) lo que indica que el formulado no tiene buenas propiedades físico-químicas, en cambio al adicionar un 0,2% de aceite esencial de limón se consigue una única población de partículas de 416,4 nm de tamaño medio, se reduce el índice de polidispersidad a un valor de 0,279 y se mejora la estabilidad de la formulación (-28,36 mV de potencial Z), cuando además se añade un 0,1% de fibroina de seda a la mezcla, se aprecia como este elemento tiene la capacidad de reducir el tamaño de partículas de la formulación encontrándose una única población de partículas de 229,3 nm de tamaño medio, se reduce también el índice de polidispersidad ( $PdI = 0,139$ ) y el valor de potencial Z (-19,74 mV) es relativamente bueno, lo que indica que el aceite esencial de limón junto a la fibroina de seda mejoran las propiedades físico-químicas y el efecto repelente de las nanoemulsiones de ésteres metílicos de ácidos grasos de coco.

Por otro lado, en la búsqueda de alternativas para sustituir los surfactantes sintéticos por aceites de origen vegetal que cumplan la misma función, se ha probado el efecto repelente de dos nanoemulsiones de aceite en agua (O/W) siendo el aceite esencial

de anís al 0,25% el ingrediente en común de ambas formulaciones y empleando para las mezclas en proporción 1:1 el aceite de cártamo en un caso y el aceite de lino en otro caso. En la Tabla 10 y en la Figura 30 se muestran los resultados del bioensayo de elección y el índice de repelencia 24 h después de la liberación de individuos alados de *M. persicae* en las jaulas entomológicas.

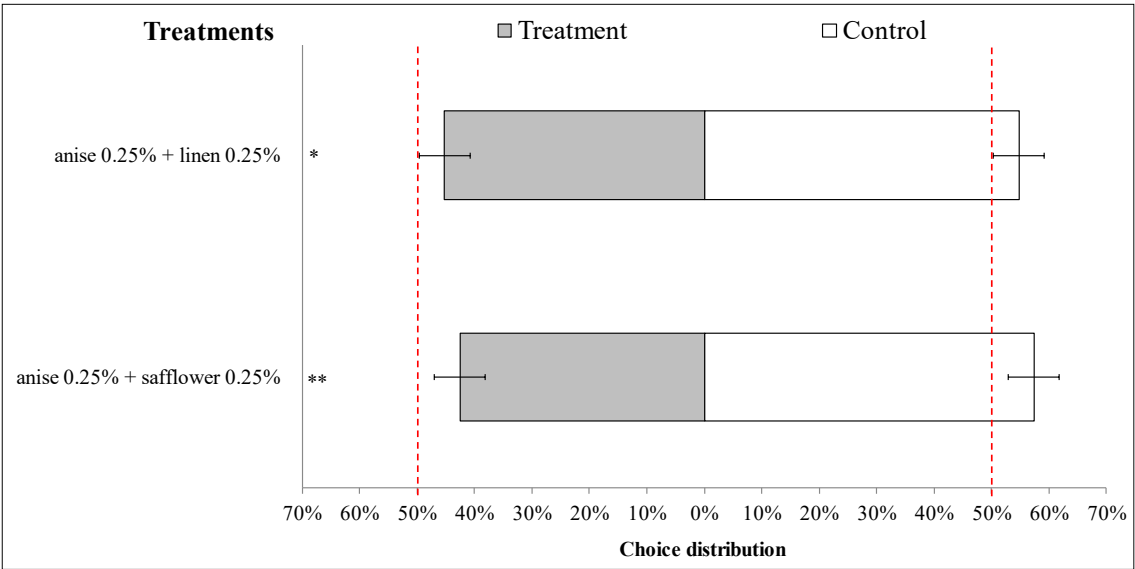
**Tabla 10. Distribución de los individuos e índice de repelencia (IR) después de 24 h de la liberación de alados de *Myzus persicae* en jaulas<sup>a</sup> con plantas de pimiento tratadas (T) y control tratado con agua (C).**

| Tratamientos <sup>b</sup> | N° pulgones |     | % Elección | % Sin elección | IR (%) <sup>c</sup> |
|---------------------------|-------------|-----|------------|----------------|---------------------|
|                           | C           | T   | Elecciones | Sin elección   |                     |
| Anís + lino               | 276         | 228 | 504        | 96             | 84,00               |
| Anís + cártamo            | 259         | 192 | 451        | 149            | 75,17               |

<sup>a</sup> Se utilizaron 24 jaulas/tratamiento (n = 24), y se liberaron 25 pulgones alados/jaula. Es decir, un total de 600 pulgones/tratamiento.

<sup>b</sup> Nanoemulsiones de aceite en agua (O/W) al 0,25% de aceite esencial de anís con aceite de lino o aceite de cártamo en proporción 1:1.

<sup>c</sup> Índice de repelencia (IR) =  $[1 - (T/C)] \times 100$ . Número de individuos alados de *M. persicae* en plantas control (C) o plantas tratadas (T) 24 h después de la liberación.



**Figura 30. Distribución de las elecciones (expresado en porcentaje, %), 24 horas después de la liberación de individuos alados de *Myzus persicae* en jaulas entomológicas (n = 24) con plantas de pimiento tratadas y control. Los tratamientos se formularon como nanoemulsiones de aceite en agua (O/W) al 0,25% de aceite esencial de anís con aceite de lino o aceite de cártamo en proporción 1:1. Se indican los niveles de significación estadística según una prueba binomial bilateral exacta (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; ns p > 0,05). Las barras de error corresponden a los intervalos de confianza al 95% de Clopper-Pearson.**

Se puede ver (Tabla 10 y Figura 30) como la mezcla de anís y cártamo presenta un efecto repelente mayor, tanto por el nivel de significación (p < 0,01) de la prueba

binomial bilateral exacta del análisis estadístico como por el índice de repelencia (IR = 25,87%) que para el caso del anís y lino ( $p < 0,05$  e IR = 17,39).

Los resultados de la caracterización de las nanoemulsiones (tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial Z), tanto de los ingredientes de forma individual como las mezclas empleadas en el ensayo, se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11. Caracterización de nanoemulsiones de mezcla de productos volátiles de plantas.**

| Productos <sup>a</sup> | Tamaño de partícula medio (Z average, nm) | PdI   | Distribución de las poblaciones de partículas (Peaks, %) | Tamaño de partícula (nm) | Potencial Z (mV) |
|------------------------|-------------------------------------------|-------|----------------------------------------------------------|--------------------------|------------------|
| Anís                   | 1038                                      | 0,222 | 100                                                      | 1357                     | -6,25            |
| Lino                   | 215                                       | 0,391 | 95<br>5                                                  | 287<br>4635              | -35,62           |
| Anís + lino            | 324                                       | 0,475 | 100                                                      | 818                      | -22,48           |
| Cártamo                | 289                                       | 0,421 | 98<br>2                                                  | 432<br>4844              | -2,451           |
| Anís + cártamo         | 330                                       | 0,479 | 52<br>48                                                 | 227<br>1695              | -42,39           |

<sup>a</sup> Nanoemulsiones de aceite en agua (O/W) al 0,25% de cada aceite (esencial o vegetal) en proporción 1:1 en el caso de las mezclas.

De la tabla anterior (Tabla 11) podemos observar que al emplear los aceites vegetales (lino o cártamo) en la formulación de las nanoemulsiones de aceite esencial de anís, se mejora la estabilidad de las mezclas (-22,48 mV potencial Z en el caso de anís + lino y -42,39 mV potencial Z en el caso de anís + cártamo), aunque si bien es cierto el índice de polidispersidad es algo más elevado en ambas mezclas que en el caso del anís por si solo (PdI = 0,222), pero se obtienen tamaños de partícula más interesantes cuando empleamos el aceite esencial de anís en combinación con los aceites vegetales de lino (818 nm) o cártamo (52% de partículas de 227 nm y 48% de partículas de 1695 nm).

### 5.3. Efecto antialimentario.

Por último, se ha realizado un estudio sobre la incidencia de las nanoemulsiones de bioactivos volátiles en el comportamiento alimentario de los pulgones, mediante la técnica de Gráficos de Penetración Eléctrica (EPG).

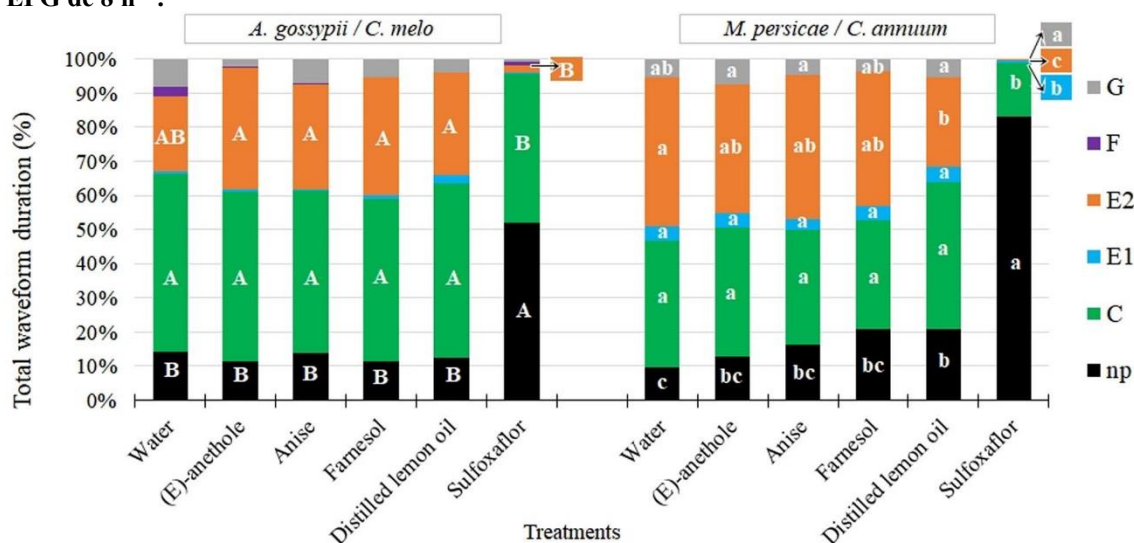
En la Figura 31 se indica el tiempo total en cada actividad (np: no prueba, sin contacto del estilete con el tejido vegetal; C: estilete en el espacio intercelular; E1: salivación al comienzo de la fase de floema; E2: ingestión pasiva de savia del floema; F: dificultades mecánicas del estilete en su ruta y G: ingestión activa de savia del xilema),

expresado en porcentaje de las 8 h de registro de EPG. Con respecto a *A. gossypii*, solo obtuvimos diferencias significativas en el comportamiento de prueba y alimentación de los pulgones alimentados con plantas de melón tratadas con sulfoxaflor en comparación con los alimentados de plantas control o con plantas de melón tratadas con las nanoemulsiones de bioactivos volátiles al 0,2% de concentración, sin encontrar efectos significativos de las nanoemulsiones ensayadas en comparación con las plantas control. Los individuos de *A. gossypii* colocados en plantas de melón tratadas con sulfoxaflor pasaron largos períodos de tiempo sin actividad ( $np = 52\%$  en plantas tratadas con sulfoxaflor frente a un  $np = 14\%$  en plantas control;  $p < 0,001$ ;  $H = 32,446$ ;  $df = 5$ ) y breves períodos de tiempo en las actividades del floema ( $E1 = 0,2\%$  frente a  $0,6\%$  en las plantas control,  $p = 0,007$ ;  $H = 16,055$ ;  $df = 5$  y  $E2 = 2,3\%$  frente a  $22\%$  en plantas control,  $p = 0,003$ ;  $H = 18,079$ ;  $df = 5$ ), ver la Figura 31. En el caso de *A. gossypii* en melón, se observaron duraciones totales medias de E2 después del tratamiento con bioactivos volátiles (Figura 31) más prolongadas que en el control. Por esta razón, sería interesante estudiar en investigaciones futuras, los efectos estimulantes, sobre todo con especial interés en encontrar un posible efecto tóxico letal después de una ingesta prolongada de bioactivos volátiles.

En la Figura 31 se puede observar un claro efecto del sulfoxaflor sobre el comportamiento alimentario de *M. persicae* en las plantas de pimiento. Mayor tiempo sin actividad ( $np = 83\%$  en plantas tratadas con sulfoxaflor frente a  $np = 10\%$  en plantas control;  $p < 0,001$ ;  $H = 62,005$ ;  $df = 5$ ) y menor actividad intercelular del estilete ( $C = 16\%$  frente a  $37\%$  en plantas control;  $p < 0,001$ ;  $F = 10,031$ ;  $df = 5$ ; 125) y menor actividad en el floema ( $E1 = 0,6\%$  frente a  $4\%$  en las plantas control,  $p < 0,001$ ;  $F = 9,350$ ;  $df = 5$ ; 125 y  $E2 = 0,5\%$  frente a  $44\%$  en plantas control,  $p < 0,001$ ;  $H = 48,543$ ;  $df = 5$ ).

Además, en la Figura 31 se pueden observar algunos efectos del aceite destilado de limón sobre el comportamiento de prueba de *M. persicae* en plantas de pimiento. Concretamente, para los individuos que se alimentan de plantas de pimiento tratadas con aceite destilado de limón, los tiempos sin actividad fueron mayores (Figura 31,  $np = 21\%$ ,  $p < 0,001$ ;  $H = 62,005$ ;  $df = 5$ ) y la ingestión de floema fue menor (Figura 31,  $E2 = 26\%$ ,  $p < 0,001$ ;  $H = 48,543$ ;  $df = 5$ ) que en los que se alimentan de plantas control.

**Figura 31. Tiempo total en cada actividad (np, C, E1, E2, F y G)<sup>a,b</sup> como porcentaje del registro de EPG de 8 h<sup>c,d</sup>.**



<sup>a</sup> Los compuestos bioactivos se aplicaron a una dosis del 0,2% con Tween80® (1:2) como nanoemulsión de agua (control). Sulfoxaflor se aplicó a una dosis de 24 mg i.a./L diluido en agua.

<sup>b</sup> np = Sin prueba; C = estilete entre la epidermis y el mesófilo; E1 = salivación en el floema; E2 = ingestión pasiva de savia del floema; F = dificultades mecánicas del estilete y G = ingestión activa de savia del xilema.

<sup>c</sup> Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas (p valor  $\leq 0,05$ ) utilizando la comparación de medias de la prueba de Tukey en ANOVA o la prueba de Dunn en Kruskal-Wallis entre los tratamientos para cada forma de onda en el caso de *A. gossypii* en melón, ya que el análisis estadístico se realizó por separado para cada especie de pulgón en su planta hospedante. La ausencia de letras indica que no ha habido diferencias significativas en el análisis estadístico.

<sup>d</sup> Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (p valor  $\leq 0,05$ ) utilizando la comparación de medias de la prueba de Tukey en ANOVA o la prueba de Dunn en Kruskal-Wallis entre tratamientos para cada forma de onda en el caso de *M. persicae* en pimiento, ya que el análisis estadístico se realizó por separado para cada especie de pulgón en su planta hospedante.

En cuanto a la duración total de las variables EPG analizadas, para *A. gossypii* en melón, solo se encontraron diferencias significativas en las plantas tratadas con sulfoxaflor con la misma tendencia que en los resultados descritos anteriormente (Tabla 12, Figuras 32, 33 y Anejo 2).

En el caso de *M. persicae* en pimiento, además de las diferencias significativas observadas en las plantas tratadas con sulfoxaflor, también observamos algunas diferencias significativas en el comportamiento de prueba de los pulgones que se alimentaron de plantas tratadas con farnesol o aceite destilado de limón en comparación con los controles. Los individuos de *M. persicae* que se alimentaron de plantas tratadas con farnesol mostraron una duración media sin actividad ligeramente mayor en comparación con los que se alimentaron de plantas control (Tabla 12, duración media de np).

Por otro lado, los individuos de *M. persicae* alimentados con plantas de pimiento tratadas con aceite destilado de limón mostraron un mayor tiempo sin actividad ( $np = 100,53$  min) que los insectos alimentados en plantas control ( $np = 47,05$  min) ( $p < 0,001$ ;  $H = 62,005$ ;  $df = 5$ ). Para esta variable ( $np$ ) no se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos en las plantas tratadas con aceite destilado de limón y en las plantas tratadas con los otros bioactivos (Tabla 12 y Figura 32). La duración total de la ingestión de floema (E2) fue significativamente menor para los individuos de *M. persicae* alimentados con plantas tratadas con aceite destilado de limón (Tabla 12, tiempo total de E2, y Figura 33).

También se obtuvieron algunas diferencias con el aceite destilado de limón para algunas variables de EPG relacionadas con la actividad de ingestión en el xilema (G). La proporción de individuos de *M. persicae* que alcanzaron los vasos del xilema fue mayor en los pulgones sobre las plantas de pimiento tratadas con aceite destilado de limón (Tabla 12, columnas de PPW en la variable G) que para los otros tratamientos. Además, tanto el número de veces que los pulgones alcanzaron el xilema como el porcentaje del tiempo de prueba dedicado a la ingestión del xilema fueron mayores en las plantas tratadas con aceite destilado de limón que en las plantas control (Tabla 12, número de G y porcentaje de prueba en G).

Por último, algunas variables EPG secuenciales también fueron alteradas por algunos de los tratamientos. Los individuos de *M. persicae* que se alimentaron de las plantas de pimiento tratadas con sulfoxaflor y con aceite destilado de limón tardaron más tiempo en realizar una ingestión prolongada de floema ( $t E2 > 10$  min) que en las plantas control (Tabla 12, variables EPG secuenciales).

No se encontraron diferencias relevantes al comparar los resultados obtenidos con las otras nanoemulsiones ensayadas. Los resultados del conjunto de variables (incluidas las que no muestran diferencias significativas) se presentan en los Anejos 1-5.

Tabla 12. Variables EPG no secuenciales y secuenciales con efectos estadísticamente significativos sobre el comportamiento alimentario de *M. persicae* sobre pimiento después de la pulverización de los tratamientos.

