

UNIVERSITAT JAUME I

Escola Superior de Tecnologia i Ciències Experimentals



**ENGINYERIA AGROALIMENTÀRIA
I DEL MEDI RURAL**

**Mejora en la cría de *Chilocorus bipustulatus* en
insectario sobre *Aspidiotus nerii* para el control de *Aonidiella
aurantii*.**

Estudiant: Ernesto González Vidal

Tutor acadèmic: Josep Anton Jaques Miret

Tutora experimental: Maribel Deval Del Toro

Convocatòria: Juliol 2016

ÍNDICE

- 1.- Introducción	3
- 1.1.- Importancia de los cultivos de cítricos y sus plagas	4
- 1.2.- Los insectarios y su funcionamiento	5
- 1.3.- <i>Aonidiella aurantii</i> (Maskell) o Piojo Rojo de California	5
- 1.4.- <i>Aspidiotus nerii</i> Bouché o Piojo Blanco	9
- 1.5.- <i>Chilocorus bipustulatus</i> Linnaeus	11
- 2.- Justificación y objetivos	16
- 3.- Material y métodos	18
- 3.1.- Cría de <i>Aspidiotus nerii</i>	19
- 3.2.- Seguimiento del ciclo de <i>Chilocorus bipustulatus</i>	21
- 3.3.- Diferente dosificación de <i>Chilocorus bipustulatus</i> en calabazas con <i>Aspidiotus nerii</i>	26
- 3.4.- Exposición de diferentes estadios de <i>Aspidiotus nerii</i> para <i>Chilocorus bipustulatus</i>	28
- 3.5.- Sexado de <i>Chilocorus bipustulatus</i>	30
- 3.6.- Análisis estadístico de los resultados	31
- 4.- Resultados	32
- 4.1.- Seguimiento del ciclo de <i>Chilocorus bipustulatus</i>	33
- 4.2.- Diferente dosificación de <i>Chilocorus bipustulatus</i> en calabazas con <i>Aspidiotus nerii</i>	36
- 4.3.- Exposición de diferentes estadios de <i>Aspidiotus nerii</i> para <i>Chilocorus bipustulatus</i>	37
- 4.4.- Sexado de <i>Chilocorus bipustulatus</i>	38
- 5.- Discusión	41
- 5.1.- Seguimiento del ciclo de <i>Chilocorus bipustulatus</i>	42
- 5.2.- Diferente dosificación de <i>Chilocorus bipustulatus</i> en calabazas con <i>Aspidiotus nerii</i>	45
- 5.3.- Exposición de diferentes estadios de <i>Aspidiotus nerii</i> para <i>Chilocorus bipustulatus</i>	47
- 5.4.- Sexado de <i>Chilocorus bipustulatus</i>	48
- 6.- Conclusiones	49
- 7.- Anexos	52
- 8.- Bibliografía	62
- 9.- Agradecimientos	65

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Importancia de los cultivos de cítricos y sus plagas

El origen de los cítricos es situado en el sudeste de Asia por las primeras citas históricas, donde su cultivo se conoce desde mediados del siglo V a.C. (Agustí, 1999). Por otra parte, las primeras noticias sobre su cultivo en España datan de los siglos XV y XVI provenientes de Portugal e Italia, como es el caso del naranjo dulce, aunque sus primeras plantaciones regulares no aparecerían hasta el siglo XVIII en diversas zonas del País Valenciano, en concreto en varias localidades de Castellón y Valencia (Bono, 1991).

El Estado español es el mayor productor de cítricos de la Unión Europea y el séptimo del mundo elaborando más de 5 toneladas anuales durante la pasada década y dedicando 300.000 hectáreas de superficie a su cultivo (García-Marí, 2012); además, es el principal exportador del mundo según datos de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Casi la mitad de esta producción de cítricos corresponde a naranjos (48%), seguido por clementinos (25%), limones (14%) y otros, repartiéndose casi toda su producción entre la Comunidad Valenciana, Andalucía y la Región de Murcia, en especial en las dos primeras.

El País Valenciano es la comunidad que mayor superficie destina al cultivo de los cítricos, llegando a ocupar más de 200.000 hectáreas en 2008 (García-Marí, 2012), y la más productora del país, concentrándose en ella el 60% de la producción. Las especies cítricas más cultivada son el naranjo y el clementino, que suponen casi el 90% de superficie y producción y con presencia en las tres provincias, con el 10% restante dedicado casi en su totalidad al cultivo del limón.

La importancia de este tipo de cultivo tanto económica como socialmente hablando nos ha permitido conocer con mayor precisión a lo largo de los años toda la cantidad de enfermedades y plagas que pueden afectarle y también las mejores formas para combatirlos tanto por el uso de químicos como por control biológico, una regulación definida como “la acción de parasitoides, patógenos o depredadores para mantener la densidad de la población de un organismo plaga a un promedio menor del que ocurriría en su ausencia” (DeBach, 1964).

Dado que, más de la mitad de la producción en la Cuenca Mediterránea va destinada al consumo en fresco, una buena apariencia de los frutos es fundamental para su comercialización, algo que puede mermar por culpa de ciertas plagas como en el caso de los diaspídidos pues, la presencia de escudos en el fruto ocasiona pérdidas por destrío aunque no altere las cualidades organolépticas del mismo. Este es el caso del Piojo Rojo de California *Aonidiella aurantii*, considerada plaga objetivo ya que el control biológico natural no consigue mantener las poblaciones por debajo del umbral económico de daños y hay que recurrir a otros tipos de control.

El éxito logrado con el primer caso de control biológico en 1880 para controlar la población de cochinilla acanalada *Icerya purchasi* en California importando desde Australia a su depredador natural *Rodolia cardinalis* animó a la agricultura moderna a emplear este método para combatir las plagas existentes en los cultivos. Posteriormente y al no encontrar depredadores eficaces en muchos casos, se cambió de estrategia y se comenzó a buscar y emplear parasitoides de las plagas, pero sin dejar de lado el empleo de los insectos entomófagos como depredadores (Compere, 1961).

1.2.- Los insectarios y su funcionamiento

Este éxito en control biológico se repitió en España con la introducción en 1922 de *R. cardinalis*, creándose el primer insectario en la Comunidad Valenciana en la Estación Fitopatológica de Burjassot. Unos años más tarde, en 1927, se inicia una nueva introducción y cría del coccinélido depredador *Cryptolaemus montrouzieri* para el control biológico de *Planococcus citri*. En los años setenta, con la construcción de las sedes del Servicio de Defensa Contra Plagas e Inspección Fitopatológica en Almassora (Castellón) y en Silla (Valencia), se traslada el insectario a estas dos sedes convirtiéndose más tarde en los insectarios de la Generalitat Valenciana (Memoria de los Insectarios).

El fin principal de estos insectarios ha sido el control biológico clásico, introducción, cría y aclimatación de parasitoides y depredadores. Si bien algunas especies continúan criándose, otras en cambio se abandonó su producción por diversos motivos. Actualmente las especies que se crían en los insectarios de la Generalitat Valenciana son: cuatro especies de coccinélidos depredadores (*R. cardinalis* como depredador de *I. purchasi*, *C. montrouzieri* como depredador de cotonets, *Chilocorus bipustulatus* y *Coccidiophilus citricola* como depredadores de diaspídeos) y tres especies de parasitoides (*Encarsia perniciosi* y *Comperiella bifasciata* para *A. aurantii* y *Psytalia concolor* para *Ceratitidis capitata* y *Bactrocera oleae*). (Memoria de los Insectarios)

Para llevar a cabo la cría de parasitoides y depredadores en los insectarios es necesario criar también las plagas a las que van dirigidas. Es por esto que, en primer lugar, un insectario debe disponer de un material vegetal adecuado en el que puedan desarrollarse las plagas objetivo, las cuales deberán servir como alimento en la cría de los depredadores y de los parasitoides, que al fin y al cabo es la cría hacia la que va dirigida la función de los insectarios.

El presente proyecto está basado en la cría del depredador *Chilocorus bipustulatus* sobre la presa *Aspidiotus nerii*, para utilizarse posteriormente en campo como control biológico aumentativo inoculativo frente a *Aonidiella aurantii*. La función del depredador es la de completar su ciclo alimentándose de más de una presa, en nuestro caso una plaga, disminuyendo de forma directa su población.

1.2.- *Aonidiella aurantii* (Maskell) o Piojo Rojo de California

Es originario del sudeste asiático y desde allí fue expandiéndose a otros continentes como África, América o Australia a lo largo del siglo XIX (Ebeling, 1959). Durante el siguiente siglo comenzó su expansión por Europa, llegando a España a mediados de la década de 1980 y siendo detectada por primera vez en el País Valenciano en 1985 en Alzira (Valencia). Desde entonces se ha ido expandiendo por todas las comarcas citrícolas valencianas hasta convertirse en la plaga más importante de cítricos. En 1989 produjo un fuerte ataque en la zona de Alzira y la Ribera Alta (Valencia) que produjo un alto porcentaje de fruta no apta para su comercialización, causando un perjuicio económico grave en la zona que llevó al Servicio de Protección Vegetal a comenzar a estudiar la problemática y diseñar campañas experimentales para su control. En la provincia de Castellón empezó a detectarse a partir de 2001 por las comarcas del sur, siguiendo una lenta expansión que ha hecho que en 2010 su población todavía no sea relevante en el norte de la provincia.

Su clasificación taxonómica es la siguiente según Fauna Europaea:

- **Orden:** Hemiptera
- **Suborden:** Sternorrhyncha
- **Superfamilia:** Coccoidea
- **Familia:** Diaspididae
- **Subfamilia:** Aspidiotini
- **Género:** *Aonidiella*
- **Especie:** *Aonidiella aurantii* (Maskell)

Es considerada desde hace muchos años como una de las plagas más importantes dentro del cultivo de cítricos en el Estado español (Tabla 1) además de ser la más importante dentro de la citricultura del País Valenciano (García-Marí, 2012). Afecta a multitud de plantas de diferentes tipos, pudiendo atacar a algunas especies ornamentales como el jazmín y los rosales, pero también a multitud de frutales como el manzano y el ciruelo, aunque los principales hospedantes del Piojo Rojo son los cítricos (Bodenheimer, 1951).

El daño más grave que puede realizar es su presencia sobre los frutos, parte del cultivo sobre la que muestra referencia y cuyos daños producen su depreciación comercial. También pueden afectar a la parte vegetal del árbol alimentándose del tejido vegetal y la savia, lo que provoca manchas cloróticas en las hojas, que se amarillean y finalmente caen, produciendo de esta forma un debilitamiento general del árbol reduciendo considerablemente su productividad, pudiendo ser letal en algunos casos extremos.

Tabla 1: Plagas más importantes en el cultivo de cítricos en España durante los primeros años del Siglo XXI (García-Marí, 2012). A cada plaga se le ha asignado los valores 1 (sin importancia), 2 (plaga ocasional) y 3 (plaga importante).

Grupo	Nombre común	Nombre científico	Importancia
Ácaros	Ácaro rojo	<i>Panonychus citri</i>	2
	Araña roja	<i>Tetranychus urticae</i>	3
	Ácaro de las yemas	<i>Aceria sheldoni</i>	2
Diaspídidos	Piojo Rojo de California	<i>Aonidiella aurantii</i>	3
	Piojo gris	<i>Parlatoria pergandii</i>	2
	Serpeta gruesa	<i>Lepidosaphes beckii</i>	1
	Piojo blanco	<i>Aspidiotus nerii</i>	2
Otras cochinillas	Cotonet	<i>Planococcus citri</i>	2

Pulgones	Pulgón negro del algodón	<i>Aphis gossypii</i>	2
	Pulgón verde de los cítricos	<i>Aphis spiraecola</i>	3
Moscas blancas	Mosca blanca algodonosa	<i>Aleurothrixus floccosus</i>	1
Lepidópteros	Minador de hojas	<i>Phyllocnistis citrella</i>	3
	Polilla de las flores	<i>Prays citri</i>	3
Dípteros	Mosca de la fruta	<i>Ceratitis capitata</i>	3

El ciclo biológico que presenta *Aonidiella aurantii* es el típico de la familia Diaspididae. Su desarrollo consta de tres estadios en las hembras y de cinco en los machos. Los huevos eclosionan dentro del cuerpo de la madre, donde permanecen debajo de su escudo durante unas pocas horas o varios días en función de la temperatura y el fotoperíodo. Una vez salen, la mayoría de ninfas se fijan a las pocas horas comenzando de esta manera su ciclo (Willard, 1974).

El macho, una vez llega a su fase adulta y emerge, tiene una vida de menos de 24 horas. Por otra parte, las hembras presentan una vida más larga y, puesto que son las que originan las infestaciones, son las que más nos interesa conocer sus etapas. Las hembras son vivíparas y su fecundidad total está estimada entre 50 y 150 ninfas cada una cuando se desarrollan sobre las hojas, una cifra que aumenta a entre 60 y 180 cuando lo hace sobre el fruto (Bodenheimer, 1951).

Estos son los distintos estadios que muestran y su duración en las condiciones del insectario (Boix, 2012):

- **Ninfa móvil (1 día):** Al nacer posee dos ojos simples, dos antenas y tres pares de patas. Su cuerpo es amarillento y tiene forma aplanada, lo que le facilita ser transportada por el viento. Nada más nacer se desplazan durante horas hasta fijarse replegando patas y antenas en una superficie vegetal adecuada, momento en el que comienza a producir filamentos sedosos de color blanco dando paso al siguiente estadio.