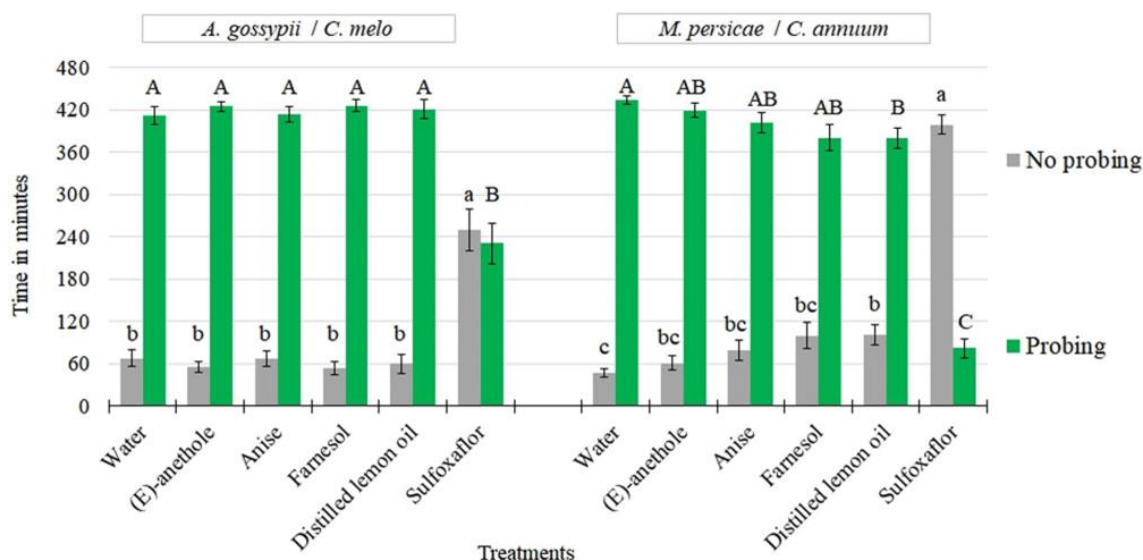
|                                                        |        |    |         |       | Tratamientos <sup>a</sup> |            |                   |          |                           |             |                   |       |                  |       |                  |
|--------------------------------------------------------|--------|----|---------|-------|---------------------------|------------|-------------------|----------|---------------------------|-------------|-------------------|-------|------------------|-------|------------------|
|                                                        |        |    |         |       | Agua                      | (E)-anetol | Anís              | Farnesol | Aceite destilado de limón | Sulfoxaflor |                   |       |                  |       |                  |
| Variables EPG no secuenciales <sup>b</sup>             | H      | gl | p-valor | PPW   | MEAN ± SE <sup>c</sup>    | PPW        | MEAN ± SE         | PPW      | MEAN ± SE                 | PPW         | MEAN ± SE         | PPW   | MEAN ± SE        | PPW   | MEAN ± SE        |
| Duración total (min) de np                             | 62,005 | 5  | 0,000   | 21/21 | 47,05 ± 5,76 c            | 22/22      | 61,00 ± 9,91 bc   | 21/21    | 78,75 ± 13,94 bc          | 22/22       | 99,68 ± 19,07 bc  | 22/22 | 100,53 ± 14,73 b | 23/23 | 398,36 ± 13,49 a |
| Duración media (min) de np                             | 60,674 | 5  | 0,000   | 21/21 | 2,25 ± 0,24 c             | 22/22      | 2,72 ± 0,34 bc    | 21/21    | 3,11 ± 0,36 bc            | 22/22       | 3,76 ± 0,57 b     | 22/22 | 4,98 ± 1,42 bc   | 23/23 | 50,89 ± 9,63 a   |
| Duración total (min) de prueba                         | 62,005 | 5  | 0,000   | 21/21 | 432,95 ± 5,76 a           | 22/22      | 419,00 ± 9,91 ab  | 21/21    | 401,25 ± 13,94 ab         | 22/22       | 380,32 ± 19,07 ab | 22/22 | 379,47 ± 14,73 b | 23/23 | 81,64 ± 13,49 c  |
| Duración total (min) de E2                             | 48,543 | 5  | 0,000   | 20/21 | 210,39 ± 27,34 a          | 20/22      | 182,13 ± 26,73 ab | 21/21    | 202,39 ± 26,42 ab         | 20/22       | 189,38 ± 31,84 ab | 18/22 | 125,80 ± 23,71 b | 6/23  | 2,57 ± 1,63 c    |
| Número de G                                            | 16,354 | 5  | 0,006   | 5/21  | 0,24 ± 0,09 bc            | 7/22       | 0,36 ± 0,12 ab    | 7/21     | 0,48 ± 0,18 ab            | 6/22        | 0,36 ± 0,14 ab    | 12/22 | 0,59 ± 0,13 a    | 0/23  | 0,00 ± 0,00 c    |
| Porcentaje de prueba en G                              | 15,301 | 5  | 0,009   | 5/21  | 5,64 ± 3,47 bc            | 7/22       | 7,97 ± 3,41 ab    | 7/21     | 5,72 ± 2,03 ab            | 6/22        | 4,64 ± 2,04 ab    | 12/22 | 7,08 ± 1,73 a    | 0/23  | 0,00 ± 0,00 c    |
| Variables EPG secuenciales                             |        |    |         |       |                           |            |                   |          |                           |             |                   |       |                  |       |                  |
| Tiempo (min) desde inicio EPG hasta 1° E2 (t > 10 min) | 30,275 | 5  | 0,000   | 19/21 | 178,09 ± 30,86 c          | 18/22      | 211,33 ± 32,22 bc | 18/21    | 214,26 ± 36,74 bc         | 17/22       | 235,81 ± 35,99 bc | 16/22 | 291,41 ± 35,21 b | 2/23  | 440,98 ± 26,96 a |
| Tiempo (min) desde 1° prueba hasta 1° E2 (t > 10 min)  | 28,702 | 5  | 0,000   | 19/21 | 174,07 ± 30,96 c          | 18/22      | 207,72 ± 32,29 bc | 18/21    | 212,64 ± 36,65 bc         | 17/22       | 231,96 ± 35,95 bc | 16/22 | 288,65 ± 35,19 b | 2/23  | 435,57 ± 27,12 a |

<sup>a</sup> Los compuestos bioactivos se aplicaron a una dosis del 0,2% con Tween80® (1:2) como nanoemulsión de aceite en agua. Sulfoxaflor se aplicó a una dosis de 24 mg i.a./L diluida en agua.

<sup>b</sup> np = No prueba. Prueba = estilete en contacto con cualquier tejido vegetal. E2 = ingestión pasiva de savia de floema. E2 (t > 10 min) = ingestión de savia del floema con una duración superior a 10 min. G = ingestión activa de savia del xilema.

<sup>c</sup> H = estadístico de la prueba de Kruskal-Wallis para variables cuyos residuos no siguen una distribución normal y/o no son homocedásticos. gl = grados de libertad. p-valor = probabilidad de H. PPW = Proporción de individuos que produjeron una forma de onda específica. MEAN ± SE = media ± error estándar de la media de los datos no transformados. Diferentes letras dentro de una fila indican diferencias significativas entre los tratamientos con un p valor ≤ 0,05 utilizando la comparación de medias de la prueba de Dunn en Kruskal-Wallis.

**Figura 32. Duración total de prueba y no prueba para cada pulgón en su planta<sup>a, b, c, d</sup>.**



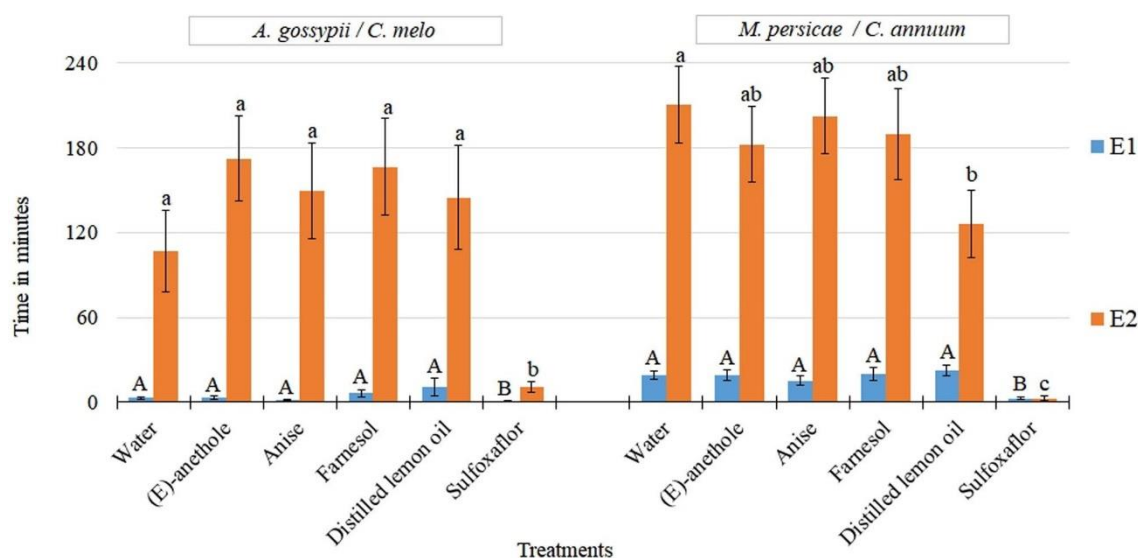
<sup>a</sup> Los compuestos bioactivos se aplicaron a una dosis del 0,2% con Tween80® (1:2) como nanoemulsión en agua. Sulfoxaflor se aplicó a una dosis de 24 mg i.a./L diluido en agua.

<sup>b</sup> Las barras de error representan el error estándar de la media.

<sup>c</sup> letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p$  valor  $\leq 0,05$ ) utilizando la comparación de medias de la prueba de Dunn entre tratamientos para la variable prueba, en el caso de *A. gossypii* en melón o para el caso de *M. persicae* en pimiento, ya que el análisis estadístico se realizó por separado para cada especie de pulgón en su planta hospedante.

<sup>d</sup> Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p$  valor  $\leq 0,05$ ) utilizando la comparación de medias de la prueba de Dunn entre tratamientos para la variable no prueba, en el caso de *A. gossypii* en melón o para el caso de *M. persicae* en pimiento, ya que el análisis estadístico se realizó por separado para cada especie de pulgón en su planta hospedante.

**Figura 33. Duración total de las formas de onda relacionadas con la actividad del floema (E1 y E2) para cada pulgón en su planta<sup>a, b, c, d</sup>.**



<sup>a</sup> Los compuestos bioactivos se aplicaron a una dosis del 0,2% con Tween80® (1:2) como nanoemulsión en agua. Sulfoxaflor se aplicó a una dosis de 24 mg i.a./L diluida en agua.

<sup>b</sup> Las barras de error representan el error estándar de la media.

<sup>c</sup> Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p$  valor  $\leq 0,05$ ) utilizando la comparación de medias de la prueba de Tukey en ANOVA o la prueba de Dunn en Kruskal-Wallis entre los tratamientos

para la forma de onda E1 (salivación al comienzo de la fase del floema), en el caso de *A. gossypii* en melón o para el caso de *M. persicae* en pimiento, ya que el análisis estadístico se realizó por separado para cada especie de pulgón en su planta hospedante.

<sup>d</sup> Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p \text{ valor} \leq 0,05$ ) utilizando la comparación de medias de la prueba de Dunn entre los tratamientos para la forma de onda E2 (ingestión pasiva de savia del floema), en el caso de *A. gossypii* en melón o para el caso de *M. persicae* en pimiento, ya que el análisis estadístico se realizó por separado para cada especie de pulgón en su planta hospedante.

Como los resultados anteriores sugieren que las nanoemulsiones de bioactivos volátiles podrían ser absorbidas por las plantas y transportadas por la savia, se realizó un ensayo para comprobar si realmente las nanoemulsiones tenían propiedades sistémicas y translaminares una vez pulverizadas sobre las plantas de pimiento.

En la Tabla 13 se muestra el crecimiento poblacional (ninfas y adultos) de *M. persicae* colocados sobre una hoja no pulverizada de una planta tratada. Solo el sulfoxaflor mostró un efecto sistémico, con reducciones en las poblaciones de *M. persicae* a los cuatro y siete días después del tratamiento. No se encontraron diferencias significativas en el número de individuos vivos ni en la tasa instantánea de crecimiento de las poblaciones con ninguna de las nanoemulsiones de bioactivos volátiles probadas, por lo que, al menos en este experimento, no se pudo afirmar que las nanoemulsiones tengan propiedades sistémicas y translaminares.

**Tabla 13. Prueba de efectos sistémicos. Crecimiento poblacional de *M. persicae* (ninfas más adultos) después de la pulverización de las plantas con los tratamientos<sup>a</sup>.**

| Tratamientos              | Pulgonos vivos/planta <sup>b</sup> |                      |                       | Ratio instantaneo de crecimiento poblacional (ri) <sup>d</sup> |                      |                      |
|---------------------------|------------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|
|                           | Día 1                              | Día 4                | Día 7                 | Día 1                                                          | Día 4                | Día 7                |
| Agua                      | 5.45 ± 0.41                        | 10.90 ± 1.81 a       | 20.30 ± 3.50 a        | 0.256 ± 0.074                                                  | 0.173 ± 0.052 a      | 0.154 ± 0.042 a      |
| Farnesol                  | 4.70 ± 0.34                        | 9.35 ± 1.49 a        | 19.00 ± 3.16 a        | 0.086 ± 0.102                                                  | 0.112 ± 0.055 a      | 0.172 ± 0.033 a      |
| Aceite destilado de limón | 4.65 ± 0.27                        | 11.70 ± 1.33 a       | 24.30 ± 3.01 a        | 0.118 ± 0.056                                                  | 0.232 ± 0.032 a      | 0.222 ± 0.029 a      |
| Mezcla                    | 5.25 ± 0.43                        | 12.80 ± 1.14 a       | 26.40 ± 3.46 a        | 0.182 ± 0.110                                                  | 0.254 ± 0.038 a      | 0.241 ± 0.024 a      |
| Sulfoxaflor               | 4.40 ± 0.46                        | 0.80 ± 0.35 b        | 0.20 ± 0.12 b         | -0.011 ± 0.112                                                 | -0.046 ± 0.026 b     | -0.025 ± 0.014 b     |
| <i>Estadístico</i>        | 3.159 <sup>c</sup>                 | 75.499 <sup>c</sup>  | 1284.200 <sup>c</sup> | 5.344 <sup>e</sup>                                             | 25.299 <sup>e</sup>  | 33.521 <sup>e</sup>  |
| <i>df</i>                 | 4                                  | 4                    | 4                     | 4                                                              | 4                    | 4                    |
| <i>p-valor</i>            | 0.532                              | 0.000 <sup>***</sup> | 0.000 <sup>***</sup>  | 0.254                                                          | 0.000 <sup>***</sup> | 0.000 <sup>***</sup> |

<sup>a</sup> Los compuestos bioactivos se aplicaron a una dosis del 0,2% con Tween80® (1:2) como nanoemulsión en agua. El producto mezcla (Mix) se aplicó a una dosis de 0,2% de productos bioactivos ((Z)-jasmona, citral, aceite destilado de limón, farnesol y (E)-anetol) diluidos en agua. Sulfoxaflor se aplicó a una dosis de 24 mg i.a./L diluido en agua.

<sup>b</sup> Cuatro hembras por planta fueron liberadas en jaulas clip ubicadas en hojas no tratadas el día 0 (n = 20). Las medias ± error estándar de la media seguido de letras diferentes dentro de una columna indican diferencias significativas entre los tratamientos (p valor ≤ 0,05) utilizando la comparación de medias de la prueba de Tukey con el modelo lineal generalizado binomial negativo (GLM).

<sup>c</sup> Estadístico: ratio estadístico de probabilidad (LR Stat) y probabilidad de Chi-cuadrado (p-valor).

<sup>d</sup> Tasa instantánea de crecimiento poblacional (ri) = (ln Nf/No)/ΔT, donde Nf es el número de pulgones que hay cada día después del tratamiento, No es el número de pulgones antes de los tratamientos y ΔT es el número de días entre ellos. Las medias ± error estándar de la media seguido de letras diferentes dentro de una columna indican diferencias significativas entre los tratamientos (p valor ≤ 0,05) utilizando la comparación de medias de la prueba de Dunn en Kruskal Wallis.

<sup>e</sup> Estadístico: estadístico de Kruskal Wallis (H) y probabilidad de Chi-cuadrado (p valor).

## **6. Discusión**

Existe una relación estrechamente ligada entre las propiedades y características de las nanoemulsiones y su actividad biológica. El tamaño de partícula es uno de ellos, cuanto menor sea el tamaño de partícula mayor será el efecto sobre el organismo objetivo, ya que se mejora la capacidad de penetración en los tejidos de plantas e insectos. Además, un tamaño de partícula pequeño favorece la solubilidad de las moléculas de las sustancias bioactivas, por lo que estos compuestos quedan repartidos de una manera más homogénea en el volumen total de la mezcla y, por tanto, se optimiza la dosis de ingrediente activo aplicado por superficie tratada (Bouchemal et al., 2004). El índice de polidispersidad (PDI) también es un factor a tener en cuenta, un valor de PDI inferior a 0,5 se considera aceptable para uso agrícola ya que indica una buena uniformidad de tamaño entre las poblaciones de partículas que componen una mezcla y que dicha mezcla es estable a largo plazo (Mustafa y Hussein, 2020). Otra característica de las nanoemulsiones es el denominado potencial zeta, se define como la diferencia de potencial entre los iones de la superficie de las gotículas y los iones del medio. Un potencial zeta bajo, de 0 a  $\pm 30$  mV, indica que la nanoemulsión no es muy estable, es decir que las fuerzas de atracción entre las partículas son mayores que las fuerzas de repulsión por lo que las partículas que componen la mezcla presentan cierta tendencia de agregación, floculación o coagulación. Un potencial zeta alto, más de  $\pm 30$  mV, indica que la nanoemulsión es estable porque las fuerzas de repulsión dominan sobre las fuerzas de atracción, impidiendo la agregación de partículas (Nirmala et al., 2022).

Las propiedades y características de las nanoemulsiones y su actividad biológica no solo dependen de la presencia y cantidad de ingredientes activos, sino también de la metodología empleada en la formulación y de otros factores como el tamaño y la morfología de las partículas, el peso molecular, así como la presencia de sustancias tensioactivas en los propios aceites esenciales, el pH de la solución, la concentración y naturaleza del surfactante utilizado en la preparación y la relación compuesto bioactivo:surfactante (Ziani et al., 2012; Sharma et al., 2020; Mustafa y Hussein, 2020; Singh y Pulikkal, 2022).

Los surfactantes hacen que las nanoemulsiones sean más resistentes a procesos incontrolables como la cristalización, la aglomeración y la sedimentación (Ibrahim, 2019). Según Wu et al. (2014), el aumento de la concentración de un polisacárido soluble

de soja empleado como surfactante en una nanoemulsión de aceite de tomillo, produce una disminución del tamaño de las gotas y también impide la formación de crema de las nanoemulsiones. Además, los surfactantes influyen en la humectabilidad o mojabilidad de los líquidos mejorando las interacciones entre las gotas de la nanoemulsión y la superficie tratada, pero una elevada concentración de surfactante no garantiza una mejor mojabilidad, sino que esto dependerá de la naturaleza de los mismos (Lin et al., 2016).

Otros autores (Sugumar et al., 2016) destacaron la importancia de la relación entre el surfactante y la fase oleosa a la hora de obtener una buena nanoemulsión de aceite de naranja en agua, de tal manera que, si bien se requería una concentración mínima de surfactante para la elaboración de las nanoemulsiones, un exceso de surfactante en la mezcla podría ser perjudicial para la formulación. Varios estudios destacaron que el tamaño de gota de las nanoemulsiones disminuye cuanto menor sea la relación aceite:surfactante (Gulotta et al., 2014; Li et al., 2017; Wang et al., 2009) por lo tanto, las formulaciones que contienen una gran cantidad de surfactante podrían garantizar un tamaño de gota pequeño, aunque en las formulaciones de insecticidas, el uso de una gran cantidad de surfactante podría tener efectos adversos en las plantas (Mirgorodskaya et al., 2020; Niedobová et al., 2019).