Figura 1. Dos ninfas móviles de *Aonidiella aurantii*

Ninfa I (N1) (12 días): Estos filamentos sedosos comienzan a entrecruzarse formando una cubierta circular concéntrica (al contrario que en los machos, que es alargada) que aísla a la ninfa del exterior, protegiéndola e impidiendo su desecación.



Figura 2. Varias N1 de *A. aurantii*

- **Ninfa II (N2) (18 días):** Aumenta su diámetro tras la primera muda y adopta su característico color marrón rojizo.



Figura 3. Varias N2 de *A. aurantii*

- **Hembra joven (Hj) (25 días):** Efectúa una segunda muda aumentando su tamaño y se vuelve más rojiza.

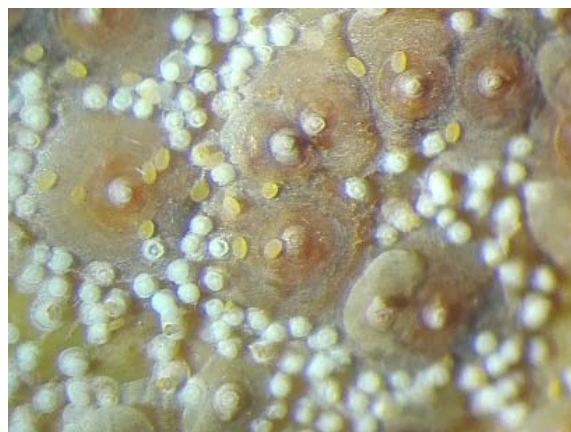


Figura 4. Varias Hj de *A. aurantii* rodeadas de N1 y ninfas móviles

- **Hembra adulta (Ha):** El escudo se vuelve un poco translúcido y el cuerpo de la hembra adopta una forma arriñonada tras ampliar sus lóbulos laterales para avivar nuevas ninfas.



Figura 5. Varias Ha de *A. aurantii* rodeadas de varias N2

1.3.- *Aspidiotus nerii* Bouché o Piojo Blanco

El *Aspidiotus nerii* Bouché o piojo blanco está presente en España desde finales del siglo XIX y se trata de una especie extraordinariamente polífaga que se considera nativa del área mediterránea (DeBach, 1991), aunque también se ha especulado con que podría ser originario de la zona sudafricana dada su afinidad con especies autóctonas allí encontradas (Balachowsky, 1935) y también de zonas del Pacífico sur (Williams, 1988). En los cultivos españoles está presente desde finales del siglo XIX Es considerado como el diaspidido con la distribución más amplia por todo el mundo (Quayle, 1941).

Su clasificación taxonómica es la siguiente según Fauna Europaea:

- **Orden:** Hemiptera
- **Suborden:** Sternorrhyncha
- **Superfamilia:** Coccoidea
- **Familia:** Diaspididae
- **Subfamilia:** Aspidiotini
- **Género:** *Aspidiotus*
- **Especie:** *Aspidiotus nerii* Bouché

Al igual que ocurre con *Aonidiella aurantii*, los daños que producen en los cultivos –sobre todo limoneros- son tanto directos (succión de savia y como consecuencia produciendo el debilitamiento y muerte de la planta en casos extremos) como indirectos (depreciación del fruto en el mercado por la presencia de estas cochinillas sobre la superficie).

En los cultivos del País Valenciano presenta tres generaciones anuales que se solapan (Gómez, 1943) y se trata de una especie ovovípara, pudiendo poner cada hembra entre 100 y 150 huevos, una descendencia mayor que *A. aurantii* (García-Marí, 2012). De la misma forma que en el punto anterior, nos vamos a centrar tan sólo en las hembras de *A.*

nerii, ya que son quienes pueden iniciar una infestación. Durante su evolución pasa por distintos estadios de una manera similar a la de *A. aurantii* (Boix, 2012):

- **Ninfa móvil (1 día):** Muy similar al mismo estadio de *A. aurantii*, aunque su nacimiento se produce de huevos que eclosionan dentro de la hembra adulta y avivan a las pocas horas de su puesta. También posee dos ojos simples, dos antenas y tres pares de patas, con cuerpo amarillento y de forma aplanada.



Figura 6. Ninfa móvil de *Aspidiotus nerii*

- **Ninfa I (N1) (38-40 días):** Una vez fijada la ninfa, esta pierde patas y antenas y comienza a segregar una cubierta sedosa de color blanco que le servirá para protegerse y evitar su desecación.



Figura 7. N1 de *Aspidiotus nerii* junto a ninfas móviles

- **Ninfa II (N2) (8-10 días):** Tiene lugar su primera muda, momento en el que se le pueden contar dos cubiertas: la superior de color blanquecino correspondiente al estadio anterior y otra de color marrón-amarillento.



Figura 8. N2 de *Aspidiotus nerii*

- **Hembra joven (Hj) (6-8 días):** Efectúa una segunda muda aumentando su tamaño, de color acaramelado.



Figura 9. Hembra joven de *A. nerii*

- **Hembra adulta (Ha) (4-6 días):** La hembra desarrolla de forma periférica una cubierta sedosa, quedando de esta forma de color amarillento por el centro y blanco alrededor.



Figura 10. Hembra adulta de *A. nerii*

1.4.- *Chilocorus bipustulatus* Linnaeus

Dentro del control biológico de *Aonidiella aurantii* y *Aspidiotus nerii* encontramos como depredador al coccinélido *Chilocorus bipustulatus*, cuyos adultos y larvas se alimentan de cóccidos y diaspididos principalmente, pero cuando escasea esta fuente de alimentación también puede depredar pulgones como *Cinara maritima*, *Cinara pinea* o *Eulachnus rileyi* (Núñez, 1992). En cuanto al control de piojo rojo de California, *C. bipustulatus* es depredador de todas sus fases, aunque de momento se desconoce la relevancia que puede tener en su control biológico.

Se trata de una especie nativa bastante distribuída por la citricultura del País Valenciano, aunque la que se emplea en la cría que tiene lugar en los insectarios proviene del norte de África ya que la especie autóctona presenta problemas intestinales y se dificulta su producción. Se encuentra en toda la zona Mediterránea, abarcando entre España y Turquía así como el norte de África y hasta Reino Unido, aunque también se ha conseguido establecer durante los últimos años en Sudáfrica (Samways, 1999).

Esta es su clasificación taxonómica según Fauna Europaea:

- **Orden:** Coleóptera
- **Suborden:** Polyphaga
- **Superfamilia:** Cucujoidea
- **Familia:** Coccinellidae
- **Subfamilia:** Chilocorinae
- **Género:** *Chilocorus*
- **Especie:** *Chilocorus bipustulatus* Linnaeus

A lo largo de su evolución, *C. bipustulatus* pasa por distintas etapas con una duración que varía según la presa sobre la que se cría; en este caso nos basamos en *A. nerii*, sobre la cual la criaremos nosotros (Uygun, 1998):

- **Huevo (7-28 días):** Son de color amarillo vivo y de forma ovalada. Su periodo de duración oscila mucho dependiendo de las condiciones ambientales. Su tamaño es de poco más de un milímetro.



Figura 11. Huevo de *Chilocorus bipustulatus* sobre *Aspidiotus nerii*

- **L1 (2-7 días):** En su primer estadio inmaduro mide 2 milímetros. Es de color grisáceo con la cabeza de color negro y al igual que en buena parte de los coccinélidos presenta quetas a lo largo de su cuerpo, en este caso 12 filas que sirven para su protección.



Figura 12. Larva de *Chilocorus bipustulatus* en fase L1

- **L2 (2-7 días):** Tras realizar su primera muda su aspecto no varía en exceso, notándose tan sólo un crecimiento de su tamaño.



Figura 13. Larva de *Chilocorus bipustulatus* en fase L2

- **L3 (2-7 días):** De nuevo vuelve a mudar y en esta ocasión se aprecia también un crecimiento en cuanto a su grosor, apareciendo además una característica banda blanca transversal en su parte dorsal casi a la mitad de su cuerpo.



Figura 14. Larva de *Chilocorus bipustulatus* en fase L3

- **L4 (3-8 días):** Alcanza su último estadio inmaduro con un tamaño cercano a los 5 milímetros sin presentar grandes variaciones en su aspecto respecto a la anterior fase. Poco a poco se irá hinchando su cuerpo y buscará un lugar adecuado donde empupar.



Figura 15. Larva de *Chilocorus bipustulatus* en fase L4

- **Pupa (6-11 días):** La larva se aferra por su extremo anterior e inicia el proceso de empupado. pupa queda protegida por la exuvia de su anterior estadio de forma similar a como ocurre en otros coccinélidos.



Figura 16. Pupa de *Chilocorus bipustulatus*

- **Adulto:** El adulto emerge de la pupa y durante sus primeras horas de vida adquiere un color naranja vivo que poco a poco irá oscureciéndose hasta alcanzar un color negro con sus dos características manchas rojas en sus élitros.



Figura 17. Vista dorsal de un adulto de *Chilocorus bipustulatus*

Su etapa inmadura puede durar entre 15 y 40 días según los datos anteriores.

La cría de *Chilocorus bipustulatus* se viene llevando a cabo en el Insectario de Almazora desde 2011 con la finalidad de mejorar el control biológico en campo de *A. aurantii* mediante sueltas aumentativas inoculativas. A pesar de que esta sea la plaga objetivo, las crías de *C. bipustulatus* se llevan a cabo sobre *Aspidiotus nerii* ya que produce muchas más larvas que sirven de alimento y la producción de este coccinélido es mayor (con una reproducción de 50-150 ninfas el Piojo Rojo de California frente a las 100-150 del piojo blanco).

La producción de *C. bipustulatus* en Almazora carece todavía de un método de cría masiva desarrollado. Se trata de una adaptación del método empleado para la cría de *Rhyzobius lophanthae* en la extinguida Estación Phoenix de Elche, sin embargo las producciones que se obtienen no son todavía suficientes como para promocionar la lucha biológica aumentativa en el control del Piojo Rojo de California (Boix, 2012). Uno de los motivos de esta baja productividad de nuevos individuos podría ser debido al canibalismo propio del género *Chilocorus* (Ponsonby, 1998), pues se ha detectado en los evolucionarios de cría la presencia de pupas muertas y con mordiscos. También influye en su cría la imposibilidad de poder sexar a los adultos de *Chilocorus* mediante sus características físicas (Uygun, 1998)

Este coccinélido es un buen depredador de diaspídeos como *Aspidiotus nerii*, pudiendo devorar cada individuo hasta 2.4 ± 0.4 hembras adultas de *A. nerii* en 4 horas durante su fase adulta y hasta 2.6 ± 0.4 en su fase larvaria (Hattingh, 1994). Otras especies como *C. nigritus* o *C. infernalis* depredan en mayor número, aunque no se encuentran en nuestra fauna.

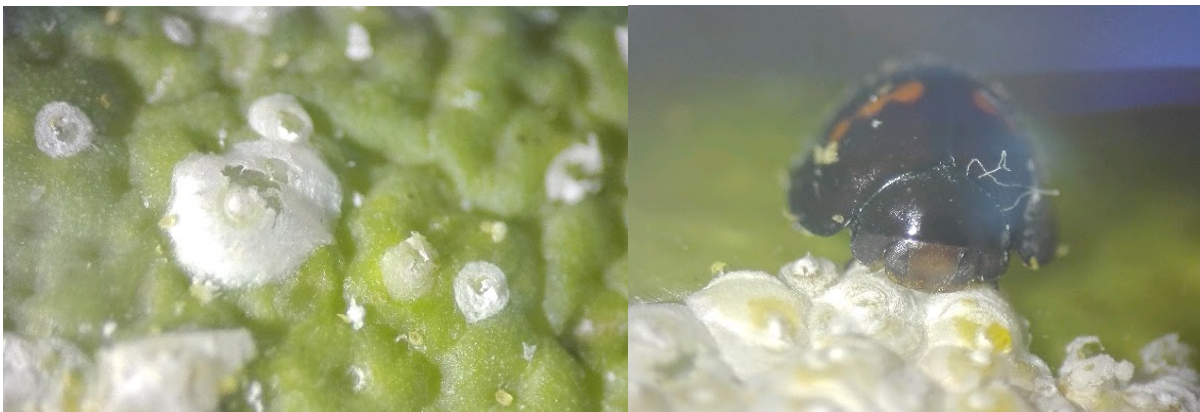


Figura 18. Individuos de *A. nerii* depredadas (i.) y adulto de *C. bipustulatus* alimentándose de ellas (d.)

2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Actualmente es el cuarto año en el que se realiza la cría de *Chilocorus bipustulatus* en el insectario de Almazora sin que se consigan alcanzar unos niveles de producción tan altos como se debería lograr teóricamente (tal y como está calculado en el punto 7.5 del anexo). Es por este motivo que se cree necesaria una revisión y mejora en la cría de este coccinélido en las condiciones del insectario.

Para la mejora de su cría revisaremos todos los factores que intervienen en ella, como son la presa sobre la que se desarrolla, el nivel de la población de *C. bipustulatus* empleado para las puestas de huevos y el medio en el que se desarrolla y evoluciona, observando además qué aspectos de la cría provocan una baja producción de adultos de *C. bipustulatus*. También estudiaremos si pueden sexarse en vida los adultos de este coccinélido ya que, de conocerse, facilitaría los estudios sobre la cría y las observaciones sobre la calidad de las poblaciones obtenidas de este depredador en el insectario.