Según como se haya formulado el insecticida, los efectos fitotóxicos pueden verse potenciados o disminuidos. En los ensayos llevados a cabo en esta tesis doctoral, se observaron síntomas de fitotoxicidad sobre el cultivo debido a los bioactivos volátiles, tanto con la formulación 1:2 con Tween80® así como con lecitina de soja 1:1, manifestándose más el problema que con la formulación de lecitina de soja y aceite de girasol 1:1:1. Esta última formulación fue la que tuvo un rendimiento más equilibrado en cuanto a la actividad sobre pulgón y fitotoxicidad en el cultivo se refiere.

A la hora de formular nanoemulsiones con mezclas de surfactantes y estabilizantes, debe tenerse en cuenta el papel que desempeña cada sustancia, considerando el efecto sinérgico o antagónico que puede tener la interacción entre los componentes de la mezcla (Singh y Pulikkal, 2022). Según Hu et al. (2016), en las nanoemulsiones de eugenol formuladas con lecitina de soja y goma arábiga, cuando se aumenta la concentración de goma arábiga (en el rango de 0-1 % en peso) disminuye el tamaño de partícula, pero si la concentración de goma arábiga supera el 1% en peso,

entonces el tamaño de partícula aumenta debido a que se favorece la floculación, las partículas se aglutinan y, en consecuencia, se produce un aumento del tamaño de las gotículas. Asimismo, observaron que el papel de la lecitina de soja era crucial y era difícil formar una buena nanoemulsión solo con goma arábiga. Además, la adición de lecitina resultó en una disminución significativa del tamaño de gota, que va acompañada de un aumento en la turbidez de la mezcla.

Esto guarda cierta relación con el trabajo llevado a cabo por Chang et al. (2016) en el que estudiaron el efecto de diferentes surfactantes orgánicos pertenecientes al grupo de los polisorbatos, conocidos comercialmente como Tween®, en las características de las nanoemulsiones de carvacrol en agua. Comprobaron que el HLB o Balance Hidrofílico Lipofílico de los surfactantes juega un papel esencial en la formulación de las nanoemulsiones, cuanto mayor es la hidrofobicidad del surfactante, mayor es la estabilidad de las nanoemulsiones y menor es el tamaño de sus gotas. Esto se debe a que, a pesar de que los surfactantes sean del mismo tipo, la geometría molecular es distinta, pueden tener la misma cabeza polar, pero sus colas hidrofóbicas son diferentes, por lo que se empaquetan de distinta manera entre el medio acuoso y la gota de aceite y, en consecuencia, proporciona diferente grado de estabilización.

Según Rodríguez-Rojo et al. (2012), para obtener una nanoemulsión estable es necesario emplear en la formulación emulsionantes o combinaciones de emulsionantes que tengan valores de HLB cercanos a los requeridos para la fase oleosa. Los valores de HLB de aceites minerales y de uso común están más estudiados que los HLB de los aceites esenciales, en cuanto a los surfactantes, estos datos están más disponibles o pueden calcularse fácilmente a partir de la fórmula química en el caso de surfactantes sintéticos, sin embargo, esta información no siempre está disponible para surfactantes naturales o sus derivados, cuya aplicación en la formulación de emulsiones está aumentando en los últimos años. Cuando el valor de HLB es desconocido, la medición de la tensión en la superficie de contacto entre la fase oleosa y la fase acuosa, que contiene diluido el surfactante (natural o sintético), proporciona información bastante precisa para la selección del surfactante apropiado y la concentración mínima necesaria para obtener una emulsión estable. En su estudio, Rodríguez-Rojo et al. (2012) por un lado determinó que el valor HLB del aceite esencial de romero era 15, basándose en el análisis del tamaño de

gota y la estabilidad de las emulsiones con surfactantes sintéticos y, por otro lado, obtuvo buenos resultados empleando surfactantes biodegradables y no tóxicos, derivados del almidón como estabilizadores para emulsiones de aceite esencial de romero en agua.

Por su parte, Campolo et al. (2020) demostraron la influencia sobre el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad de diferentes surfactantes (Tween20®, Span20® y Span80®) en la formulación de nanoemulsiones de aceites esenciales. Entre los tensioactivos probados, Span80® no hizo buena nanoemulsión en combinación con los aceites esenciales de hinojo y anís, puesto que generaba mucha espuma que imposibilitaba la sonicación, según los autores (Campolo et al., 2020) esto lo atribuyen a la presencia de (E)-anetol en los aceites esenciales de ambas especies vegetales. En cambio, las nanoemulsiones elaboradas utilizando Tween80® como surfactante, dieron los mejores resultados en términos de tamaño de gota y valores de índice de polidispersidad (PDI) en comparación con los otros tensioactivos probados. Además, las nanoformulaciones sonicadas presentaron un tamaño de partícula más pequeño y homogéneo que las no sonicadas, lo que resultó en nanoemulsiones más estables.

Esto está relacionado con los trabajos realizados en esta tesis doctoral en los que se ha determinado que la aplicación de ultrasonidos como método de elaboración de nanoemulsiones da como resultado tamaños de partícula pequeños y buena estabilidad. Por otro lado, la (Z)-jazmona como compuesto puro de manera individual presentó una mejor emulsión con Tween80® (1:2), mientras que la mezcla al 1% de citral, (E)-anetol, farnesol, (Z)-jasmona y aceite de esencial de limón hace buena emulsión con surfactantes y estabilizantes de origen natural como la lecitina de soja y el aceite de girasol a partes iguales 1:1:1 en cuanto a los valores de tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta se refiere. Otros trabajos llevados a cabo recientemente por Pascual-Villalobos et al., (2024) se comprueba que al emplear los aceites vegetales de lino o cártamo en la formulación de nanoemulsiones de aceite esencial de anís, rico en (E)-anetol, se obtienen tamaños de partícula interesantes consiguiendo una mezcla con buena estabilidad.

Con relación a la formulación de las nanoemulsiones y la actividad sobre pulgones, Pascual-Villalobos et al. (2017) demostraron que, el aceite esencial de anís, y los compuestos puros citral, geraniol, (Z)-jasmona, carvona, estragol, pulegona o

cariofileno, cuando eran formulados con lecitina de soja, se obtenían tamaños de partícula pequeños y se mejoraba el efecto inhibitor del asentamiento sobre *R. padi* en un bioensayo de elección con discos de hoja de cebada en placas Petri. Concretamente con la nanoemulsión (1:1) al 1% de citral y lecitina de soja obtuvo partículas más pequeñas, un valor de potencial Z más elevado y un mayor índice de repelencia que con la formulación (1:2) con Tween80®. En general, los mejores valores de potencial Z fueron obtenidos tanto con la formulación con lecitina de soja (1:1) como con la combinación lecitina de soja más glicerol (1:2:1) en la formulación, lo que indica buenas capacidades estabilizadoras de ambas sustancias sin cambios significativos en la actividad. Por otro lado, demostraron que la temperatura de almacenamiento de las nanoemulsiones influía en las características de tamaño de partícula y estabilidad y en el efecto sobre el pulgón, según la naturaleza del aceite o compuesto bioactivo. La nanoemulsión de citral al 1% se separó en dos fases después de 15 días a 4 °C. La misma formulación a 25 °C dio una nanoemulsión clara y estable durante 15 días, pero comenzó a flocular (dando una apariencia lechosa) después de 30 días de almacenamiento. En cuanto al (E)-anetol, la nanoemulsión (1:1) al 10% con Tween80® y almacenada a 25 °C, resultó ser bastante estable ya que aparentemente de forma visual no se observaron cambios de color ni separación de fases durante al menos 30 días. En el caso de las muestras de farnesol al 1%, conservaron su efecto inhibitor del asentamiento cuando se almacenaron a 4 °C, pero dicho efecto disminuía drásticamente en las muestras mantenidas a 25 °C. Se evidenció la relación entre actividad, tamaño de partícula y temperatura de almacenamiento, resultando que a menor temperatura de almacenamiento menor tamaño de partícula y mayor actividad (Pascual-Villalobos et al., 2017).

Más tarde, Pascual-Villalobos et al. (2019), en otro de sus estudios sobre la inhibición del asentamiento de pulgones, en este caso con la especie *M. persicae*, en un bioensayo de elección con discos de hoja de pimienta en placa Petri, observó que las nanoemulsiones de geraniol, farnesol y (E)-anetol, fueron las más activas respectivamente, siendo el efecto inhibitor del asentamiento mayor en las formulaciones (1:2) con Tween80® que con lecitina de soja (1:2) o en la combinación lecitina de soja + glicerol (1:2:1). Sin embargo, las formulaciones con Tween80® perdían efecto después de ser almacenadas 6 meses a 4 °C, en cambio las formulaciones con lecitina si mantuvieron su actividad después del almacenamiento a 4°C durante 6 meses. Además,

el tamaño de partícula fue menor y los valores del potencial Z fueron mayores cuando se usó lecitina de soja como emulsionante, lo que indica que esta sustancia proporciona una buena estabilidad a las nanoemulsiones.

Los efectos de inhibición del asentamiento se pueden considerar como un tipo de repelencia, la mayoría de estudios en pulgones se centran en individuos ápteros, por esta razón, la falta de información sobre la repelencia de pulgones alados motivó su estudio en esta tesis doctoral, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo aportan nuevos conocimientos. Se sabe que el (E)-anetol tiene propiedades inhibitorias del asentamiento sobre las formas ápteras de varias especies de pulgón como por ejemplo *Acyrtosiphon pisum* (Harris) en guisante (Lacotte et al., 2023) también sobre *M. euphorbiae* (Canto-Tejero et al., 2022a) y *M. persicae* en bioensayos de elección con hojas de pimienta (Pascual-Villalobos et al., 2019; Canto-Tejero et al., 2022a). En el estudio realizado en esta tesis doctoral, el (E)-anetol mostró propiedades repelentes contra las formas aladas de *M. persicae*, esto guarda relación con el trabajo realizado por Pascual-Villalobos et al. (2024) en el que demostró que el aceite esencial de anís, del cual se extrae el (E)-anetol, fue igual de repelente. Con ello se demuestra que, aunque los pulgones alados tienen receptores olfativos más desarrollados en sus antenas que los individuos sin alas (Pickett et al., 2017), el (E)-anetol es percibido como una señal negativa por ambas formas (ápteras y aladas), y, por lo tanto, puede considerarse una sustancia prometedora como repelente de pulgones.

En cuanto al farnesol, la sustancia repelente por excelencia debido a su similitud molecular con (E)- $\beta$ -farneseno, la feromona de alarma de los pulgones. Se puede decir en base a los resultados obtenidos del bioensayo de elección con plantas de pimienta en macetas realizado en esta tesis doctoral, que repelió notablemente las formas aladas de *M. persicae*, lo que confirma los hallazgos conocidos previamente sobre los efectos repelentes de esta sustancia tanto en condiciones de laboratorio sobre pulgones alados (Halbert et al., 2009; Canto-Tejero et al., 2022a) y ápteros (Gutiérrez et al., 1997; Pascual-Villalobos et al., 2017; Pascual-Villalobos et al., 2019; Canto-Tejero et al., 2022a) como en condiciones de campo sobre pulgones del trigo *Metopolophium dirhodum* Walker y *Sitobion avenae* Fabricius (Zhou et al., 2016).

La mayoría de estudios relacionados con la repelencia de artrópodos se centran en los insectos que se alimentan de la sangre humana y animal y que son vectores de enfermedades. Zhu et al. (2018), en su estudio descubrió que los compuestos derivados del aceite de coco tenían propiedades repelentes contra artrópodos chupadores de sangre, como moscas, garrapatas, chinches y mosquitos en bioensayos de laboratorio. Además, demostraron que su efecto puede durar hasta dos semanas después de la aplicación, lo que indica que tiene una actividad residual más prolongada que la N,N-dietil-meta-toluamida (DEET), considerado el repelente de insectos estándar desde su desarrollo en 1944, por lo que los compuestos derivados del aceite de coco se presentan como alternativa al DEET, del que se conoce que causa problemas de salud en las personas, especialmente en los lactantes y las mujeres embarazadas (Isman, 2006). También se ha demostrado que una formulación acuosa a base de almidón que contiene ácidos grasos naturales de coco protege al ganado de las picaduras de moscas hasta por 96 horas, lo que, según los autores, es la protección más duradera encontrada por un producto repelente natural (Zhu et al., 2018).

Ante los buenos informes sobre las propiedades repelentes de los compuestos derivados del aceite de coco, se decidió probar su efecto en pulgones y se demostró que los ésteres metílicos de ácidos grasos de coco (en adelante coco), solo o en combinación con (E)-anetol a una dosis de 0,1-0,2% del ingrediente activo (nanoemulsión 1:2) rociado sobre plantas de pimiento, repelían las formas aladas de *M. persicae* (Martín Pérez et al., 2021). Esto fue un ensayo preliminar que sirvió de perfeccionamiento para el trabajo llevado a cabo en esta tesis doctoral, en el que se han obtenido buenos resultados tanto en términos de distribución de elección como de índice de repelencia de pulgones alados de la especie *M. persicae* tras la pulverización de coco sobre plantas de pimiento, siendo el primer informe de la actividad repelente de este producto contra una plaga agrícola. Además, recientemente (Pascual-Villalobos et al., 2024) se ha determinado que la mezcla de coco con fibroína de seda y aceite destilado de limón mejoran las propiedades fisicoquímicas (tamaño de partícula y estabilidad) y por tanto también el efecto repelente de las nanoemulsiones de ésteres metílicos de ácidos grasos de coco.

Varios productos veterinarios para el control de pulgas y garrapatas en mascotas contienen D-limoneno (procedente de la cáscara de los cítricos) como ingrediente activo

(Isman, 2006). En pulgones, se ha demostrado mediante un bioensayo selectivo con discos de hojas de granada y vid que los aceites esenciales de *Citrus x aurantium* L. y *C. reticulata* Blanco mostraron efectos repelentes contra el pulgón de la granada *Aphis punicae* Passerini y el pulgón de la vid *A. illinoisensis* Shimer (Alotaibi et al., 2022). Además, se ha demostrado que el aceite esencial de semillas de alcaravea (*Carum carvi* L.), rico en D-carvona y D-limoneno, posee actividad repelente contra individuos ápteros de *M. persicae* en plantas de col blanca (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) (Girardi et al., 2023). Otro compuesto presente en los aceites esenciales de cítricos es el citral, y se ha demostrado a través de bioensayos de elección con discos de hojas y mediante el registro de movimientos antenales y corporales, que varios compuestos orgánicos derivados del citral inhibían el asentamiento y tenían efectos repelentes contra individuos ápteros de *M. persicae* (Dancewicz et al., 2020). En el experimento llevado a cabo en esta tesis doctoral, el aceite destilado de limón no mostró ningún efecto repelente contra las formas aladas de *M. persicae* en plantas de pimiento, pero mejoró las propiedades repelentes de las mezclas de bioactivos volátiles cuando se agregó como ingrediente.

En los últimos años, se ha centrado la atención en las emulsiones para reemplazar a los disolventes orgánicos convencionales y lograr nanoformulaciones de fitosanitarios más respetuosas con el medio ambiente. Diversos estudios han demostrado que tanto el aceite de limón, como su compuesto mayoritario, el limoneno, actúan como disolventes naturales mejorando las propiedades de las nanoemulsiones. Según Mustafa y Hussein (2020), el uso de disolventes puede mejorar las propiedades de la fase acuosa (viscosidad, densidad, tensión interfacial) y las propiedades estructurales de la formulación. Kalaitzaki et al. (2015) compararon la toxicidad sobre *A. gossypii* de dos preparados a base de piretrinas, uno comercial y otro formulado como nanoemulsion en presencia de aceite de limón y los resultados que obtuvieron indicaron que la nanoemulsion de piretrina natural y aceite de limón resultó ser más tóxica que la formulación de piretrina comercial. Tal y como afirman Santos et al. (2016), el D-limoneno es el terpeno más común utilizado como disolvente, es un interesante disolvente de origen biológico que se puede obtener a partir de las cáscaras de los cítricos. Este biodisolvente es una sustancia química respetuosa con el medio ambiente que puede sustituir a los compuestos orgánicos volátiles convencionales. Por tanto, el D-limoneno se considera una buena opción para incluirlo como disolvente en la formulación de productos agroquímicos.

A la vez que se estudiaron las propiedades repelentes de las nanoemulsiones de bioactivos volátiles sobre las formas aladas de *M. persicae*, en esta tesis doctoral se ha estudiado también la reproducción de estos individuos alados sobre las plantas de pimiento después de la fumigación con las nanoemulsiones volátiles bioactivas y se han obtenido resultados prometedores con la nanoemulsión de farnesol + aceite destilado de limón + coco, esta mezcla reduce la fecundidad de los individuos alados de *M. persicae*. Entre los posibles modos de acción de los aceites esenciales, se debe considerar la reducción de la fertilidad de los insectos (Nollet y Rathore, 2017), pero en el caso de nuestro bioensayo, la exposición al tratamiento (solo 24 horas) parece poco tiempo para poder apreciar tal efecto. Otra posible explicación para esta inhibición de la reproducción es que las hembras tienen dudas sobre la idoneidad del huésped para establecer una colonia debido a la percepción de los volátiles. Puede que el tratamiento modifique la composición de la savia y/o de los jugos celulares, que los insectos se confundan por los volátiles que enmascaran el olor de la planta huésped, o que se hayan sentido incómodos por el efecto de contacto residual del tratamiento. Sean cual sean las razones, parece que la reproducción se inhibe en algunos casos, pero para confirmar y comprender este efecto se necesitan más investigaciones al respecto.

En cuanto a otro modo de acción de las nanoemulsiones de bioactivos volátiles como es la mortalidad por contacto, se cree que el tamaño nanométrico de las gotas facilita la penetración y transmisión de la formulación nanoinsecticida a través de la cutícula del insecto y por tanto se mejora la actividad insecticida (Duarte et al., 2015; Osanloo et al., 2017), esta penetración rompe la capa cuticular de cera del insecto, impartiendo una rápida pérdida de agua y finalmente causando su muerte (Mustafa y Hussein, 2020). Está ampliamente aceptado que la toxicidad de las nanoemulsiones tiene lugar al desencadenar estrés oxidativo e inhibir las rutas bioquímicas en las células de los insectos (Sharma et al., 2020). Además, también se supone que la desnaturalización de orgánulos y enzimas ocurre debido a la unión de las gotículas a las proteínas o al fósforo del ADN existente en las células (Benelli, 2018), pudiendo causar deterioro de las funciones celulares y provocar la muerte celular. Por ello, las nanoemulsiones a base de aceites esenciales se utilizan de forma eficaz contra insectos dañinos para combatir su población y las enfermedades transmitidas por vectores.