En este trabajo se llevan a cabo tres experimentos relacionados con la mejora de la cría. El primero de ellos tiene como finalidad observar el ciclo de *C. bipustulatus* criado sobre *Aspidiotus nerii* en las condiciones del insectario de Almazora para tratar de conocer su comportamiento en sus diferentes fases y registrar la duración de cada una así como su ciclo completo. Los otros dos experimentos son actividades para la mejora de su cría. Por un lado cambiando la dosis de introducción de este depredador sobre la presa, buscando de esta forma un mejor equilibrio entre la disposición de alimento y la depredación intraespecífica que nos permita obtener unos niveles de producción más óptimos. Por otro lado, el otro experimento consistirá en ofrecer diferentes estadios de *A. nerii* a *C. bipustulatus*, en concreto se estudian las fases L1, hembra joven y hembra adulta, para comprobar si esto influye en su cría, de qué manera y cuál es mejor para obtener una mayor producción de adultos.

Asimismo, también se intentará sexar los adultos de *C. bipustulatus* en vida a pesar de que varios estudios afirmen que no se puede (Uygun, 1998). Para ello, además de fijarnos en las características físicas de los adultos, también buscaremos alguna diferencia en las pupas que puedan estar relacionadas directamente con el sexo del individuo que emergerá.

Por todo esto, el objetivo de este proyecto es detectar los problemas en la cría de *C. bipustulatus* de forma global e intentar encontrar una solución a los que ya conocemos. Para llevar a cabo la mejora estudiaremos cómo afectan los principales condicionantes de esta cría: el medio y la presa sobre la que se desarrollan así como la cantidad de población inicial para una descendencia adecuada.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Cría de *Aspidiotus nerii*

Antes de abordar los experimentos que se han llevado a cabo en este proyecto debemos conocer una parte fundamental para realizar este trabajo como es la cría de la presa de la que se alimentarán y en la que se desarrollarán las diferentes etapas de *Chilocorus bipustulatus*. En este caso, la presa elegida es *Aspidiotus nerii*, que produce un mayor número de ninfas que *Aonidiella aurantii*, la plaga hacia la que va dirigida la cría de *C. bipustulatus*, y por tanto aporta mayor alimento al depredador. Además, se ha demostrado que su cría sobre este diaspídido es más productiva que sobre otros (Uygun, 1998)

La cría de esta cochinilla se lleva a cabo en el insectario al margen del resto y de forma continua, ya que sirve como alimento para el desarrollo de varios depredadores que también se crían en las instalaciones, como en nuestro caso *C. bipustulatus*.

Material:

- Calabazas *Cucurbita moschata* variedad tipo Cacahuet
- Ninfas de *Aspidiotus nerii*
- Una zona de almacenaje de calabazas
- Una sala climatizada (con climatizador, humidificador y deshumidificador) para la recogida de ninfas neonatas de *Aspidiotus* con luz las 24 horas
- Una sala para la infestación de calabazas con *Aspidiotus*
- Una sala climatizada para evolución de *Aspidiotus*, con una temperatura media de 25°C, una humedad relativa del 60% y un fotoperiodo de 16 horas de luz

Se emplea como material vegetal la calabaza en lugar de, por ejemplo, cítricos como el limón ya que posee una mayor superficie donde fijarse el diaspídido y puede mantenerse en la cría de 3 a 4 meses con bajas mermas por pudrición, manejable, lo que mejora considerablemente su producción.

Metodología:

En primer lugar, seleccionamos las calabazas que veamos en mejor estado, sin manchas que indiquen o puedan dar lugar a una futura pudrición. Una vez hemos elegido las adecuadas, las limpiamos con agua frotándolas con un cepillo o estropajo para que queden libres de cualquier patógeno u otras sustancias del campo. Una vez limpias y secas, se dejan en la cabina de *A. nerii* para que se pongan a la misma temperatura, lo que facilita la adherencia de las ninfas.

Para la recogida de ninfas de *A. nerii*, colocamos calabazas infestadas de este diaspídido en fase de avivamiento en las baldas de una estantería con una lámina de plástico blanco retirable debajo de esta. La habitación deberá estar pintada de negro y con un único foco de luz orientado hacia dicho plástico, con una barrera opaca en medio que proyecte una línea de sombra en él. Las ninfas del piojo blanco son móviles tan sólo durante su primer día de vida, y estas 'saltarán' de las calabazas al plástico en busca de la luz, pero se detendrán en la línea de sombra acumulándose en ella, lo que hace más fácil su recogida. El hecho de que se trate de una especie partenogenética facilitará que tengamos un buen número de ninfas cada día, las cuales se recogerán de la lámina de plástico y se pasarán a un bote cuya tapa estará cubierta por una malla que permitirá 'salar' estas ninfas sobre las calabazas (Figura 20).



Figura 19. Sala de recogida de ninfas.



Figura 20. Salado de ninfas sobre una calabaza.

Para fijar mejor las ninfas de *Aspidiotus* a las calabazas con un papel o un paño seco, lo que da electricidad estática al material vegetal y evita que muchas de estas ninfas se caigan. También anotaremos la fecha de la infestación para poder contabilizar la edad de los individuos presentes en la calabaza ya que todas las ninfas que hemos ‘salado’ cuentan con la misma edad de un día al ser móviles.

Hecho esto, las calabazas infestadas pasan a la sala de evolución, con unas condiciones aproximadas de 25°C de temperatura y un 60% de humedad, donde permanecerán entre 50 y 60 días para completar su ciclo, con una revisión de un par de días por semana para retirar aquellas calabazas que comiencen a pudrirse. Entonces su destino será o la sala de avivamiento, donde producirán ninfas móviles para repetir el proceso, o se ofrecerán a los depredadores que estemos criando, en este caso *C. bipustulatus*.



Figura 21. Sala de cría de *Aspidiotus nerii*

3.2.- Seguimiento del ciclo de *Chilocorus bipustulatus*

Nuestro objetivo en esta parte del proyecto es conocer el ciclo y el comportamiento de *Chilocorus bipustulatus*, por lo que buscaremos que complete su ciclo vital en un entorno controlado y manejable para poder registrarlo sin problemas. Se busca conocer la duración de cada etapa de su evolución y también estudiar el comportamiento de una población de este coccinélido por si apreciamos alguna característica de interés. Para ello hemos planificado tres experiencias.

Primera prueba

Material:

- 40 adultos de *Chilocorus bipustulatus* (> 10 días de vida)
- 15 limones *Citrus limon* con *Aspidiotus nerii* en N1 (40 días de vida)
- Parafina con colorante rojo
- 15 envases con tapa transpirable
- Un evolucionario o jaula
- Papilla nutritiva (miel, azúcar, agar agar, hornillo eléctrico, recipientes para “baño maría”)
- Mecha (vaso de plástico, tapa, agua y bayeta absorbente)
- Una sala climatizada para la cría de *Chilocorus bipustulatus*, con una temperatura media de 25°C, una humedad relativa del 60% y un fotoperiodo de 16 horas de luz

Metodología:

El primer paso es preparar el material vegetal (*Citrus limon*) sobre el que se desarrollará *Aspidiotus nerii*, la presa que utilizaremos para alimentar a los adultos de *C. bipustulatus*. Para esto necesitamos en primer lugar parafinar dos tercios de la superficie de los limones (Figura 22) para así dejar expuesta una parte más pequeña y facilitarnos de esta forma el control tanto del fitófago como del entomófago. Aunque necesitamos 15 para realizar el experimento, preparamos cerca de 30 para prevenir cualquier problema que pudiera darse, como por ejemplo la pudrición.