En lo que respecta a la mortalidad en pulgones, Heydari et al. (2020) formularon una nanoemulsión de *Mentha x piperita* L. con Tween80® mediante un proceso de aplicación de alta energía con ultrasonidos y obtuvieron un tamaño de partícula inferior a 10 nm, probaron la actividad aficida de las nanoformulaciones contra *A. gossypii* sobre discos de hoja de pepino en placas Petri y estas mostraron una toxicidad por contacto moderadamente alta después de 24 h. De forma similar, López Santos-Olmo et al. (2024) han demostrado recientemente que una nanoemulsión de aceite de pino (*Pinus halepensis* Miller) con Tween80® al (1:2) causa mortalidad a las 24 h en las poblaciones de *M. persicae* sobre discos de hoja de pimiento en placas Petri. Por su parte, Marcos-García et al. (2024), han descubierto que tanto el aceite de pino como el de *Santolina chamaecyparissus* L., aplicados de forma individual, tienen efecto tóxico por contacto vía tópica hasta al menos 48 h en *M. persicae*, siendo la mezcla de ambos aceites mucho más efectiva que aplicando cada aceite por separado.

En esta tesis doctoral se ha estudiado la mortalidad de las nanoemulsiones de bioactivos volátiles sobre la especie de pulgón *M. persicae*, en el bioensayo con discos de hoja de pimiento en placas de Petri, el producto mezcla (citral, (E)-anetol, farnesol, (Z)-jasmona y aceite de esencial de limón) tuvo un mejor efecto insecticida cuando se utilizó lecitina de soja en la formulación. Sin embargo, en condiciones de campo en los invernaderos de pimiento, se registró un mayor número de pulgones muertos tanto con el producto mezcla como con (Z)-jasmona, ambas formulaciones con Tween80® (1:2). El aceite de semillas de algodón fue otro de los bioactivos probados en condiciones de campo que dio buenos resultados insecticidas cuando se formuló al 1:1 con jabón potásico como surfactante en agua.

Otro trabajo llevado a cabo en esta tesis doctoral ha sido la evaluación de la persistencia del efecto insecticida de las nanoemulsiones y se ha determinado que, de los bioactivos probados, la nanoemulsión (1:2) de farnesol al 0,2% con Tween80® conserva su toxicidad sobre las poblaciones de pulgón hasta 7 días después de la aplicación, mientras que con el producto mezcla de bioactivos, el efecto se mantuvo hasta 14 días después de la pulverización de las plantas, lo que indica que la formulación del producto permite una liberación controlada de los bioactivos durante ese tiempo. Algo similar descubrió Pascual-Villalobos et al. (2017), en su trabajo demostró que farnesol producía

mortalidad sobre *R. padi* en hojas de cebada debido a los volátiles y el efecto residual del producto. Esta es una de las muchas ventajas de las nanoemulsiones de bioactivos volátiles en comparación con los productos fitosanitarios tradicionales.

Existen numerosos estudios que demuestran que el hecho de incorporar el ingrediente activo en forma de nanoemulsión, permite una liberación controlada en el organismo objetivo (Mustafa y Hussein, 2020). Además, las nanoformulaciones proporcionan una buena humectabilidad, lo que permite por un lado que el ingrediente activo puede permanecer más tiempo en el tejido vegetal (Quin et al., 2019) y por otro lado asegura la impregnación exitosa del ingrediente activo en la cutícula de los insectos, aumentando así la absorción eficiente del agroquímico por parte del organismo objetivo (Mustafa y Hussein, 2020). Además, se mejora la solubilidad y disolución de sustancias poco solubles en agua, lo que contribuye a una estabilidad prolongada, sin floculación o coalescencia visible durante largos períodos (Tadros et al., 2004; Hazra, 2017) y una protección contra la fotodegradación (Nguyen et al., 2013). Aunque la estabilidad de las nanoemulsiones es otro desafío, ya que los bioactivos volátiles responden negativamente ante las condiciones climáticas adversas, por lo que es necesario estudiar la resistencia de estos productos a los factores ambientales para prolongar el tiempo de almacenamiento y preservar el efecto de los ingredientes activos (Mustafa y Hussein, 2020).

Con el propósito de ampliar los conocimientos acerca del modo de acción de las nanoemulsiones de bioactivos volátiles, los resultados obtenidos del estudio llevado a cabo en esta tesis doctoral sobre la influencia de las nanoemulsiones en la alimentación de los pulgones, indican que el aceite destilado de limón altera el comportamiento alimentario de *M. persicae* sobre plantas de pimiento tanto en los momentos previos a la ingestión de savia del floema como durante la ingestión.

Uno de los principales compuestos del aceite de limón es el limoneno, en la bibliografía se encuentran numerosos estudios sobre el limoneno y otros compuestos presentes en el aceite esencial de cítricos que concuerdan con los resultados obtenidos en esta tesis doctoral. Halarewicz-Pacan et al. (2003), informaron que el S-limoneno redujo el número de perforaciones del estilete de *M. persicae* en los vasos conductores del floema e inhibió la ingestión de savia floemática. Otro estudio (Gabrys et al., 2005) también demostró que varios compuestos presentes en el aceite de limón, como el citral, el linalool

y el S-limoneno, eran disuasivos y reducían el número, así como la duración total y media, de las pruebas de *M. persicae*. Sin embargo, Canto-Tejero et al. (2022a), no observó inhibición del asentamiento de *M. persicae* ni *M. euphorbiae* en presencia de aceite de limón o su componente principal, el limoneno. Por lo tanto, interpretamos que el aceite destilado de limón no tiene ningún efecto postingestivo, pero si afecta a la alimentación de los pulgones.

Otros bioactivos volátiles a los que se estudió su influencia en el comportamiento alimentario de pulgones fueron el aceite esencial de anís y su compuesto mayoritario (E)-anetol. Se sabe por investigaciones previas que inhiben el asentamiento de *R. padi* en las hojas de cebada (Pascual-Villalobos et al., 2017) y *M. persicae* y *M. euphorbiae* (Pascual-Villalobos et al., 2019; Canto-Tejero et al., 2022a) sobre hojas de pimienta en bioensayos de elección. En el estudio del comportamiento alimentario de pulgones se determinó que los compuestos anisados causan deshidratación en los pulgones debido a que estos mostraron una actividad anómala en los tejidos que transportan la savia del xilema, la cual está compuesta principalmente por agua y otras sustancias disueltas, por lo que al ser menos nutritiva que la savia elaborada del floema, más bien puede ser utilizada para ingerir agua e hidratarse, aunque se necesitan más estudios para confirmar esto.

Los compuestos que interfieren en la alimentación de los insectos pueden funcionar como inhibidores pre-ingestivos, que afectan la actividad de los receptores gustativos, pueden actuar durante la ingestión al suprimir las enzimas salivales y/o el transporte de alimentos, y también pueden actuar como inhibidores post-ingestivos que afectan los procesos fisiológicos después de la ingestión de tales compuestos durante la alimentación (Frazier y Chyb 1995). Investigaciones recientes (López Santos-Olmo et al., 2024) sugieren que el aceite de pino causa disuasión alimentaria en los individuos de *M. persicae* que alcanzan los vasos conductores del floema de las plantas de pimienta ya que los individuos alimentados de plantas tratadas con este compuesto presentan periodos de salivación en el floema más prolongados y, por el contrario, cortos periodos de ingestión de savia floemática. Otros compuestos como la R-pulegona (presente en el aceite esencial de *Mentha* sp.), interfieren en todo el ciclo del comportamiento alimentario de los pulgones, tal y como demostró Dancewicz et al. (2008) en su trabajo, la R-pulegona inhibió el asentamiento debido a efectos post-ingestivos sobre *M. persicae* en plantas

tratadas de col china y redujo el tiempo total de prueba, además de retrasar la llegada a los vasos conductores de savia del floema y evitar la ingesta prolongada de savia, lo que indica que el tratamiento también tuvo efectos pre-ingestivos e ingestivos.

En lo que respecta a la interferencia del farnesol en el comportamiento alimentario de pulgones, en esta tesis doctoral se ha demostrado que no es capaz de alterar el comportamiento alimentario, a la dosis de 0,2%, en ninguna de las dos especies de pulgones estudiadas. Por su parte, Wroblewska-Kurdyk et al., (2020), tampoco observó ninguna alteración en el comportamiento alimentario de *M. persicae* en plantas de col china tratadas con farnesol, pero sí se ha demostrado que tiene propiedades de inhibición del asentamiento sobre varias especies de pulgones como por ejemplo *M. persicae* en bioensayos de elección con hojas de pimiento (Gutiérrez et al., 1997; Pascual-Villalobos et al., 2019; Canto-Tejero et al., 2022a) y plantas de col china (Wroblewska-Kurdyk et al., 2020), *M. euphorbiae* en bioensayos de elección con discos de hoja de pimiento (Pascual-Villalobos et al., 2019; Canto-Tejero et al., 2022a) y *R. padi* en bioensayos de elección con hojas de cebada (Pascual-Villalobos et al., 2017). Farnesol también produce toxicidad por contacto en pulgones y ha sido demostrado en varios trabajos. Canto-Tejero et al. (2022b) estudió la mortalidad de farnesol sobre *M. persicae* en pimiento, tanto en condiciones de laboratorio como en invernadero, también probó el efecto letal sobre *M. persicae* y *M. euphorbiae* en un ensayo en cámara de cultivo con plantas de pimiento (Canto-Tejero et al., 2022a) y sobre *N. ribisnigri* en lechuga (Canto-Tejero et al., 2022c), tanto en cámara de cultivo como en invernadero.

En la literatura, algunas investigaciones (Dancewicz et al., 2016) informan sobre los efectos de los volátiles como estímulantes gustativos de los pulgones con consecuencias tóxicas. El linalool inhibió el asentamiento de *M. persicae* en ensayos de elección con col china y aunque el comportamiento alimentario no se alteró, se cree que tiene un efecto a largo plazo sobre la digestión, y según los autores, su actividad fue post-ingestiva.

En vista a los resultados obtenidos del estudio de la interferencia de las nanoemulsiones de bioactivos volátiles sobre el comportamiento alimentario de pulgones, se planteó la posibilidad de que estas formulaciones fueran absorbidas por las plantas y transportadas a través de la savia, en esta tesis doctoral se han evaluado las propiedades

sistémicas de las nanoemulsiones pero no se han encontrado tales efectos. Poco se ha publicado sobre la translocación de aceites esenciales en plantas. Werrie et al. (2020) consideraron que las interacciones entre un monoterpeno y las células del tejido vegetal juegan un importante papel. Una vez que el monoterpeno penetra, se absorbe y se diluye repartiéndose en el organismo. En otro estudio, se demostró que el timol se translocaba en naranjos a partir de la absorción de las raíces, pero no se explicó el mecanismo (Wong y Coats 2018). Esto también se relaciona con el trabajo de Delfine et al. (2000) en el que aplicaron por fumigación los monoterpenos ( $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno) en árboles del género *Quercus* sp., estos penetraron en el interior de las hoja y los compuestos estaban presentes 12 h después de la aplicación. Además, también se encontraron monoterpenos exógenos (mirceno y limoneno) en las hojas, tal vez producto de la síntesis endógena estimulada, en *Quercus suber* L.

Otro aspecto a considerar sobre las nanoemulsiones de bioactivos volátiles es su efecto sobre la fauna auxiliar. Cantó-Tejero et al. (2022a), comprobó que las larvas de *S. rueppellii* y las hembras adultas de *A. colemani* se sintieron atraídas por farnesol en un bioensayo de olfatometría, mientras que el citral, (Z)-jasmona y el salicilato de metilo fueron repelentes para *A. colemani*. En condiciones de invernadero, Cantó-Tejero et al. (2022b) observó momias de parasitoides y larvas de *Aphidoletes* sp. (Diptera: Cecidomyiidae) tanto antes como después de la pulverización de nanoemulsiones de farnesol que realizó para la ejecución de un ensayo en el que determinó la eficacia insecticida sobre *M. persicae* en plantas de pimiento. En otro ensayo realizado sobre un cultivo de lechuga al aire libre, Cantó-Tejero (2022c), identificó los enemigos naturales de *N. ribisnigri* presentes durante el experimento y encontró tres especies de sírfidos (Diptera: Syrphidae): *S. rueppellii* (Wiedemann), *Sphaerophoria scripta* L. y *Episyrphus balteatus* De Geer; mariquitas *C. septempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae), y el redúvido *Zelus renardii* Kolenati (Heteroptera: Reduviidae). Al finalizar el experimento, observó que las poblaciones de enemigos naturales (mariquitas y sírfidos) fueron mayores en las plantas tratadas con aceite esencial de anís y su compuesto mayoritario (E)-anetol, que en las plantas tratadas con piretrinas como insecticida de referencia. Otros estudios recientes (Marcos-García et al., 2024) determinaron que los aceites de pino y *S. chamaecyparissus* no causan apenas mortalidad por contacto sobre el agente de biocontrol, el depredador *S. rueppellii*.

Por su parte, Dáder et al., (2024) estudió los efectos de las nanoemulsiones de bioactivos volátiles sobre larvas de *C. carnea*. En un bioensayo de elección con discos de hoja de pimienta en placas de Petri determinaron que las nanoemulsiones de aceite esencial de anís eran atrayentes para las larvas de crisopa, farnesol resultó ser repelente, mientras que el aceite destilado de limón no mostró efecto. En el ensayo de observación visual de comportamiento de las larvas de crisopa, en presencia de una colonia de pulgón sobre hojas de pimienta tratadas con las nanoemulsiones de bioactivos volátiles, comprobaron que el tiempo que permanecieron las larvas depredando, descansando o caminando fue similar entre los tratamientos, así como la tasa de pulgones consumidos. Por último, realizaron tres ensayos independientes de toxicidad (contacto residual con discos de hoja de pimienta tratadas, ingestión de huevos de *Ephestia kuehniella* Zeller tratados y doble vía contacto/ingestión con plantas de pimienta tratadas infestadas con pulgones) en ellos estudiaron la mortalidad y los efectos subletales en el desarrollo y reproducción de crisopas y observaron que no hubo efecto significativo de las nanoemulsiones de bioactivos volátiles en la mortalidad tras el contacto residual o por ingestión. Si que observaron que las nanoemulsiones redujeron significativamente el porcentaje de larvas emergidas de los huevos de las puestas realizadas por los adultos, que, durante la etapa larvaria, estuvieron en contacto con las nanomulsiones de los bioactivos volátiles. Del ensayo de ingestión concluyeron que, el número de larvas alimentadas de huevos de *E. kuehniella* tratados con aceite destilado de limón, que no lograron completar su desarrollo hasta la etapa adulta, fue significativamente menor respecto al control. En el ensayo de doble vía, la tasa de consumo de pulgones disminuyó de manera general a las 6 horas, aunque este efecto desapareció tras 72 horas.

Con lo anterior, se puede decir que las nanoemulsiones de farnesol, aceite destilado de limón, aceite esencial de anís y su compuesto mayoritario (E)-anetol, así como el aceite de pino y el aceite de santolina, son compatibles con la mayoría de enemigos naturales de los pulgones, por lo que son sustancias candidatas a incluir como herramientas en la gestión integrada de plagas de pulgón en el cultivo de pimienta en invernadero y lechuga al aire libre.

En definitiva, la amplia gama de estudios y resultados descritos anteriormente han demostrado que las nanoemulsiones de bioactivos volátiles tienen un potencial muy

prometedor como insecticidas, pero aún no se conoce con exactitud el modo de acción de las nanoemulsiones. Tampoco se conoce muy bien la respuesta de las nanoemulsiones de insecticidas de origen botánico frente a situaciones adversas, por lo que se requieren estudios en condiciones de campo para examinar su eficacia y evaluar su comportamiento en casos reales de aplicación y así poder identificar la relación de las prácticas agronómicas con las capacidades de las nanoemulsiones. En cuanto al efecto de las nanoemulsiones sobre el propio cultivo y las consecuencias sobre el medio ambiente y los seres humanos a largo plazo tampoco se encuentran muchos estudios. Además, con la mejora de la solubilidad en agua del ingrediente activo en forma de nanoemulsión, se corre el riesgo potencial de contaminación de las fuentes de agua. Por lo tanto, los agroquímicos formulados como nanoemulsiones deberían someterse a más pruebas para realizar estudios de ecotoxicidad y evaluar el nivel de solubilidad que causa daño a los organismos vivos para garantizar su uso con total seguridad. Esto es importante para poder predecir las consecuencias tóxicas y peligrosas que puedan surgir del uso comercial de las nanoemulsiones como producto fitosanitario. Los estudios en esta materia conducirían a la generación de conocimientos y posteriormente al buen aprovechamiento del potencial de los agroquímicos basados en nanoemulsiones como la futura generación de nanoinsecticidas seguros.

## **7. Conclusiones**

De los trabajos realizados en esta tesis doctoral se puede concluir:

- El uso de ultrasonidos como método de elaboración de nanoemulsiones ofrece ciertas ventajas puesto que se consiguen tamaños de partícula pequeños y buena estabilidad.
- Un 1% de la mezcla de citral, (E)-anetol, farnesol, (Z)-jasmona y aceite esencial de limón, a partes iguales, forma una buena emulsión con lecitina de soja y aceite de girasol en formulación 1:1:1 y además presenta un buen efecto insecticida a los 4 días de la aplicación del tratamiento obteniéndose una mortalidad del 73% en condiciones de laboratorio y del 30% en condiciones de campo, sin causar fitotoxicidad al cultivo.
- La (Z)-jasmona al 0,25% forma una buena emulsión con Tween80® (1:2) y en condiciones de campo proporciona valores de mortalidad en pulgones del 83% a los 4 días de la pulverización.
- En condiciones de campo, el aceite de semillas de algodón al 3%, formulado al 1:1 con jabón potásico como surfactante en agua, dio como resultado una mortalidad del 82% en pulgones a los 4 días de la aplicación del tratamiento.
- El producto mezcla de bioactivos (farnesol, citral, aceite de limón, (E)-anetol y (Z)-jasmona), mantiene su toxicidad contra el pulgón hasta 14 días después de la pulverización de las plantas de pimiento, lo que indica que la formulación del producto permite una liberación controlada de los bioactivos durante ese tiempo.
- La nanoemulsión (1:2) de farnesol al 0,2% con Tween80® no produce ningún efecto en la alimentación de las formas ápteras de *M. persicae*, en las condiciones establecidas en esta tesis, pero en condiciones de laboratorio reduce la tasa de crecimiento poblacional de los pulgones, con un efecto que persiste hasta 7 días después de la aplicación sobre las plantas de pimiento y también produce un efecto repelente (I.R. = 40,24%) vía olfativa sobre las formas aladas de *M. persicae*.