Figura 22. Limón parafinado

Para llevarlo a cabo ponemos a calentar un recipiente con parafina y colorante rojo hasta que se encuentre en estado líquido. En ese momento, la retiramos del fuego y dejamos que se enfríe un poco para no dañar el material vegetal. Una vez ha bajado su temperatura, sumergimos los limones uno por uno dejando alrededor de un tercio de su

superficie sin cubrir, que será la parte en la que se desarrollará más adelante *A. nerii*. Dejamos que la parafina se seque sobre los limones durante unas 24 horas.

Una vez tenemos los limones parafinados, los llevamos a las cabinas donde tiene lugar la cría y evolución del piojo blanco. Allí, utilizando una huevera como soporte, se reparten sobre la parte descubierta de los limones larvas móviles de *Aspidiotus* de la misma forma que ocurre con las calabazas y se mantienen en dicha cabina durante 20 días para que se desarrollen en N1 y se fijen sobre el material vegetal.



Figura 23. Limones parafinados e infestados de *Aspidiotus nerii* en N1

Pasado este tiempo seleccionamos 15 limones y los repartimos individualmente en pequeños envases numerados. Estos son expuestos en un evolucionario con una mecha de humedad y un recipiente con papilla nutritiva a 40 adultos de *C. bipustulatus* con el objetivo de que pongan huevos en las inmediaciones de los limones dentro de los recipientes.



Figura 24. Disposición de los envases con limones en un evolucionario con *Chilocorus bipustulatus*

Al cabo de una semana se retiran los adultos y se cierran los envases con la tapa transpirable para que comience el desarrollo de los huevos y posteriormente de las larvas, un proceso que iremos registrando casi de forma diaria.

Segunda prueba

Material:

- 40 adultos de *Chilocorus bipustulatus* (> 10 días de vida)
- 15 limones *Citrus limon* parafinados con *Aspidiotus nerii* en N1 (40 días de vida)
- 15 envases con tapa transpirable
- Una caja grande de plástico con tapa transpirable
- Papilla nutritiva (miel, azúcar, agar agar, hornillo eléctrico, recipientes para “baño maría”)
- Papel higiénico
- Mecha (vaso de plástico, tapa, agua y bayeta absorbente)
- Una sala climatizada para la cría de *Chilocorus bipustulatus*, con una temperatura media de 25°C, una humedad relativa del 60% y un fotoperiodo de 16 horas de luz

Metodología:

De nuevo repetimos el mismo proceso descrito anteriormente con la única variación de colocar los envases con limones en una caja grande de plástico ya que en otras experiencias llevadas a cabo en este proyecto se ha demostrado que en espacios más confinados su mortalidad en fase adulta es menor, algo que podría deberse a una pequeña variación de las condiciones ambientales dentro del envase o a una contaminación de la jaula o evolucionario que empleamos con anterioridad. Además, se añade papel higiénico en la base interior de los envases para proporcionar una mayor superficie que pueda facilitar la puesta de huevos.



Figura 25. Distribución de los envases con limones en la caja

Después de una semana, de nuevo se retiran los adultos y se tapan los envases con los limones en los que se aprecien puestas para que comience de esta forma el ciclo biológico.

Tercera prueba

Material:

- 10 adultos de *Chilocorus bipustulatus* (> 10 días de vida)
- 10 limones *Citrus limon* parafinados con *Aspidiotus nerii* en N1 (> 40 días de vida)
- 5 envases con tapa transpirable
- Papilla nutritiva (miel, azúcar, agar agar, hornillo eléctrico, recipientes para “baño maría”)
- Algodón humedecido
- Papel higiénico
- Una sala climatizada para la cría de *Chilocorus bipustulatus*, con una temperatura media de 25°C, una humedad relativa del 60% y un fotoperiodo de 16 horas de luz

Metodología:

Conociendo que la relación macho - hembra en la población de *C. bipustulatus* es aproximadamente del 50% y dado que no se pueden sexar con vida (Uygun, 1998), colocamos dos individuos en cada envase junto a dos limones parafinados con *A. nerii* y con algodón humedecido y papilla nutritiva, todo sobre papel higiénico para facilitar la puesta.

Se dejan ambos adultos por tiempo indefinido en el envase cerrado con tapa transpirable hasta que se observen las primeras puestas, momento en el cual se retiran los adultos para evitar que influyan en el ciclo y se va siguiendo y documentando su evolución a lo largo del tiempo, en nuestro caso anotando entre cuatro y cinco registros semanales. En un principio se pensó en contar y retirar las exuvias de cada muda para ir registrando los cambios de estadio de las larvas, ya que estas quedan fijas sobre el limón cuando estas emergen (Figura 26), pero al poder resultar confuso cuando la población es alta y para evitar los casos de canibalismo que se da en gran parte de los coccinélidos y en el género *Chilocorus* (Ponsonby, 1998), aislaremos cada individuo en un envase con las mismas condiciones (Figura 27).



Figura 26. Larva de *C. bipustulatus* realizando la muda de L2 a L3. Se fija por el extremo posterior y emerge por el extremo anterior



Figura 27. Envase con dos limones con *Aspidiotus nerii* y dos adultos de *Chilocorus bipustulatus*

3.3.- Diferente dosificación de *Chilocorus bipustulatus* en calabazas con *Aspidiotus nerii*

Nuestro objetivo en esta experiencia es conocer con qué densidad de población, expresada como adultos de *Chilocorus bipustulatus* por calabaza, obtendremos mayor cantidad de adultos descendientes de estos. Aunque pueda parecer que a mayor densidad habrá una mayor descendencia, factores como la cantidad de presa para cada individuo o la depredación intraespecífica de este coccinélido hace que quede bastante condicionado.

Actualmente en el insectario de Almazora se está criando con una densidad de 25 adultos por calabaza, por lo que se pensó en realizar una prueba con diferentes dosis de 15, 20 y 30 adultos por calabaza, pero la falta de material y métodos nos obligó a reducir el experimento a tan sólo dos dosis, 15 y 20, descartando la de 30, ya que pensamos que al haber más población, es mucho más probable que tenga lugar el canibalismo entre larvas y, por tanto, sea menos productiva todavía que la dosis de 25.

Se ensayarán dos dosis (una de 15 y otra de 20) con tres repeticiones por cada una, necesitando entonces una de 45 y otra de 60. Repetimos esta experiencia dos veces más en diferentes evolucionarios para poner disponer de datos significativos.