- Tanto el aceite esencial de anís como su compuesto mayoritario (E)-anetol, causan deshidratación sobre las formas ápteras y repelen las formas aladas de *M. persicae*. (E)-anetol es repelente tanto de forma individual como formando mezclas con ésteres metílicos de ácidos grasos de coco + aceite destilado de limón o con farnesol + aceite destilado de limón (I.R. = 30,85%, 30,63% y 36,55%, respectivamente). Mientras que el aceite esencial de anís repele (I.R. = 25,87%) las formas aladas de *M. persicae* formulado con aceite de cártamo.
- El aceite destilado de limón por sí solo no produce ningún efecto repelente (I.R. = 9,93%) contra las formas aladas de *M. persicae* en plantas de pimienta, pero mejora las propiedades repelentes de otros bioactivos volátiles formando mezclas. Además, altera el comportamiento alimentario de los individuos ápteros de *M. persicae* puesto que los individuos que se alimentaron de plantas de pimienta tratadas con aceite destilado de limón estuvieron más tiempo sin mostrar actividad (tiempo total de np = 100,53 min s/480 min) que aquellos alimentados en plantas control (tiempo total de np = 47,05 min s/480 min). Además, la duración total de la ingestión de floema (E2) fue significativamente menor para los individuos alimentados con plantas tratadas (tiempo total de E2 = 125,80 min s/480 min) en relación al control (tiempo total de E2 = 210,39 min s/480 min).
- Los ésteres metílicos de ácidos grasos de coco al 1% no producen mortalidad por contacto contra las formas ápteras de *M. persicae*, pero cuando se aplicaron sobre las plantas de pimienta al 0,2%, si mostraron propiedades repelentes (I.R. = 28,93%) contra las formas aladas de *M. persicae*, siendo el primer informe de la actividad repelente de este producto contra una plaga agrícola.
- La nanoemulsión de farnesol + aceite destilado de limón + ésteres metílicos de ácidos grasos de coco, reduce significativamente la fecundidad (0,65 ninfas/hembra y día) de los individuos alados de *M. persicae* en comparación con el control (0,97 ninfas/hembra y día).
- Las nanoemulsiones de los bioactivos volátiles estudiadas no son sistémicas, es decir no se transportan por los vasos conductores de savia de la planta. Pero no

hay que descartar efectos translaminares en las hojas que tendrían que ser estudiados en futuros trabajos.

- Los efectos de mortalidad se deben principalmente al contacto vía tópica y los efectos sobre la alimentación ocurren cuando el estilete del insecto entra en contacto con el producto en los tejidos foliares. Mientras que la repelencia se da por la interacción olfativa con los receptores de las antenas de los pulgones.

En definitiva, las aplicaciones foliares de nanoemulsiones de bioactivos volátiles y sus mezclas a dosis bajas que no sean fitotóxicas para los cultivos son una buena estrategia a introducir en los sistemas de manejo del cultivo de pimiento para reducir las poblaciones de pulgones. Es importante seguir trabajando con bioactivos volátiles para conocer mejor su modo de acción y sus propiedades insecticidas, así como la persistencia de estos productos y sus capacidades translaminares. Las futuras líneas de investigación en el área de la formulación de insecticidas de origen botánico deben estar dirigidas a desarrollar productos que tengan actividad a dosis más bajas, tengan una mejor estabilidad de almacenamiento y sean más seguros de usar.

## **8. Referencias bibliográficas**

- Anton, N., and Vandamme, T.F. (2011). Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. *Pharmaceutical Research*, 28: 978–985. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0309-1>
- Alotaibi, S.S., Darwish, H., Alzahrani, A.K., Alharthi, S., Alghamdi, A.S., Al-Barty, A.M., Helal, M., Maghrabi, A., Baazeem, A., Alamari, H.A., Noureldeen, A. (2022). Environment-Friendly control potential of two citrus essential oils against *Aphis punicae* and *Aphis illinoisensis* (Hemiptera: Aphididae). *Agronomy*, 12: 2040. <https://doi.org/10.3390/agronomy12092040>
- Benelli, G., and Lukehart, C.M., (2017). Special issue: applications of green-synthesized nanoparticles in pharmacology, parasitology and entomology. *Journal of Cluster Science* 28: 1-2. <https://doi.org/10.1007/s10876-017-1165-5>
- Benelli, G. (2018). Mode of action of nanoparticles against insects. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 12329–12341. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1850-4>
- Blackman, R.L., Eastop, V.F. (2000). *Aphids on the world's crops: an identification and information guide*, 2nd Edn. Wiley, Chichester, 466 pp.
- Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E., Fessi, H. (2004). Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics*, 280: 241-251. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.05.016>
- Brightwell, R., and Dransfield, R.D. (2016). Issues in aphid biology. Aphid nymphs, instars, moults and metamorphosis: biology and morphology. Consultado en abril de 2024: <https://influentialpoints.com/Sitemap.htm>
- CABI. (2022a). *Myzus persicae* (green peach aphid). CABI Compendium. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.35642>
- CABI. (2022b). *Aphis gossypii* (cotton aphid). CABI Compendium. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.6204>

Campolo, O., Giunti, G., Laigle, M., Michel, T., Palmeri, V. (2020). Essential oil-based nano-emulsions: Effect of different surfactants, sonication and plant species on physicochemical characteristics. *Industrial Crops and Products*, 157: 112935. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112935>

Canto-Tejero, M., Casas, J.L., Marcos-Garcia, M.A., Pascual-Villalobos, M.J., Florencio-Ortiz, V., Guirao, P. (2022a). Essential oils-based repellents for the management of *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*. *Journal of Pest Science* 95(1):365–379. <https://doi.org/10.1002/ps.6902>

Canto-Tejero, M., Guirao, P., Pascual-Villalobos, M.J. (2022b). 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>

Canto-Tejero, M., Pascual-Villalobos, M.J., Guirao, P. (2022c). 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>

CARM. (2015). Pliego de condiciones de la indicación geográfica protegida “Melón de Torre Pacheco-Murcia”. 7 pp. [https://www.carm.es/web/Blob?ARCHIVO=PLIEGO%20DE%20CONDICIONES%20DEFINITIVO.pdf&TABLA=ARCHIVOS&CAMPOCLAVE=IDARCHIVO&VALORCLAVE=96240&CAMPOIMAGEN=ARCHIVO&IDTIPO=60&RASTRO=c214\\$m1185,34702](https://www.carm.es/web/Blob?ARCHIVO=PLIEGO%20DE%20CONDICIONES%20DEFINITIVO.pdf&TABLA=ARCHIVOS&CAMPOCLAVE=IDARCHIVO&VALORCLAVE=96240&CAMPOIMAGEN=ARCHIVO&IDTIPO=60&RASTRO=c214$m1185,34702)

Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K. and Schaad, M.C. (1996). Cell-to-cell and long distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* 8, 1669–1681. <https://doi.org/10.1105%2Ftpc.8.10.1669>

Casas, J.L., Sagarduy-Cabrera, A., López Santos-Olmo, M., Marcos-García, M.A. (2023). Essential oils from selected mediterranean aromatic Plants - characterization and biological activity as aphid biopesticides. *Life* 2023, 13, 1621. <https://doi.org/10.3390/life13081621>

Chang, Y., and McClements, D.J. (2014). Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: influence of the oil phase, surfactant, and temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(10): 2306-12. <https://doi.org/10.1021/jf500160y>

Chang, Y., McLandsborough, L., McClements, D.J. (2013). Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8906– 8913. <https://doi.org/10.1021/jf402147p>

CREM. (2023). Centro Regional de Estadística de Murcia – Portal Estadístico de la Región de Murcia – Agricultura – Estadística Agraria Regional - Consejería de Economía, Hacienda y Empresa. Dirección General de Economía, Estrategia y Contratación Centralizada. Consultada en mayo de 2024. <https://econet.carm.es/web/crem/inicio/-/crem/sicrem/PU590/Indice10.html>

Dáder, B., Magaña, A.J., Pascual-Villalobos, M.J., Moreno, A., Fereres, A., Viñuela, E. (2024). Compatibility of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) with nanoformulations of natural active substances. *Journal of Economic Entomology* toae201, 11 pp. <https://doi.org/10.1093/jee/toae201>

Dancewicz, K., Gabrys, B., Dams, I. (2008). Enantiospecific effect of pulegone and pulegone-derived lactones on *Myzus persicae* (Sulz.) settling and feeding. *Journal of Chemical Ecology* 34: 530-538. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9448-9>

Dancewicz, K., Sznajder, K., Zaluski, D., Kordan, B., Gabrys, B. (2016). Behavioral sensitivity of *Myzus persicae* to volatile isoprenoids in plant tissues. *Entomol Exp Appl* 160:229-240. <https://doi.org/10.1111/eea.12480>

Dancewicz, K., Szumny, A., Wawrzęńczyk, C., Gabryś, B. (2020). Repellent and antifeedant activities of citral-derived lactones against the peach potato aphid. *International Journal of Molecular Science*, 21: 8029. <https://doi.org/10.3390/ijms21218029>

De Conti, B.F., Bueno, V.H.P., Sampaio, M.V., Sidney, L.A. (2010). Reproduction and fertility life table of three aphid species (Macrosiphini) at different temperaturas. Revista Brasileira de Entomologia 54(4): 654–660 <https://doi.org/10.1590/S0085-56262010000400018>

De la Peña, E. (2024). *Scirtothrips dorsalis* y *S. aurantii* como plagas emergentes en España. Ed. Phytoma España. Nº 359.

Donsi, F., and Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. Journal of Biotechnology, 233: 106–120. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.005>

Douglas, A.E., and van Emden, H.F. (2017). Nutrition and symbiosis. En van Emden, H.F., and Harrington, R. Aphids as Crop Pests. CABI. 115-134.

Duarte, J.L., Amado, J.R., Oliveira, A.E., Cruz, R.A., Ferreira, A.M., Souto, R.N., Falcao, D.Q., Carvalho, J.C., Fernandes, C.P. (2015). Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. Revista Brasileira de Farmacognosia, 25: 189-192. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.02.010>

Ebrahimi, M., Safaralizade, M.H., Valizadegan, O., Amin, B.H.H. (2013). Efficacy of three plant essential oils, *Azadirachta indica* (Adr. Juss.), *Eucalyptus camaldulensis* (Dehn.) and *Laurus nobilis* (L.) on mortality cotton aphids, *Aphis gossypii* Glover (Hem: Aphididae). Archives of Phytopathology and Plant Protection, 46(9): 1093–1101. <https://doi.org/10.1080/03235408.2012.758347>

EPPO. (2024). EPPO Global Database. Consultada en marzo de 2024. <https://gd.eppo.int/>

FAO. (2021). Año Internacional de la Sanidad Vegetal 2020 - Informe final. Proteger las plantas, proteger la vida. Roma, FAO en nombre de la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. <https://doi.org/10.4060/cb7056es>

FAOSTAT. (2024). Estadísticas de la FAO. Consultada en marzo de 2024. <https://www.fao.org/faostat/es/#data>

Favret, C. y Miller, G.L. (2012). AphID. Identification Technology Program, CPHST, PPQ, APHIS, USDA; Fort Collins, CO. Consultada en julio de 2024. <http://AphID.AphidNet.org/>

Ferragut, F., Garzón-Luque, E., Pekas, A. (2013). The invasive spider mite *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) alters community composition and host-plant use of native relatives. *Experimental Applied Acarology*, 60: 321–341. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9645-7>

Font San Ambrosio, M.I., y Alfaro Fernández, A.O. (2015). “El virus de Nueva Delhi” amplía su gama de hospedantes en los cultivos hortícolas españoles. *Hortícolas Transferencia Tecnológica*. Ed. Phytoma España. N° 272; 25-32. [https://www.phytoma.com/images/pdf/272\\_octubre\\_2015\\_HORTICOLAS\\_virus\\_nueva\\_delhi.pdf](https://www.phytoma.com/images/pdf/272_octubre_2015_HORTICOLAS_virus_nueva_delhi.pdf)

Font San Ambrosio, M.I., Alfaro Fernández, A.O., Jordá Gutiérrez, C. (2023). Virosis en cucurbitáceas en los últimos 35 años. Ed. Phytoma España. N° 354; 21-30.

Forbes, A.R. (1969) The morphology and fine structure of the gut of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 36, 1–74.

Frazier, J.L., and Chyb, S. (1995). Use of feeding inhibitors in insect control. En: Chapman, R.F., and de Boer, G. *Regulatory mechanisms in insect feeding*. Ed. Chapman and Hall, New York, 364–381 pp. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1775-7>

Gabrys, B., Dancewicz, K., Halarewicz-Pacan, A., Janusz, E. (2005). Effect of natural monoterpenes on the behavior of the peach potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.). *Breeding for plant resistance to pests and diseases*. IOBC-WPRS Bulletin 28(10): 29–34

García Marí, F. y Ferragut Pérez, F. (2020). *Plagas agrícolas*. Phytoma. 495 pp.

Garzo, E., Álvarez, A.J., Moreno, A., Walker, G.P., Tjallingii, W.F., Fereres, A. (2024) Novel program for automatic calculation of EPG variables. *Journal of Insect Science*, 24(3). 12 pp. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieae063>

- Girardi, J., Berke-Łubinska, K., Mežaka, I., Nakurte, I., Skudriņš, G., Pastare, L. (2023). In vivo bioassay of the repellent activity of caraway essential oil against green peach aphid. *Insects*, 14, 876. 17 pp. <https://doi.org/10.3390/insects14110876>
- Grainge, M., and Ahmed, S. (1988). Handbook of plants with pest control properties. John Wiley & Sons, Nueva York. 470 pp.
- Guerrero, M.M., Lacasa, A., Torres, J., Martínez, M.C., Lacasa, C.M., Martínez, V. (2021). Evolución del control de *Phytophthora* sp. y fatiga del suelo en cultivos de pimiento en invernadero en el Campo de Cartagena. *Phytoma*, 327: 87-90.
- 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).
- Gulotta, A., Saberi, A.H., Nicoli, M.C., McClements, D.J. (2014). Nano-emulsion-based delivery systems for polyunsaturated ( $\omega$ -3) oils: formation using a spontaneous emulsification method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7): 1720-1725. <https://doi.org/10.1021/jf4054808>
- Gutierrez, C., Fereres, A., Reina, M., Cabrera, R., Gonzalez-Coloma, A. (1997). Behavioral and sublethal effects of structurally related lower terpenes on *Myzus persicae*. *Journal of Chemical Ecology* 23:1641–1650. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006428.00568.c5>
- Halarewicz-Pacan, A., Gabrys, B., Dancewicz, K., Wawrzenczyk, C. (2003). Enantiospecific effect of limonene and limonene-derived bicyclic lactones on settling and probing behaviour of the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.). *Journal of Plant Protection Research* 43(2): 133–142
- 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: 303-307. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00300.x>

Hardie, J. (2017). Life cycles and polyphenism. En van Emden, H.F., and Harrington, R. Aphids as Crop Pests. CABI. 81-97 pp.

Hazra, D.K. (2017). Nano-formulations: high definition liquid engineering of pesticides for advanced crop protection in agriculture. *Advances in Plants and Agriculture Research*, 6(3): 56-57. <https://doi.org/10.15406/apar.2017.06.00211>

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: 6667–6679. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07332-y>

Hu, Q., Gerhard, H., Upadhyaya, I., Venkitanarayanan, K., Luo, Y. (2016). Antimicrobial eugenol nanoemulsion prepared by gum Arabic and lecithin and evaluation of drying technologies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87: 130-140. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.051>

Hull, R. (2002). *Matthews' Plant Virology*. Fourth edition. Elsevier Academic Press, NY. 1001 pp.

Ibrahim, S.S. (2020). Essential oil nanoformulations as a novel method for insect pest control in horticulture. *Horticultural Crops*, 195-209. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80747>

Irwin, M.E., Kampmeier, G.E., Weisser, W.W. (2017). Aphid Movement: Process and Consequences. En van Emden, H.F., and Harrington, R. Aphids as Crop Pests. CABI. 153-186 pp.

Isman, M.B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19: 603–608. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00079-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00079-X)

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>

Jaudenes Piferrer, S. (2021). Calendario de siembra, recolección y comercialización 2014-2016 Región de Murcia. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 16 pp.

[https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/14-murcia\\_tcm30-514199.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/14-murcia_tcm30-514199.pdf)

Juárez, M., Truniger, V., Aranda, M.A. (2004). First report of *Cucurbit aphid-borne yellows virus* in Spain. Plant Disease 88(8): 907-907.

<https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.8.907A>

Juárez, M., Kassem, M.A., Sempere, R.N., Gómez, P., Mengual, C.M., Aranda, M.A. (2013). Virus de cucurbitáceas en el sureste español: viejos conocidos y nuevas amenazas. Ed. Phytoma España. Nº 251: 31-36.

Kalaitzaki, A., Papanikolaou, N.E., Karamaouna, F., Dourtoglou, V., Xenakis, A., Papadimitriou, V. (2015). Biocompatible colloidal dispersions as potential formulations of natural pyrethrins: a structural and efficacy study. Langmuir, 31(21): 5722-5730.

<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00246>

Katis, N.I., Tsitsipis, J.A., Stevens, M., Powell, G. (2017). Transmission of plant viruses. En van Emden, H.F., and Harrington, R. Aphids as Crop Pests. CABI. 353-390 pp.

Kennedy, J.S., Day, M.F., Eastop, V.F. (1962). A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. Commonwealth Institute of Entomology, Commonwealth Agricultural Bureaux Executive Council. The Eastern Press Ltd. London, UK. 114 pp.

Kennedy, J.S., and Thomas, A.A.G. (1974). Behaviour of some low-flying aphids in wind. Annals of Applied Biology 76, 143–159. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1974.tb07968.x>

Kirişik, M., Çınar, O., Erler, F. (2024). Comparative fumigant and contact toxicities of single, binary and tertiary combinations of three plant essential oils against *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). Journal of Plant Diseases and Protection 131, 413–421. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00846-1>

- Koorki, Z., Shahidi-Noghabi, S., Mahdian, K., Pirmaoradi, M. (2018). Chemical composition and insecticidal properties of several plant essential oils on the melon aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). Journal of Essential Oil Bearing Plants, 21(2): 420–429. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1435308>
- Koul, O., Walia, S., Dhaliwal, G.S., (2008). Essential oils as green pesticides: potential and constraints. Biopesticides. International, 4: 63–84.
- Lacasa, A. (2021). Factores que motivaron el desarrollo del control biológico en el cultivo de pimiento en invernadero en la Región de Murcia. Phytoma, 327: 15-22.
- Lacasa, A., Lorca, M., Martínez, M.C., Bielza, P., Guirao, P. (2019). *Thrips parvispinus* (Karny, 1922), un nuevo trips en cultivos de plantas ornamentales. Phytoma, 311: 62-69. [https://www.phytoma.com/images/pdf/2019/311\\_TT\\_ornamentales\\_thrips\\_parvispinus.pdf](https://www.phytoma.com/images/pdf/2019/311_TT_ornamentales_thrips_parvispinus.pdf)
- Lacasa, C.M., Martínez, V., Martínez, M.C., Lacasa, A., Tello, J.C. (2013). *Phytophthora* en los invernaderos de pimiento del campo de Cartagena (Murcia). Ed. AE. Revista Agroecológica de Divulgación. Nº 12. 18-19 pp.
- Lacotte, V., Rey, M., Peigner, S., Mercier, P.E., Rahioui, I., Sivignon, C., Razy, L., Benhamou, S., Livi, S., da Silva, P. (2023). Bio-activity and chemical composition of forty plant essential oils against the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* revealed pep-permint oil as a promising biorepellent. Industrial Crops and Products, 197: 116610. 13 pp. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116610>
- Lenth, R.V. (2022) emmeans: estimated marginal means, aka least- squares means. R package version 1.8.3. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>.
- Li, J., Chang, J.W., Saenger, M., Deering, A. (2017). Thymol nanoemulsions formed via spontaneous emulsification: Physical and antimicrobial properties. Food Chemistry, 232: 191-197. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.147>

Lin, H., Zhou, H., Xu, L., Zhu, H., Huang, H. (2016). Effect of surfactant concentration on the spreading properties of pesticide droplets on Eucalyptus leaves. *Biosystems Engineering*, 143: 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.01.003>

López, M.D., and Pascual-Villalobos, M.J. (2010). Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control, *Industrial Crops and Products*, 31(2): 284-288. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.11.005>.

López Marín, J., Angosto, J.L., González, A. (2017). El cultivo de pimientos en invernadero y al aire libre. El caso del Campo de Cartagena. Ed. Biblioteca Horticultura. 60 pp.

López Santos-Olmo, M., Martín, F., Fereres, A., Casas, J.L., Marcos-García, M.A., Pascual-Villalobos, M.J., Garzo, E. (2024). Insecticidas naturales: toxicidad y efecto en el comportamiento alimentario de *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Comunicación oral presentada en el XIII Congreso Nacional de Entomología Aplicada – XIX Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Entomología Aplicada (SEEA), Gijón, España (7-11 octubre de 2024).

MAPA. (2024a). Anuario de Estadística Agraria. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Consultada en marzo de 2024.

<https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2023/default.aspx>

MAPA. (2024b). Registro oficial de productos fitosanitarios. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Consultada en marzo de 2024.

<https://servicio.mapa.gob.es/regfiweb>

Marcos-García, M.A., López-Santos-Olmo, M., Casas, J.L., Ndiribe, C. (2024). Efecto de aceites esenciales sobre *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) y su depredador *Sphaerophoria rueppellii* (Diptera: Syrphidae). Comunicación póster presentado en el XIII Congreso Nacional de Entomología Aplicada – XIX Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Entomología Aplicada (SEEA), Gijón, España (7-11 octubre de 2024).

Maroto Borrego, J.V. (2002). Horticultura herbácea especial. 5ªed. Mundi-Prensa. 702 pp.

Maroto Borrego, J.V., Pascual España, B., Borrego Pitarch, V. (1995). Enfermedades de las hortalizas. Ed. Mundi-Prensa. 576 pp.

Martín Gil, A., Trujillo Giménez, E., Alcázar Alba, M.D. (2021). Guía de Gestión Integrada de Plagas. Solanáceas. Berenjena, Pimiento y Tomate. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 242 pp.

[https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/solanaceas\\_web\\_metadatos\\_v03\\_protegida\\_tcm30-576872.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/solanaceas_web_metadatos_v03_protegida_tcm30-576872.pdf)

Martín Pérez, F., Pascual-Villalobos, M.J., Guirao, P., Kenar, J.A., Cermak, S.C. (2021). Setting up preliminary tests to prove the effect of coconut fatty acid as an aphid repellent in pepper. In 32<sup>nd</sup> Annual Meeting AAIC, Bologna, Italy (5-8 September 2021).

McClements, D.J., (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences and similarities. *Soft Matter* 8, 1719–1729.

<https://doi.org/10.1039/C2SM06903B>

McLean, D.L., and Kinsey, M.G. (1964). A technique for electrically recording aphid feeding and salivation. *Nature*, London 205, 1130–1131.

<https://doi.org/10.1038/2021358a0>

Melgarejo Nardiz, P., García-Jiménez, J., Jordá Gutiérrez, M.C., López González, M.M., Andrés Yebes, M.F., Duran-Vila, N. (2010). Patógenos de plantas descritos en España. 2ª Ed. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Sociedad Española de Fitopatología. 858 pp.

[https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/publicaciones/patogenos%20final\\_tcm30-57872.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/publicaciones/patogenos%20final_tcm30-57872.pdf)

Miles, P.W. (1999). Aphid saliva. *Biological Reviews*, 74: 41–85.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1999.tb00181.x>

Mirgorodskaya, A.M., Kushnazarova, R., Lukashenko, S.S., Nikitin, E.N., Sinyashin, K.O., Nesterova, L.M., Zakharova, L.Y. (2020). Carbamate-bearing surfactants as

effective adjuvants promoted the penetration of the herbicide into the plant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 586: 124252. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.124252>

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

Moreno Lozano, A. (2005). Incidencia y dispersión de virus transmitidos por pulgones en hortalizas de invierno y sus relaciones virus-vector. (Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid). 227 pp. <https://doi.org/10.20868/UPM.thesis.208>

Mustafa, I.F. y Hussein, M.Z. (2020). Synthesis and technology of nanoemulsion-based pesticide formulation. *Nanomaterials*, 10: 1608. <https://doi.org/10.3390/nano10081608>

Nault, L.R. (1997). Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis, *Annals of the Entomological Society of America*, 90(5): 521–541. <https://doi.org/10.1093/aesa/90.5.521>

Nguyen, M.H., Hwang, I.C., Park, H.J. (2013). Enhanced photoprotection for photo-labile compounds using double-layer coated corn oil-nanoemulsions with chitosan and lignosulfonate. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 125: 194-201. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.06.009>

Niedobova, J., Skalsky, M., Ourednickova, J., Michalko, R., Bartoskova, A. (2019). Synergistic effects of glyphosate formulation herbicide and tank-mixing adjuvants on *Pardosa* spiders. *Environmental Pollution*, 249: 338-344. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.031>

Nirmala, M.J., Dhas, S.P., Saikrishna, N., Raj, U.S., Sai, P.S., Nagarajan, R. (2022). Green nanoemulsions: Components, formulation, techniques of characterization, and applications. En: Abd-Elsalam, K.A., Murugan, K. *Bio-Based Nanoemulsions for Agri-Food Applications*. Ed. Elsevier, 47-69 pp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89846-1.00013-9>

Nollet, L.M.L., and Rathore, H.S. (2017). Green pesticides handbook: essential oils for pest control. CRC Press, Boca Raton, 571 pp. <https://doi.org/10.1201/9781315153131>

Nuez Viñals, F., Costa García, J.C., Gil Ortega, R. (1996). El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Ed. Mundi-Prensa. 607 pp.

Osanloo, M., Amani, A., Sereshti, H., Abai, M.R., Esmaceli, F., Sedaghat, M.M. (2017). Preparation and optimization nanoemulsion of Tarragon (*Artemisia dracunculus*) essential oil as effective herbal larvicide against *Anopheles stephensi*. Industrial Crops and Products, 109: 214-219. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.037>

Pascual-Villalobos, M.J., Canto-Tejero, M., Vallejo, R., Guirao, P., Rodriguez-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., Diaz-Baños, F.G., Canto-Tejero, M., Villora, G. (2019). Oil in water nanoemulsion formulations of botanical active substances. En: Koul, O. Nano-biopesticides today and future perspectives. Ed. Elsevier Academic Press, San Diego, 223-247 pp. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-03028-8>

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. 11 pp. <https://doi.org/10.3390/plants9010124>

Pascual-Villalobos, M.J., Martín, F., Quilez, M., Lózano-Pérez, A.A., Guirao, P. (2024). Nanoformulaciones de compuestos de origen botánico y efectos repelentes en alados de *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Comunicación oral presentada en el XIII Congreso Nacional de Entomología Aplicada – XIX Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Entomología Aplicada (SEEA), Gijón, España (7-11 octubre de 2024).

Pavoni, L., Benelli, G., Maggi, F., Bonacucina, G. (2019). Green nanoemulsion interventions for biopesticide formulations. En Koul, O. Nano-biopesticides today and

future perspectives. Ed. Elsevier Academic Press, San Diego. 133-160 pp.  
<https://doi.org/10.1016/C2017-0-03028-8>

Pérez, P., Gimeno, C., Verdugo, M., Soto, M.S., Ponz, F., Ferreres, A. (1992). Dinámica de poblaciones de vectores y transmisión del virus Y de la patata en los cultivos de pimiento. Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas 18: 225–235.  
<https://repositori.udl.cat/server/api/core/bitstreams/65ac56e4-193b-4ab9-aa74-b15f7c206c8e/content>

Pérez Hernández, F., Martínez Vicente, D., Barba Martínez, E., Carmona Cabrera, A., Portillo Muñoz, J.M., Esteban Palazón, J. (2023). Estadística Agraria de Murcia 2021/22. Ed. Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. Consejería de Agua, Agricultura, Ganadería y Pesca. 181 pp.  
[https://www.carm.es/web/descarga?ARCHIVO=TEXTO%20ESTAD%20C3%8DSTICA%20AGRARIA%20DE%20MURCIA2021-2022.pdf&ALIAS=ARCH&IDCONTENIDO=187357&RASTRO=c1415\\$m1174,72273](https://www.carm.es/web/descarga?ARCHIVO=TEXTO%20ESTAD%20C3%8DSTICA%20AGRARIA%20DE%20MURCIA2021-2022.pdf&ALIAS=ARCH&IDCONTENIDO=187357&RASTRO=c1415$m1174,72273)

Pettersson, J., Tjallingii, W.F., Hardie, J. (2017). Host-plant Selection and Feeding. En van Emden, H.F., and Harrington, R. Aphids as Crop Pests. CABI. 87-113.

Philògene, B.J.R., Regnault-Roger, C., Vincent, C. (2004). Productos fitosanitarios insecticidas de origen vegetal: promesas de ayer y hoy. En Regnault-Roger, C., Philògene B.J.R., Vincent, C. Biopesticidas de origen vegetal. Ediciones Mundi-Prensa. 1-18 pp.

Pickett, J.A., Bruce T.B.A., Glinwood, R.T. (2017). Chemical Ecology. En van Emden, H.F., and Harrington, R. Aphids as Crop Pests. CABI. 235-260.

Power, A.G. (2000). Insect transmisión of plant viruses: a constraint on virus variability. Current Opinion in Plant Biology 3: 336-340. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00090-X)

Prado, E. and Tjallingii, W.F. (2007) Behavioural evidence for local reduction of aphid-induced resistance. Journal of Insect Science, 7(1). 8pp.  
<https://doi.org/10.1673/031.007.4801>

PubChem. (2024). National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine. Consultada en julio de 2024. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Quin, H., Zhou, X., Gu, D., Li, L., Kan, C. (2019). Preparation and characterization of a novel waterborne lambda-cyhalothrin/alkyd nanoemulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(38): 10587-10594. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03681>

Quisenberry, S.S., and Ni, X. (2017). Feeding injury. En van Emden, H.F., and Harrington, R. *Aphids as Crop Pests*. CABI. 331-352.

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

Rathore, H.S. (2017). Green pesticides for organic farming: occurrence and properties of essential oils for use in pest control. En: Nollet, L.M.L., and Rathore, H.S. *Green pesticides handbook: essential oils for pest control*. CRC Press, Boca Raton, 3–25 pp. <https://doi.org/10.1201/9781315153131>

Reche Mármol, J. (2008). Cultivo del melón en invernadero. Ed. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Secretaría General Técnica. Servicio de Publicaciones y Divulgación. 312 pp. [https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/1337161080melon\\_baja.pdf](https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/1337161080melon_baja.pdf)

Reche Mármol, J. (2010). Cultivo del pimiento dulce en invernadero. Ed. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Secretaría General Técnica. Servicio de Publicaciones y Divulgación. 294 pp. [https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/1337160265Cultivo\\_Pimiento\\_Invernadero.pdf](https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/1337160265Cultivo_Pimiento_Invernadero.pdf)

Regnault-Roger, C. (2004). ¿Nuevos fitoinsecticidas para el tercer milenio? En Regnault-Roger, C., Philògene B.J.R., Vincent, C. *Biopesticidas de origen vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa. 19-40 pp.

Remaudiere, G., Remaudiere, M. (1997). Catalogue des aphididae du monde/Catalogue of the world's aphididae (Homoptera, Aphidoidea), INRA Editions (Collection Techniques et Pratiques), Paris, 475 pp.

Rodríguez-Rojo, S., Varona, S., Núñez, M., Cocero, M.J. (2012) Characterization of rosemary essential oil for biodegradable emulsions. Industrial Crops and Products 37: 137–40. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.11.026>

Romero Cuadrado, C. (2023). Guía de Gestión Integrada de Plagas. Cucurbitáceas. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 224 pp.  
[https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/cucurbitaceas\\_web\\_metadatos\\_protegida\\_tcm30-656830.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/cucurbitaceas_web_metadatos_protegida_tcm30-656830.pdf)

Ros Ibáñez, C., Martínez Alarcón, V., Lacasa Martínez, C., Esteban López, A., Hernández Colucho, M.A., Lacasa Plasencia, A. (2021). Manejo de *Meloidogyne* sp. en los cultivos de pimiento bajo invernadero del sueste español. Phytoma, 327: 79-83.

Santos, J., Trujillo-Cayado, L.A., Calero, N., Alfaro, M.C., Muñoz, J. (2016). Development of eco-friendly emulsions produced by microfluidization technique. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 36: 90-95.  
<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.01.024>

Sarria, E., Cid, M., Garzo, E., Fereres, A. (2009) Excel workbook for automatic parameter calculation of EPG data. Comput Electron Agric 67:35–42.  
<https://doi.org/10.1016/j.compag.2009.02.006>

Sharma, S., Loach, N., Gupta, S., Mohan, L. (2020). Phyto-nanoemulsion: An emerging nano-insecticidal formulation. Phyto-nanoemulsion: An emerging nano-insecticidal formulation, 14: 100331. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100331>

Singh, I.R. y Pulikkal, A.K. (2022). Preparation, stability and biological activity of essential oil-based nano emulsions: A comprehensive review. OpenNano, 8: 100066.  
<https://doi.org/10.1016/j.onano.2022.100066>

- Spiller, N.J., Koenders, L., Tjallingii, W.F. (1990). Xylem ingestion by aphids – a strategy for maintaining water balance. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 55, 101–104. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1990.tb01352.x>
- Sugumar, S., Singh, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2016). Nanoemulsion of orange oil with non ionic surfactant produced emulsion using ultrasonication technique: evaluating against food spoilage yeast. *Applied Nanoscience*, 6: 113–120. <https://doi.org/10.1007/s13204-015-0412-z>
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, C., (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 108–109: 303–318. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>
- Tjallingii, W.F. (1985) Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by aphid stylets. *Entomol Exp Appl* 38:187–193. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1985.tb03517.x>
- Tjallingii, W.F. (1995). Regulation of phloem sap feeding by aphids. En: Chapman, R.F. and de Boer, G. *Regulatory mechanisms in insect feeding*. Ed. Chapman and Hall, New York, 190–209 pp. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1775-7>
- Tjallingii, W.F. (2006) Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *Journal of Experimental Botany* 57, 739–745. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj088>
- Tjallingii, F. (2023) EPG systems. Measuring principles. Consultada en marzo de 2023. <https://www.epgsystems.eu/>
- Tjallingii, W.F. and Hogen Esch, T.H. (1993) Fine structure of aphid stylet routes in plant tissue in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology* 18, 317–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1993.tb00604.x>
- Turek, C., and Stintzing, F.C. (2013). Stability of essential oils: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 12: 40-53. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>

- Wang, L., Dong, J., Chen, J., Eastoe, J., Li, X. (2009). Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system. *Journal of Colloid and Interface Science*, 330: 443-448. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.10.077>
- Wang, X., Zhang, Y., Yuan, H., Lu, Y. (2024). Effects of seven plant essential oils on the growth, development and feeding behavior of the wingless *Aphis gossypii* Glover. *Plants*, 13(7):916. <https://doi.org/10.3390/plants13070916>
- Wensler, R. (1962). Mode of host selection by an aphid. *Nature*, London 195, 830–831. <https://doi.org/10.1038/195830b0>
- Wensler, R.J., and Filshie, B.K. (1969). Gustatory sense organs in the food canal of aphids. *Journal of Morphology* 129, 473–492. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051290406>
- Werrie, P.Y., Durenne, B., Delaplace, P., Fauconnier, M.L. (2020) Phytotoxicity of essential oils: opportunities and constraints for the development of biopesticides. A Review. *Foods*, 9(9): 1291. <https://doi.org/10.3390/foods9091291>
- Wong, C.L. y Coats, J.R. (2018). Movement of thymol in citrus plants. En: Beck, J.J., Rering, C.C., Duke, S.O. (eds). *Roles of natural products for biorational pesticides in agricultura*. American Chemical Society, Washington, 175 pp. <http://dx.doi.org/10.1021/bk-2018-1294.ch004>
- Wooster, T.J., Golding, M., Sanguansri, P., (2008). Impact of oil type on nanoemulsion formation and ostwald ripening stability. *Langmuir*, 24: 12758–12765. <https://doi.org/10.1021/la801685v>
- Wroblewska-Kurdyk, A., Danciewicz, K., Gliszczynska, A., Gabrys, B. (2020). New insight into the behaviour modifying activity of two natural sesquiterpenoids farnesol and nerolidol towards *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*, 110(2): 249-258. <https://doi.org/10.1017/S0007485319000609>.
- Wu, J.E., Lin, J., Zhong, Q. (2014). Physical and antimicrobial characteristics of thyme oil emulsified with soluble soybean polysaccharide. *Food Hydrocolloids*, 39: 144-150. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.029>

Zhou, H., Chen, L., Liu, Y., Chen, J., Francis, F. (2016). Use of slow-release plant infochemicals to control aphids: a first investigation in a Belgian wheat field. *Scientific Reports*, 6: 31552. <https://doi.org/10.1038/srep31552>

Zhu, J.J., Cermak, S.C., Kenar, J.A., Brewer, G., Haynes, K.F., Boxler, D., Bajer, P.D., Wang, D., Wang, C., Li, A.Y., Xue, R., Shen, Y., Wang, F., Agramonte, N.M., Bernier, U.R., de Oliveira Filho, J.G., Borges, L.M.F., Friesen, K., Taylor, D.B. (2018). Better than DEET repellent compounds derived from coconut oil. *Scientific Reports*, 8: 14053, 12 pp. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32373-7>

Ziani, K., Fang, Y., McClements, D.J. (2012). Fabrication and stability of colloidal delivery systems for flavor oils: Effect of composition and storage conditions. *Food Research International*, 46 (1): 209-216. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.017>

## **9. Anejos**

Anejo 1. Número medio de eventos de forma de onda para cada pulgón en su planta. Variables EPG secuenciales y no secuenciales.