Material:

- 315 adultos (45+60 por cada dosis y repetición) de *Chilocorus bipustulatus* (> 10 días de vida)
- 18 calabazas *Cucurbita moschata* tipo Cacahuet con *Aspidiotus nerii* en N2 a H_j (50 días de vida), usando 3 calabazas por dosis y repetición
- 6 evolucionarios
- Papilla nutritiva (miel, azúcar, agar agar, hornillo eléctrico, recipientes para “baño maría”)
- Mecha (vaso de plástico, tapa, agua y bayeta absorbente)
- Una sala climatizada para la cría de *Chilocorus bipustulatus*, con una temperatura media de 25°C, una humedad relativa del 60% y un fotoperiodo de 16 horas de luz

Metodología:

Para esta experiencia necesitamos que todos los adultos de *C. bipustulatus* que utilicemos sean de la misma edad, por lo que antes de comenzar recogemos todos los adultos presentes en la sala de cría. Al día siguiente recogemos 105 adultos (a ser posible varias decenas más teniendo en cuenta la mortalidad) asumiendo que han emergido ese mismo día y los apartamos en un medio controlado durante 10 días para asegurarnos de su madurez sexual, aunque según algunos estudios los adultos ya pueden fecundar y poner huevos nada más comenzar su fase adulta (Sevinç, 2013).

Paralelamente montamos dos evolucionarios con 3 calabazas infestadas de *A. nerii* cada uno, además de un recipiente con papilla nutritiva y una mecha, lugar donde iremos soltando los individuos adultos de *C. bipustulatus* cuando estén preparados para el experimento.



Figura 28. Evolucionario preparado para llevar a cabo la dosificación de *Chilocorus bipustulatus*

Una vez transcurridos estos 10 días soltamos en un evolucionario tres dosis de 15 adultos, mientras que en el otro la suelta es de tres dosis de 20 adultos, teniendo en total de 45 y 60 respectivamente y criándose de forma paralela. A los 9 días de haber liberado en la jaula a los adultos, los retiramos todos y aguardamos para ver la cantidad de puesta de huevos y la evolución de los mismos, registrando únicamente el número total de adultos que se producen en cada evolucionario.

3.4.- Exposición de diferentes estadios de *Aspidiotus nerii* para *Chilocorus bipustulatus*

Otra forma de tratar de mejorar la producción de la cría de *Chilocorus bipustulatus* es variando la presa ofrecida. Dado que *Aspidiotus nerii* es de momento el mejor alimento para la producción de este coccinélido (Uygun, 1998), el objetivo de esta experiencia es determinar qué estadio de *A. nerii* es más adecuado para ofrecer a *C. bipustulatus*.

Se ensayarán 3 estadios diferentes de *A.nerii*: N1, Hembra joven y Hembra adulta, para ofrecer a los adultos de *C. bipustulatus* donde se desarrollaran su descendencia y 3 repeticiones por estadio.

Material:

- 270 adultos de *Chilocorus bipustulatus* (> 10 días de vida), 30 por estadio a ensayar y repetición
- 3 calabazas *C. moschata* tipo Cacahuet con *A. nerii* en N1 (> 30 días de vida), 1 por repetición
- 3 calabazas *C. moschata* tipo Cacahuet con *A. nerii* en H joven (> 45 días de vida), 1 por repetición
- 3 calabazas *C. moschata* tipo Cacahuet con *A. nerii* en H adulta (> 60 días de vida), 1 por repetición
- 9 tubos de metacrilato tapados por una malla a un costado y por un gorro de baño al otro
- Papilla nutritiva (miel, azúcar, agar agar, hornillo eléctrico, recipientes para “baño maría”)
- Algodón humedecido
- Una sala climatizada para la cría de *Chilocorus bipustulatus*, con una temperatura media de 25°C, una humedad relativa del 60% y un fotoperiodo de 16 horas de luz

Metodología:

En esta experiencia también se necesitan adultos de *C. bipustulatus* con 10 días de edad, por lo que la recogida de individuos se realiza a la vez que en el anterior experimento. La dosis en este experimento será de 30 adultos por calabaza. Cada repetición será 1 calabaza.

Ante la falta de evolucionarios y al no necesitar mucho espacio, optamos por llevar a cabo la prueba en tubos de metacrilato en los que cabe sin problemas el material vegetal que vamos a utilizar. Estos tubos tienen un extremo cubierto por una malla que permite la transpiración y en el otro un gorro de baño ajustado con una goma, que facilita su apertura y cierre para poder manipular su interior sin llegar a ser aparatoso.

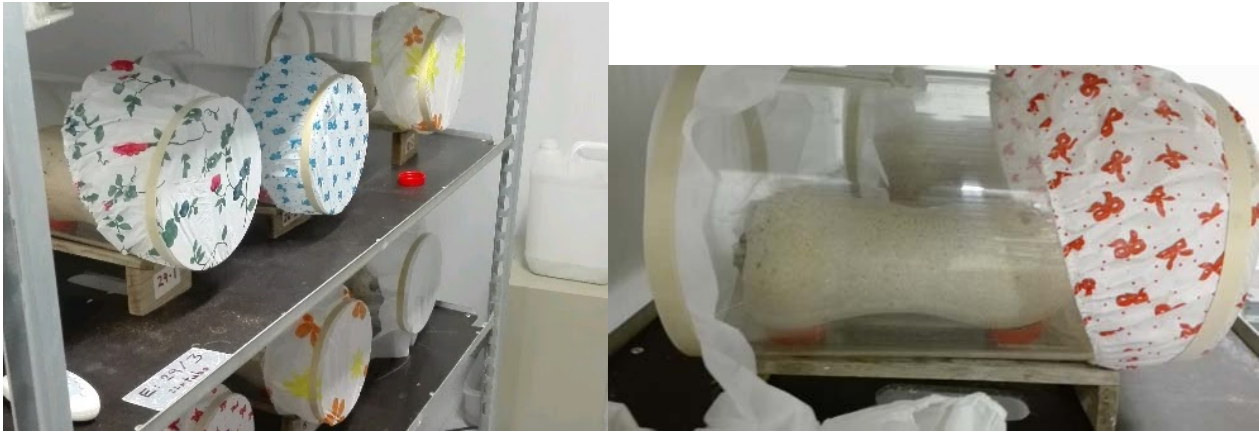


Figura 29. Así quedan dispuestas las calabazas dentro de los tubos

Colocamos cada calabaza en un tubo y en cada uno soltamos una dosis de 30 adultos de *C. bipustulatus*, los cuales deberemos retirar a los nueve días una vez han hecho ya la teórica puesta de huevos para después ir siguiendo periódicamente las evoluciones que presentan en dichas calabazas.

En nuestro caso, el seguimiento se realiza durante 4 o 5 días semanales fijándonos en cuándo se aprecia la emergencia de las primeras larvas, los distintos estadios y cuando comienzan a verse las primeras pupas. Una vez emergen los primeros adultos se retiran de forma diaria y se va registrando para conocer la cantidad total y la evolución de su población.