|                                            |                                       |       |        |       |         | Tratamientos <sup>a</sup> |                        |            |                 |       |                 |          |                 |                           |                 |             |                |
|--------------------------------------------|---------------------------------------|-------|--------|-------|---------|---------------------------|------------------------|------------|-----------------|-------|-----------------|----------|-----------------|---------------------------|-----------------|-------------|----------------|
|                                            |                                       |       |        |       |         | Agua                      |                        | (E)-anetol |                 | Anis  |                 | Farnesol |                 | Aceite destilado de limón |                 | Sulfoxaflor |                |
| Variables EPG no secuenciales <sup>b</sup> | Pulgón / Planta                       | F     | H      | gl    | P-valor | PPW                       | MEAN ± SE <sup>c</sup> | PPW        | MEAN ± SE       | PPW   | MEAN ± SE       | PPW      | MEAN ± SE       | PPW                       | MEAN ± SE       | PPW         | MEAN ± SE      |
| Np                                         | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   | 0.331 |        | 5;115 | 0.893   | 20/20                     | 20.05 ± 2.76           | 20/20      | 19.20 ± 2.77    | 21/21 | 20.00 ± 2.64    | 20/20    | 19.50 ± 2.76    | 20/20                     | 20.80 ± 3.29    | 20/20       | 24.50 ± 3.47   |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> | 4.952 |        | 5;125 | 0.000   | 21/21                     | 21.81 ± 2.31 a         | 22/22      | 22.32 ± 2.71 a  | 21/21 | 23.95 ± 3.40 a  | 22/22    | 25.59 ± 2.96 a  | 22/22                     | 30.09 ± 3.78 a  | 23/23       | 11.78 ± 1.25 b |
| Prueba                                     | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   | 0.205 |        | 5;115 | 0.960   | 20/20                     | 20.00 ± 2.75           | 20/20      | 19.20 ± 2.77    | 21/21 | 19.95 ± 2.63    | 20/20    | 19.45 ± 2.74    | 20/20                     | 20.70 ± 3.26    | 20/20       | 23.65 ± 3.49   |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> | 5.879 |        | 5;125 | 0.000   | 21/21                     | 21.76 ± 2.31 a         | 22/22      | 22.23 ± 2.69 a  | 21/21 | 23.86 ± 3.39 a  | 22/22    | 25.36 ± 2.92 a  | 22/22                     | 29.95 ± 3.78 a  | 23/23       | 10.78 ± 1.25 b |
| C                                          | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   | 0.145 |        | 5;115 | 0.981   | 20/20                     | 21.75 ± 2.99           | 20/20      | 20.70 ± 2.79    | 21/21 | 21.24 ± 2.76    | 20/20    | 21.15 ± 2.98    | 20/20                     | 22.25 ± 3.35    | 20/20       | 24.65 ± 3.49   |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> | 8.167 |        | 5;125 | 0.000   | 21/21                     | 26.76 ± 2.96 a         | 22/22      | 27.32 ± 2.96 a  | 21/21 | 27.76 ± 3.49 a  | 22/22    | 29.27 ± 2.97 a  | 22/22                     | 34.82 ± 3.89 a  | 23/23       | 11.61 ± 1.29 b |
| E1                                         | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |       | 15.991 | 5     | 0.007   | 17/20                     | 2.15 ± 0.46 a          | 19/20      | 2.45 ± 0.42 a   | 19/21 | 1.76 ± 0.41 a   | 19/20    | 2.85 ± 1.09 a   | 17/20                     | 2.25 ± 0.46 a   | 10/20       | 0.90 ± 0.31 b  |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> |       | 44.400 | 5     | 0.000   | 21/21                     | 17.86 ± 4.35 a         | 22/22      | 15.41 ± 5.39 a  | 21/21 | 9.43 ± 1.39 a   | 21/22    | 9.55 ± 2.03 a   | 20/22                     | 28.59 ± 10.35 a | 11/23       | 1.13 ± 0.31 b  |
| E2                                         | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |       | 10.906 | 5     | 0.053   | 13/20                     | 1.15 ± 0.27            | 18/20      | 1.75 ± 0.36     | 14/21 | 1.09 ± 0.32     | 17/20    | 1.75 ± 0.67     | 16/20                     | 1.45 ± 0.27     | 10/20       | 0.65 ± 0.18    |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> |       | 44.136 | 5     | 0.000   | 20/21                     | 13.34 ± 3.94 a         | 20/22      | 10.86 ± 5.19 a  | 21/21 | 6.14 ± 1.41 a   | 20/22    | 6.18 ± 1.87 a   | 18/22                     | 24.23 ± 9.91 a  | 6/23        | 0.35 ± 0.13 b  |
| E2 (t > 10 min)                            | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |       | 10.275 | 5     | 0.068   | 10/20                     | 0.65 ± 0.17            | 15/20      | 1.15 ± 0.25     | 13/21 | 0.76 ± 0.17     | 15/20    | 0.85 ± 0.15     | 12/20                     | 0.65 ± 0.13     | 7/20        | 0.35 ± 0.11    |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> |       | 39.379 | 5     | 0.000   | 19/21                     | 2.24 ± 0.28 a          | 18/22      | 1.86 ± 0.30 a   | 18/21 | 2.52 ± 0.50 a   | 17/22    | 1.50 ± 0.28 a   | 16/22                     | 1.95 ± 0.41 a   | 2/23        | 0.09 ± 0.06 b  |
| G                                          | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |       | 5.737  | 5     | 0.333   | 5/20                      | 0.25 ± 0.09            | 1/20       | 0.05 ± NA       | 6/21  | 0.38 ± 0.15     | 6/20     | 0.35 ± 0.13     | 5/20                      | 0.30 ± 0.13     | 3/20        | 0.15 ± 0.08    |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> |       | 16.354 | 5     | 0.006   | 5/21                      | 0.24 ± 0.09 bc         | 7/22       | 0.36 ± 0.12 ab  | 7/21  | 0.48 ± 0.18 ab  | 6/22     | 0.36 ± 0.14 ab  | 12/22                     | 0.59 ± 0.13 a   | 0/23        | 0.00 ± 0.00 c  |
| Variables EPG secuenciales                 |                                       |       |        |       |         |                           |                        |            |                 |       |                 |          |                 |                           |                 |             |                |
| Pruebas hasta 1ª E                         | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   | 0.434 |        | 5;115 | 0.824   | 17/20                     | 13.85 ± 1.67           | 19/20      | 14.85 ± 2.15    | 19/21 | 15.67 ± 2.32    | 19/20    | 17.85 ± 2.46    | 17/20                     | 17.00 ± 3.06    | 10/20       | 20.15 ± 3.85   |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> | 2.491 |        | 5;125 | 0.034   | 21/21                     | 12.24 ± 1.83 ab        | 22/22      | 11.36 ± 2.14 ab | 21/21 | 15.38 ± 3.33 ab | 21/22    | 12.59 ± 2.44 ab | 20/22                     | 20.86 ± 3.67 a  | 11/23       | 8.30 ± 1.21 b  |
| Pruebas despues de 1ª E                    | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |       | 10.346 | 5     | 0.066   | 12/20                     | 7.24 ± 1.77            | 10/20      | 4.58 ± 1.52     | 6/21  | 4.74 ± 2.09     | 4/20     | 1.68 ± 0.87     | 11/20                     | 4.35 ± 1.57     | 5/20        | 7.00 ± 2.79    |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> | 1.008 |        | 5;110 | 0.416   | 15/21                     | 9.52 ± 2.21            | 19/22      | 10.86 ± 2.37    | 16/21 | 8.48 ± 1.85     | 18/22    | 13.38 ± 2.57    | 18/22                     | 10.00 ± 2.21    | 8/23        | 5.18 ± 1.54    |

<sup>a</sup> Los compuestos bioactivos se aplicaron a una dosis del 0,2% con Tween80® (1:2) como nanoemulsión en agua. Sulfoxaflor se aplicó a una dosis de 24 mg i.a./L diluido en agua.

<sup>b</sup> np = sin prueba. Prueba = contacto del estilete con cualquier tejido vegetal (C, E1, E2 y G). C = estilete entre la epidermis y el mesófilo. E1 = salivación al inicio de la fase del floema. E2 = ingestión pasiva de savia del floema. E2 (t > 10 min) = ingestión de savia del floema con una duración superior a 10 minutos. G = ingestión activa de savia de xilema.

<sup>c</sup> F = estadístico F del ANOVA de aquellas variables cuyos residuos tienen una distribución aproximadamente normal y son homocedásticos, se han utilizado las transformaciones sqrt(x+0.5) y ln(x+1) según ha sido necesario. H = Estadístico de la prueba de Kruskal-Wallis de las variables cuyos residuos no siguen una distribución normal y/o no son homocedásticos. gl = grados de libertad. p-valor = Probabilidad de F o H. PPW = proporción de individuos que produjeron una forma de onda específica. MEAN ± SE = Media ± error estándar de la media de los datos no transformados. Letras diferentes dentro de una fila indican diferencias significativas entre los tratamientos con un p valor ≤ 0,05 utilizando la comparación de medias de la prueba de Tukey en ANOVA o la prueba de Dunn en Kruskal-Wallis.

Anejo 2. Duración total promedio de la forma de onda (tiempo en minutos) para cada insecto. Variables EPG no secuenciales.

|                                            |                                       |        |        |       |         | Tratamientos <sup>a</sup> |                        |            |                   |       |                   |          |                   |                           |                  |             |                  |
|--------------------------------------------|---------------------------------------|--------|--------|-------|---------|---------------------------|------------------------|------------|-------------------|-------|-------------------|----------|-------------------|---------------------------|------------------|-------------|------------------|
|                                            |                                       |        |        |       |         | Agua                      |                        | (E)-anetol |                   | Anis  |                   | Farnesol |                   | Aceite destilado de limón |                  | Sulfoxaflor |                  |
| Variables EPG no secuenciales <sup>b</sup> | Pulgón / Planta                       | F      | H      | gl    | p-valor | PPW                       | MEAN ± SE <sup>c</sup> | PPW        | MEAN ± SE         | PPW   | MEAN ± SE         | PPW      | MEAN ± SE         | PPW                       | MEAN ± SE        | PPW         | MEAN ± SE        |
| Np                                         | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |        | 32.446 | 5     | 0.000   | 20/20                     | 67.77 ± 12.47 b        | 20/20      | 55.43 ± 7.19 b    | 21/21 | 66.94 ± 10.83 b   | 20/20    | 54.06 ± 9.21 b    | 20/20                     | 59.56 ± 13.22 b  | 20/20       | 249.66 ± 28.98 a |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> |        | 62.005 | 5     | 0.000   | 21/21                     | 47.05 ± 5.76 c         | 22/22      | 61.00 ± 9.91 bc   | 21/21 | 78.75 ± 13.94 bc  | 22/22    | 99.68 ± 19.07 bc  | 22/22                     | 100.53 ± 14.73 b | 23/23       | 398.36 ± 13.49 a |
| Prueba                                     | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |        | 32.446 | 5     | 0.000   | 20/20                     | 412.23 ± 12.47 a       | 20/20      | 424.57 ± 7.19 a   | 21/21 | 413.06 ± 10.83 a  | 20/20    | 425.94 ± 9.21 a   | 20/20                     | 420.44 ± 13.22 a | 20/20       | 230.34 ± 28.98 b |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> |        | 62.005 | 5     | 0.000   | 21/21                     | 432.95 ± 5.76 a        | 22/22      | 419.00 ± 9.91 ab  | 21/21 | 401.25 ± 13.94 ab | 22/22    | 380.32 ± 19.07 ab | 22/22                     | 379.47 ± 14.73 b | 23/23       | 81.64 ± 13.49 c  |
| C                                          | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   | 0.269  |        | 5;115 | 0.929   | 20/20                     | 250.44 ± 26.63         | 20/20      | 237.01 ± 26.75    | 21/21 | 228.45 ± 26.38    | 20/20    | 228.35 ± 29.03    | 20/20                     | 246.10 ± 29.89   | 20/20       | 209.97 ± 29.44   |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> | 10.031 |        | 5;125 | 0.000   | 21/21                     | 177.39 ± 19.04 a       | 22/22      | 182.52 ± 17.10 a  | 21/21 | 161.38 ± 15.85 a  | 22/22    | 153.49 ± 17.28 a  | 22/22                     | 206.03 ± 17.47 a | 23/23       | 76.25 ± 13.54 b  |
| E1                                         | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |        | 16.055 | 5     | 0.007   | 17/20                     | 3.01 ± 0.92 a          | 19/20      | 3.49 ± 1.13 a     | 19/21 | 1.75 ± 0.49 a     | 19/20    | 6.38 ± 2.71 a     | 17/20                     | 10.45 ± 6.25 a   | 10/20       | 0.97 ± 0.40 b    |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> | 9.350  |        | 5;125 | 0.000   | 21/21                     | 19.42 ± 2.99 a         | 22/22      | 19.28 ± 3.51 a    | 21/21 | 15.00 ± 3.29 a    | 21/22    | 20.05 ± 4.29 a    | 20/22                     | 22.23 ± 3.79 a   | 11/23       | 2.83 ± 0.89 b    |
| E2                                         | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |        | 18.079 | 5     | 0.003   | 13/20                     | 107.01 ± 28.86 a       | 18/20      | 172.17 ± 29.22 a  | 14/21 | 149.27 ± 33.57 a  | 17/20    | 166.46 ± 34.57 a  | 16/20                     | 144.74 ± 36.80 a | 10/20       | 11.03 ± 3.62 b   |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> |        | 48.543 | 5     | 0.000   | 20/21                     | 210.39 ± 27.34 a       | 20/22      | 182.13 ± 26.73 ab | 21/21 | 202.39 ± 26.42 ab | 20/22    | 189.38 ± 31.84 ab | 18/22                     | 125.80 ± 23.71 b | 6/23        | 2.57 ± 1.63 c    |
| E                                          | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |        | 22.936 | 5     | 0.000   | 17/20                     | 110.03 ± 29.02 a       | 19/20      | 175.67 ± 29.22 a  | 19/21 | 151.02 ± 33.49 a  | 19/20    | 172.83 ± 34.24 a  | 17/20                     | 155.19 ± 35.97 a | 10/20       | 12.00 ± 3.86 b   |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> |        | 53.145 | 5     | 0.000   | 21/21                     | 229.81 ± 26.38 a       | 22/22      | 201.41 ± 26.44 a  | 21/21 | 217.39 ± 26.64 a  | 21/22    | 209.43 ± 31.12 a  | 20/22                     | 148.03 ± 25.79 a | 11/23       | 5.39 ± 1.87 b    |
| G                                          | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |        | 5.540  | 5     | 0.354   | 5/20                      | 39.62 ± 20.83          | 1/20       | 9.69 ± NA         | 6/21  | 33.81 ± 14.79     | 6/20     | 24.75 ± 11.54     | 5/20                      | 19.15 ± 10.87    | 3/20        | 3.36 ± 2.54      |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> |        | 14.805 | 5     | 0.011   | 5/21                      | 25.75 ± 16.11 ab       | 7/22       | 35.07 ± 15.41 a   | 7/21  | 22.48 ± 8.24 a    | 6/22     | 17.39 ± 8.01 ab   | 12/22                     | 25.41 ± 6.22 a   | 0/23        | 0.00 ± 0.00 b    |

<sup>a</sup> Los compuestos bioactivos se aplicaron a una dosis del 0,2% con Tween80® (1:2) como nanoemulsión de agua. Sulfoxaflor se aplicó a una dosis de 24 mg ai/L diluido en agua.

<sup>b</sup> np = sin prueba. Prueba = contacto del estilete con cualquier tejido vegetal (C, E1, E2 y G). C = estilete entre la epidermis y el mesófilo. E1 = salivación al comienzo de la fase del floema. E2 = ingestión pasiva de savia de floema. E = E1 + E2. G = ingestión activa de savia de xilema.

<sup>c</sup> F = estadístico F del ANOVA de aquellas variables cuyos residuos tienen una distribución aproximadamente normal y son homocedásticos, se han utilizado las transformaciones sqrt(x+0.5) y ln(x+1) según sea necesario. H = Estadístico de la prueba de Kruskal-Wallis de variables cuyos residuos no siguen una distribución normal y/o no son homocedásticos. gl = grados de libertad. p-valor = probabilidad de F o H. PPW = proporción de individuos que produjeron una forma de onda específica. MEDIA ± SE = Media ± error estándar de la media de los datos sin transformar. Diferentes letras dentro de una fila indican diferencias significativas entre los tratamientos a p ≤ 0,05 utilizando la comparación de medias de la prueba de Tukey en ANOVA o la prueba de Dunn en Kruskal-Wallis.

Anejo 3. Duración media de la forma de onda (tiempo en minutos) para cada insecto. Variables EPG no secuenciales.

|                                            |                                       |       |        |       |         | Tratamientos <sup>a</sup> |                        |            |                  |       |                  |          |                  |                           |                  |             |                |
|--------------------------------------------|---------------------------------------|-------|--------|-------|---------|---------------------------|------------------------|------------|------------------|-------|------------------|----------|------------------|---------------------------|------------------|-------------|----------------|
|                                            |                                       |       |        |       |         | Agua                      |                        | (E)-anetol |                  | Anis  |                  | Farnesol |                  | Aceite destilado de limón |                  | Sulfoxaflor |                |
| Variables EPG no secuenciales <sup>b</sup> | Pulgón / Planta                       | F     | H      | gl    | p-valor | PPW                       | MEAN ± SE <sup>c</sup> | PPW        | MEAN ± SE        | PPW   | MEAN ± SE        | PPW      | MEAN ± SE        | PPW                       | MEAN ± SE        | PPW         | MEAN ± SE      |
| Np                                         | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |       | 18.157 | 5     | 0.003   | 20/20                     | 3.38 ± 0.50 b          | 20/20      | 3.40 ± 0.59 b    | 21/21 | 5.11 ± 1.58 b    | 20/20    | 3.64 ± 0.84 b    | 20/20                     | 2.94 ± 0.39 b    | 20/20       | 16.81 ± 3.94 a |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> |       | 60.674 | 5     | 0.000   | 21/21                     | 2.25 ± 0.24 c          | 22/22      | 2.72 ± 0.34 bc   | 21/21 | 3.11 ± 0.36 bc   | 22/22    | 3.76 ± 0.57 b    | 22/22                     | 4.98 ± 1.42 bc   | 23/23       | 50.89 ± 9.63 a |
| C                                          | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |       | 4.936  | 5     | 0.424   | 20/20                     | 15.96 ± 2.68           | 20/20      | 14.39 ± 2.54     | 21/21 | 14.14 ± 2.63     | 20/20    | 12.42 ± 1.75     | 20/20                     | 14.45 ± 2.86     | 20/20       | 20.29 ± 11.59  |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> | 1.076 |        | 5;125 | 0.377   | 21/21                     | 7.15 ± 0.59            | 22/22      | 7.75 ± 0.86      | 21/21 | 8.38 ± 1.63      | 22/22    | 5.61 ± 0.55      | 22/22                     | 7.86 ± 1.10      | 23/23       | 6.62 ± 0.81    |
| E1                                         | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |       | 6.703  | 5     | 0.244   | 17/20                     | 1.28 ± 0.23            | 19/20      | 1.22 ± 0.28      | 19/21 | 1.01 ± 0.12      | 19/20    | 3.29 ± 1.46      | 17/20                     | 3.06 ± 1.41      | 10/20       | 1.19 ± 0.34    |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> | 0.528 |        | 5;110 | 0.755   | 21/21                     | 2.06 ± 0.49            | 22/22      | 2.59 ± 0.55      | 21/21 | 1.76 ± 0.36      | 21/22    | 2.42 ± 0.43      | 20/22                     | 4.71 ± 2.58      | 11/23       | 2.79 ± 0.69    |
| E2                                         | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |       | 12.312 | 5     | 0.031   | 13/20                     | 121.23 ± 33.32 ab      | 18/20      | 142.14 ± 29.44 a | 14/21 | 193.01 ± 38.74 a | 17/20    | 174.56 ± 37.28 a | 16/20                     | 150.48 ± 42.37 a | 10/20       | 19.53 ± 4.93 b |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> |       | 12.858 | 5     | 0.025   | 20/21                     | 62.52 ± 20.09 ab       | 20/22      | 89.57 ± 24.69 a  | 21/21 | 44.89 ± 8.39 ab  | 20/22    | 69.76 ± 14.37 a  | 18/22                     | 32.02 ± 11.91 bc | 6/23        | 8.79 ± 5.57 c  |
| G                                          | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   | 1.762 |        | 5;20  | 0.167   | 5/20                      | 158.49 ± 59.45         | 1/20       | 193.95 ± NA      | 6/21  | 87.43 ± 24.83    | 6/20     | 67.01 ± 18.23    | 5/20                      | 66.11 ± 33.35    | 3/20        | 22.42 ± 13.99  |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> | 1.955 |        | 4;32  | 0.125   | 5/21                      | 108.13 ± 56.78         | 7/22       | 103.46 ± 36.25   | 7/21  | 49.61 ± 8.74     | 6/22     | 44.41 ± 7.68     | 12/22                     | 44.48 ± 6.97     | 0/23        | NA             |

<sup>a</sup> Los compuestos bioactivos se aplicaron a una dosis del 0,2% con Tween80® (1:2) como nanoemulsión de agua. Sulfoxaflor se aplicó a una dosis de 24 mg ai/L diluido en agua.

<sup>b</sup> np = sin prueba. C = estilete entre la epidermis y el mesófilo. E1 = salivación al comienzo de la fase del floema. E2 = ingestión pasiva de savia de floema. G = ingestión activa de savia de xilema.

<sup>c</sup> F = estadístico F del ANOVA de aquellas variables cuyos residuos tienen una distribución aproximadamente normal y son homocedásticos, las transformaciones sqrt(x+0.5) y ln(x+1) han sido necesarias. H = Estadístico de la prueba de Kruskal-Wallis de aquellas variables cuyos residuos no siguen una distribución normal y/o no son homocedásticos. gl = grados de libertad. p-valor = probabilidad de F o H. PPW = proporción de individuos que produjeron una forma de onda específica. MEDIA ± SE = Media ± error estándar de la media de los datos sin transformar. Diferentes letras dentro de una fila indican diferencias significativas entre los tratamientos a p ≤ 0,05 utilizando la comparación de medias de la prueba de Tukey en ANOVA o la prueba de Dunn en Kruskal-Wallis.

Anejo 4. Porcentaje medio del tiempo de prueba en cada evento de forma de onda para cada insecto. Variables EPG no secuenciales.

|                                            |                                      |        |        |       |         | Tratamientos <sup>a</sup> |                        |            |                |       |                |          |                |                           |                |             |                |
|--------------------------------------------|--------------------------------------|--------|--------|-------|---------|---------------------------|------------------------|------------|----------------|-------|----------------|----------|----------------|---------------------------|----------------|-------------|----------------|
|                                            |                                      |        |        |       |         | Agua                      |                        | (E)-anetol |                | Anis  |                | Farnesol |                | Aceite destilado de limón |                | Sulfoxaflor |                |
| Variables EPG no secuenciales <sup>b</sup> | Pulgón / Planta                      | F      | H      | gl    | p-valor | PPW                       | MEAN ± SE <sup>c</sup> | PPW        | MEAN ± SE      | PPW   | MEAN ± SE      | PPW      | MEAN ± SE      | PPW                       | MEAN ± SE      | PPW         | MEAN ± SE      |
| Porcentaje de prueba en C                  | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>  | 4.353  |        | 5;115 | 0.001   | 20/20                     | 61.97 ± 6.69 b         | 20/20      | 56.40 ± 6.52 b | 21/21 | 56.38 ± 6.41 b | 20/20    | 54.15 ±6.81 b  | 20/20                     | 60.98 ± 7.54 b | 20/20       | 89.23 ± 3.39 a |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annum</i> | 22.242 |        | 5;125 | 0.000   | 21/21                     | 41.84 ± 4.81 b         | 22/22      | 45.45 ± 4.99 b | 21/21 | 42.69 ± 5.16 b | 22/22    | 44.98 ± 5.95 b | 22/22                     | 56.35 ± 5.08 b | 23/23       | 91.95 ± 3.19 a |
| Porcentaje de prueba en E1                 | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>  |        | 7.368  | 5     | 0.197   | 17/20                     | 0.75 ± 0.22            | 19/20      | 0.82 ± 0.26    | 19/21 | 0.44 ± 0.14    | 19/20    | 1.45 ± 0.58    | 17/20                     | 2.41 ± 1.42    | 10/20       | 0.46 ± 0.18    |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annum</i> | 1.989  |        | 5;125 | 0.085   | 21/21                     | 4.49 ± 0.69            | 22/22      | 4.79 ± 0.92    | 21/21 | 3.86 ± 0.89    | 21/22    | 5.07 ± 1.08    | 20/22                     | 5.95 ± 0.99    | 11/23       | 4.03 ± 1.54    |
| Porcentaje de prueba en E2                 | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>  |        | 16.429 | 5     | 0.006   | 13/20                     | 24.79 ± 6.45 ab        | 18/20      | 40.01 ± 6.69 a | 14/21 | 34.38 ± 7.52 a | 17/20    | 38.87 ± 7.70 a | 16/20                     | 32.29 ± 7.95 a | 10/20       | 5.54 ± 1.91 b  |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annum</i> |        | 42.735 | 5     | 0.000   | 20/21                     | 48.02 ± 5.95 a         | 20/22      | 41.78 ± 5.75 a | 21/21 | 47.72 ± 6.02 a | 20/22    | 45.31 ± 7.01 a | 18/22                     | 30.62 ± 5.43 a | 6/23        | 4.03 ± 2.83 b  |
| Porcentaje de E2 en E2 (t > 10 min)        | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>  |        | 3.792  | 5     | 0.580   | 10/20                     | 63.46 ± 12.21          | 15/20      | 71.11 ± 9.40   | 13/21 | 83.93 ± 8.93   | 15/20    | 76.26 ± 9.53   | 12/20                     | 58.33 ± 11.26  | 7/20        | 65.00 ± 15.00  |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annum</i> | 1.702  |        | 5;99  | 0.141   | 19/21                     | 43.45 ± 7.48           | 18/22      | 53.74 ± 8.33   | 18/21 | 44.40 ± 6.16   | 17/22    | 44.01 ± 7.94   | 16/22                     | 30.78 ± 6.92   | 2/23        | 25.00 ± 17.08  |
| Porcentaje de prueba en G                  | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>  |        | 5.454  | 5     | 0.363   | 5/20                      | 9.52 ± 5.06            | 1/20       | 2.23 ± NA      | 6/21  | 8.86 ± 3.81    | 6/20     | 5.53 ± 2.57    | 5/20                      | 4.31 ± 2.47    | 3/20        | 1.43 ± 0.99    |
|                                            | <i>M. persicae</i> / <i>C. annum</i> |        | 15.301 | 5     | 0.009   | 5/21                      | 5.64 ± 3.47 bc         | 7/22       | 7.97 ± 3.41 ab | 7/21  | 5.72 ± 2.03 ab | 6/22     | 4.64 ± 2.04 ab | 12/22                     | 7.08 ± 1.73 a  | 0/23        | 0.00 ± 0.00 c  |

<sup>a</sup> Los compuestos bioactivos se aplicaron a una dosis del 0,2% con Tween80® (1:2) como nanoemulsión de agua. Sulfoxaflor se aplicó a una dosis de 24 mg ai/L diluido en agua.

<sup>b</sup> C = estilete entre la epidermis y el mesófilo. E1 = salivación al comienzo de la fase del floema. E2 = ingestión pasiva de savia de floema. E2 (t > 10 min) = ingesta de savia de floema con una duración superior a 10 minutos. G = ingestión activa de savia de xilema.

<sup>c</sup> F = estadístico F del ANOVA de aquellas variables cuyos residuos tienen una distribución aproximadamente normal y son homocedásticos, se han utilizado las transformaciones sqrt(x+0.5) y arsin(sqrt(x)) según sea necesario. H = Estadístico de la prueba de Kruskal-Wallis de aquellas variables cuyos residuos no siguen una distribución normal y/o no son homocedásticos. gl = grados de libertad. p-valor = probabilidad de F o H. PPW = proporción de individuos que produjeron una forma de onda específica. MEDIA ± SE = Media ± error estándar de la media de los datos sin transformar. Diferentes letras dentro de una fila indican diferencias significativas entre los tratamientos a  $p \leq 0,05$  utilizando la comparación de medias de la prueba de Tukey en ANOVA o la prueba de Dunn en Kruskal-Wallis.

Anejo 5. Duración media de cada evento (minutos). Variables EPG secuenciales.

|                                                                   |                                       |       |        |       |         | Tratamientos <sup>a</sup> |                        |            |                   |       |                   |          |                   |                           |                  |             |                  |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------|--------|-------|---------|---------------------------|------------------------|------------|-------------------|-------|-------------------|----------|-------------------|---------------------------|------------------|-------------|------------------|
|                                                                   |                                       |       |        |       |         | Agua                      |                        | (E)-anetol |                   | Anis  |                   | Farnesol |                   | Aceite destilado de limón |                  | Sulfoxaflor |                  |
| Variables EPG secuenciales (tiempo en minutos) <sup>b</sup>       | Pulgón / Planta                       | F     | H      | gl    | p-valor | PPW                       | MEAN ± SE <sup>c</sup> | PPW        | MEAN ± SE         | PPW   | MEAN ± SE         | PPW      | MEAN ± SE         | PPW                       | MEAN ± SE        | PPW         | MEAN ± SE        |
| Desde el inicio del EPG hasta la primera prueba                   | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |       | 6.995  | 5     | 0.221   | 20/20                     | 4.48 ± 2.13            | 20/20      | 2.48 ± 0.86       | 21/21 | 9.45 ± 3.43       | 20/20    | 4.55 ± 2.07       | 20/20                     | 3.80 ± 0.93      | 20/20       | 2.27 ± 0.46      |
|                                                                   | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> |       | 7.670  | 5     | 0.175   | 21/21                     | 4.02 ± 0.90            | 22/22      | 3.61 ± 0.71       | 21/21 | 1.63 ± 0.24       | 22/22    | 3.85 ± 1.02       | 22/22                     | 2.75 ± 0.48      | 23/23       | 5.41 ± 1.12      |
| Desde el inicio del EPG hasta la primera E                        | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   | 1.460 |        | 5;115 | 0.208   | 17/20                     | 244.33 ± 30.43         | 19/20      | 194.86 ± 27.49    | 19/21 | 251.85 ± 31.67    | 19/20    | 257.32 ± 30.48    | 17/20                     | 232.74 ± 33.54   | 10/20       | 328.45 ± 39.25   |
|                                                                   | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> |       | 8.257  | 5     | 0.143   | 21/21                     | 113.70 ± 20.30         | 22/22      | 92.82 ± 14.95     | 21/21 | 120.42 ± 27.28    | 21/22    | 102.76 ± 23.69    | 20/22                     | 191.62 ± 32.62   | 11/23       | 271.46 ± 46.65   |
| Desde el inicio de prueba hasta la primera E                      | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   | 2.012 |        | 5;95  | 0.084   | 17/20                     | 31.71 ± 5.91           | 19/20      | 38.96 ± 5.29      | 19/21 | 60.57 ± 14.35     | 19/20    | 73.37 ± 19.14     | 17/20                     | 48.15 ± 9.78     | 10/20       | 48.63 ± 10.01    |
|                                                                   | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> | 1.223 |        | 5;110 | 0.303   | 21/21                     | 16.49 ± 2.20           | 22/22      | 15.53 ± 2.65      | 21/21 | 19.46 ± 6.23      | 21/22    | 13.68 ± 1.58      | 20/22                     | 12.04 ± 1.38     | 11/23       | 10.59 ± 1.35     |
| Desde la primera prueba hasta la primera E                        | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |       | 7.935  | 5     | 0.160   | 17/20                     | 239.84 ± 29.95         | 19/20      | 192.39 ± 27.62    | 19/21 | 242.40 ± 30.43    | 19/20    | 252.77 ± 30.85    | 17/20                     | 228.94 ± 33.63   | 10/20       | 326.18 ± 39.44   |
|                                                                   | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> |       | 7.594  | 5     | 0.180   | 21/21                     | 109.68 ± 20.25         | 22/22      | 89.21 ± 14.91     | 21/21 | 118.79 ± 27.31    | 21/22    | 98.90 ± 23.86     | 20/22                     | 188.87 ± 32.51   | 11/23       | 266.05 ± 46.84   |
| Desde el inicio de prueba hasta la primera E2                     | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   | 0.726 |        | 5;82  | 0.606   | 13/20                     | 43.16 ± 7.57           | 18/20      | 46.88 ± 8.01      | 14/21 | 72.51 ± 18.59     | 17/20    | 53.18 ± 7.22      | 16/20                     | 49.58 ± 10.69    | 10/20       | 48.88 ± 10.29    |
|                                                                   | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> |       | 4.080  | 5     | 0.538   | 20/21                     | 19.06 ± 2.60           | 20/22      | 20.37 ± 2.38      | 21/21 | 21.42 ± 3.80      | 20/22    | 21.59 ± 4.13      | 18/22                     | 23.05 ± 5.06     | 6/23        | 11.48 ± 2.57     |
| Desde el inicio del EPG hasta la primera E2 (t > 10 min)          | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |       | 8.386  | 5     | 0.136   | 10/20                     | 357.93 ± 32.07         | 15/20      | 265.56 ± 35.76    | 13/21 | 316.15 ± 36.11    | 15/20    | 304.38 ± 33.71    | 12/20                     | 334.98 ± 37.53   | 7/20        | 390.61 ± 32.91   |
|                                                                   | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> |       | 30.275 | 5     | 0.000   | 19/21                     | 178.09 ± 30.86 c       | 18/22      | 211.33 ± 32.22 bc | 18/21 | 214.26 ± 36.74 bc | 17/22    | 235.81 ± 35.99 bc | 16/22                     | 291.41 ± 35.21 b | 2/23        | 440.98 ± 26.96 a |
| Desde el inicio de prueba hasta la primera E2 (t > 10 min)        | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   | 0.213 |        | 5;66  | 0.956   | 10/20                     | 49.85 ± 8.55           | 15/20      | 49.39 ± 9.53      | 13/21 | 62.71 ± 16.76     | 15/20    | 57.72 ± 9.58      | 12/20                     | 49.19 ± 7.83     | 7/20        | 55.09 ± 13.85    |
|                                                                   | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> | 0.413 |        | 5;84  | 0.838   | 19/21                     | 25.99 ± 3.16           | 18/22      | 29.28 ± 2.96      | 18/21 | 33.20 ± 8.15      | 17/22    | 26.09 ± 6.31      | 16/22                     | 32.88 ± 6.85     | 2/23        | 19.11 ± 1.56     |
| Desde el inicio de prueba hasta la primera E2 (t > 10 min)        | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |       | 9.538  | 5     | 0.089   | 10/20                     | 353.45 ± 31.59         | 15/20      | 263.08 ± 35.77    | 13/21 | 306.69 ± 34.53    | 15/20    | 299.83 ± 34.25    | 12/20                     | 331.18 ± 37.61   | 7/20        | 388.33 ± 33.08   |
|                                                                   | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> |       | 28.702 | 5     | 0.000   | 19/21                     | 174.07 ± 30.96 c       | 18/22      | 207.72 ± 32.29 bc | 18/21 | 212.64 ± 36.65 bc | 17/22    | 231.96 ± 35.95 bc | 16/22                     | 288.65 ± 35.19 b | 2/23        | 435.57 ± 27.12 a |
| Duración de np después de la prueba de la primera E2 (t > 10 min) | <i>A. gossypii</i> / <i>C. melo</i>   |       | 34.827 | 5     | 0.000   | 2/20                      | 1.77 ± 1.63 b          | 4/20       | 3.19 ± 2.69 b     | 2/21  | 0.15 ± 0.11 b     | 0/20     | 0.00 ± 0.00 b     | 1/20                      | 0.48 ± NA b      | 7/20        | 100.57 ± 49.33 a |
|                                                                   | <i>M. persicae</i> / <i>C. annuum</i> | 0.545 |        | 4;40  | 0.704   | 11/21                     | 2.76 ± 0.45            | 11/22      | 5.09 ± 1.38       | 9/21  | 4.25 ± 0.99       | 6/22     | 3.71 ± 1.88       | 8/22                      | 3.42 ± 0.77      | 0/23        | NA               |

<sup>a</sup> Los compuestos bioactivos se aplicaron a una dosis del 0,2% con Tween80® (1:2) como nanoemulsión de agua. Sulfoxaflor se aplicó a una dosis de 24 mg ai/L diluido en agua.

<sup>b</sup> np = sin prueba. Prueba = contacto del estilete con cualquier tejido vegetal (C, E1, E2 y G). E = E1 = salivación al comienzo de la fase del floema. E2 = ingestión pasiva de savia de floema. E2 (t > 10 min) = ingestión de savia de floema con una duración superior a 10 minutos.

<sup>c</sup> F = estadístico F del ANOVA de aquellas variables cuyos residuos tienen una distribución aproximadamente normal y son homocedásticos, se han utilizado las transformaciones sqrt(x+0.5) y ln(x+1) según sea necesario. H = Estadístico de la prueba de Kruskal-Wallis de variables cuyos residuos no siguen una distribución normal y/o no son homocedásticos. gl = grados de libertad. p-valor = probabilidad de F o H. PPW = proporción de individuos que produjeron una forma de onda específica. MEDIA ± SE = Media ± error estándar de la media de los datos sin transformar. Diferentes letras dentro de una fila indican diferencias significativas entre los tratamientos con un valor de  $p \leq 0,05$  utilizando la comparación de medias de la prueba de Tukey en ANOVA o la prueba de Dunn en Kruskal-Wallis.