3.5.- Sexado de *Chilocorus bipustulatus*

Uno de los problemas que presenta la cría de *Chilocorus bipustulatus* es la imposibilidad de poder sexar a los individuos adultos en vida (Uygun, 1998). El hecho de que tan sólo una vez muertos pueda conocerse su anatomía sexual obliga a trabajar 'a ciegas' en el insectario a la hora de querer cruzar a los individuos para que se reproduzcan, suponiendo una relación macho-hembra de 50-50.

A pesar de esto, trataremos de observar cualquier diferencia física característica que pueda indicar que pertenecen a uno u otro sexo. Como hasta ahora tan sólo se tiene constancia de que estos estudios se han realizado en adultos, también vamos a observar las pupas por si pueden presentar también alguna que otra diferencia.

Material:

- 20 adultos de *Chilocorus bipustulatus*
- 7 pupas de *Chilocorus bipustulatus*
- Lupa binocular
- Jabón de manos
- Disolución de KOH al 10%

Metodología:

Seleccionamos un total de 20 adultos de *C. bipustulatus* para en primer lugar tratar de sexarlos en vida, apreciando cualquier diferencia morfológica que se repita que nos indique que pueden pertenecer a diferentes sexo.

Tal y como recoge un estudio de Hattingh y Samways (1994), cuando los adultos de *C. bipustulatus* son pegados por sus élitros sobre una superficie adhesiva, estos tienden a mostrar sus genitales. Para comprobar si esto se cumple y en qué medida, utilizaremos jabón de manos que nos sirva para fijar a los adultos con el abdomen hacia arriba.

Para corroborar de qué sexo es cada individuo una vez muerto, se disolverán posteriormente en una disolución de KOH al 10% a 60-80°C, que permitirá ver con facilidad su aparato reproductor oculto en el abdomen a los pocos minutos.

Por otro lado, recogemos varias pupas de *C. bipustulatus* recién empupadas y procedemos a encontrar cualquier diferencia característica, contando por ejemplo el número de quetas que presenta la exuvia que envuelve a la pupa, las rayas del relieve de la misma, etcétera. Una vez hayan emergido los adultos, los sometemos al mismo método que en el caso anterior para conocer su sexo y ver, en caso de encontrar alguna diferencia en las pupas, si su sexo guarda alguna correlación con estas.

3.6.- Análisis estadístico de los datos

Para llevar a cabo el análisis estadístico de los datos, emplearemos el análisis de la varianza de estos, más conocido como ANOVA. Para ello nos ayudaremos del programa Spss, que nos permitirá realizar este análisis con mayor precisión.

Esto nos servirá para comprobar o no si las medias obtenidas en los experimentos sobre dosificación y exposición son diferentes entre sí en cada caso y, por lo tanto, se trata de observaciones independientes que se han visto influenciadas por un factor, siendo en el primer caso la diferente dosificación de *Chilocorus bipustulatus* y en el segundo caso el diferente estadio de *Aspidiotus nerii* ofrecido como presa al *C. bipustulatus*.

En este análisis ANOVA deberemos obtener la significación del mismo, obteniendo que si es menor del 0.05 (o 5%) entonces no habría evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, que es que las medias son iguales, por lo que si es menor podemos asegurar que se trata de medias diferentes entre ellas con diferencias no provocadas por el azar, es decir, que pertenecen a dos grupos distintos. Lo llevaremos a cabo en los experimentos sobre la diferente dosificación de *C. bipustulatus* sobre *A. nerii* y sobre la exposición de diferentes estadios de *A. nerii* para *C. bipustulatus*.

Posteriormente, si el análisis ANOVA nos confirma que se trata de medias distintas entre sí, realizaremos también con este programa un análisis post hoc con el método de la diferencia significativa mínima de Fisher (LSD) que nos permitirá conocer las diferencias entre las propias medias obtenidas.

4.- RESULTADOS

4.1.- Seguimiento del ciclo de *Chilocorus bipustulatus*

Comenzamos con la primera prueba y al día siguiente de soltar los adultos de *Chilocorus bipustulatus* para que hicieran la puesta, observamos que hasta 30 de los 40 individuos estaban muertos. De todas formas, se decidió seguir con el experimento ya que tan sólo necesitábamos que pusieran algunos huevos para seguir su ciclo desde entonces, no obstante no se presencié ninguna puesta viable y las pocas que tuvieron lugar el huevo terminó perdiendo turgencia a las pocas horas quedando inviable o siendo devorado por los propios adultos de *C. bipustulatus* a pesar de disponer de una buena cantidad de alimento.



Figura 30. Huevo de *Chilocorus bipustulatus* inviable



Figura 31. Adulto de *Chilocorus bipustulatus* devorando un huevo de su misma especie

Tampoco obtenemos resultado alguno con la segunda prueba, no llegando a apreciar ni siquiera puestas inviables.

En el tercer intento por fin consiguen apreciarse puestas a partir de los seis días y además en todos los envases a pesar de haber colocado las parejas sin conocer su sexo. Al detectar problemas anteriormente como la depredación de huevos por parte de los propios adultos de *C. bipustulatus*, decidimos retirarlos nada más detectar las primeras puestas, lo cual no impide casos como el de una hembra adulta que tras poner su huevo se dio la vuelta para comérselo (Figura 32).



Figura 32. Hembra de *Chilocorus bipustulatus* devorando su propio huevo

Al detectar las puestas se seleccionaron siete huevos de los cuales se haría seguimiento. Nada más emerger las larvas, las pasamos a otro envase con las mismas condiciones y de manera individual para poder seguir mejor su ciclo. No obstante, decidimos también seguir la población en los envases originales para comprobar y registrar el comportamiento de las larvas de *C. bipustulatus*.

Al no poder realizar el seguimiento diario de la evolución, en varios casos tuvimos que calcular un tiempo medio, siendo este el principal motivo por el que realizamos tantas repeticiones, obteniendo como resultado de todo el ciclo la siguiente tabla:

Tabla 2. Tiempo medio de cada estadio de *Chilocorus bipustulatus*

Evolucionario	Tiempo medio en cada estadio (días \pm 1)						Total ciclo inmaduro
	Huevo	L1	L2	L3	L4	Pupa	
A	5.5	5	3	4	6.5	5.5	24
B	4.5	5.5	6	6	6	7.5	35
C	3	6	5	4	5	8	28
D	5.5	5.5	6	5.5	6.5	7	31
E	11	5.5	7.5	8	7	10	36
F	6.5	5	6	6.5	8	8	40
G	7	6	5.5	5	8	8	39
Media	6,14	5,57	5,5	5,57	6,71	7,71	31,06

Por otro lado se dejó al resto de la población de *C. bipustulatus* siguiendo su ciclo, tratando de registrar el número total de cada estadio durante cuatro días a la semana, obteniendo la siguiente gráfica:

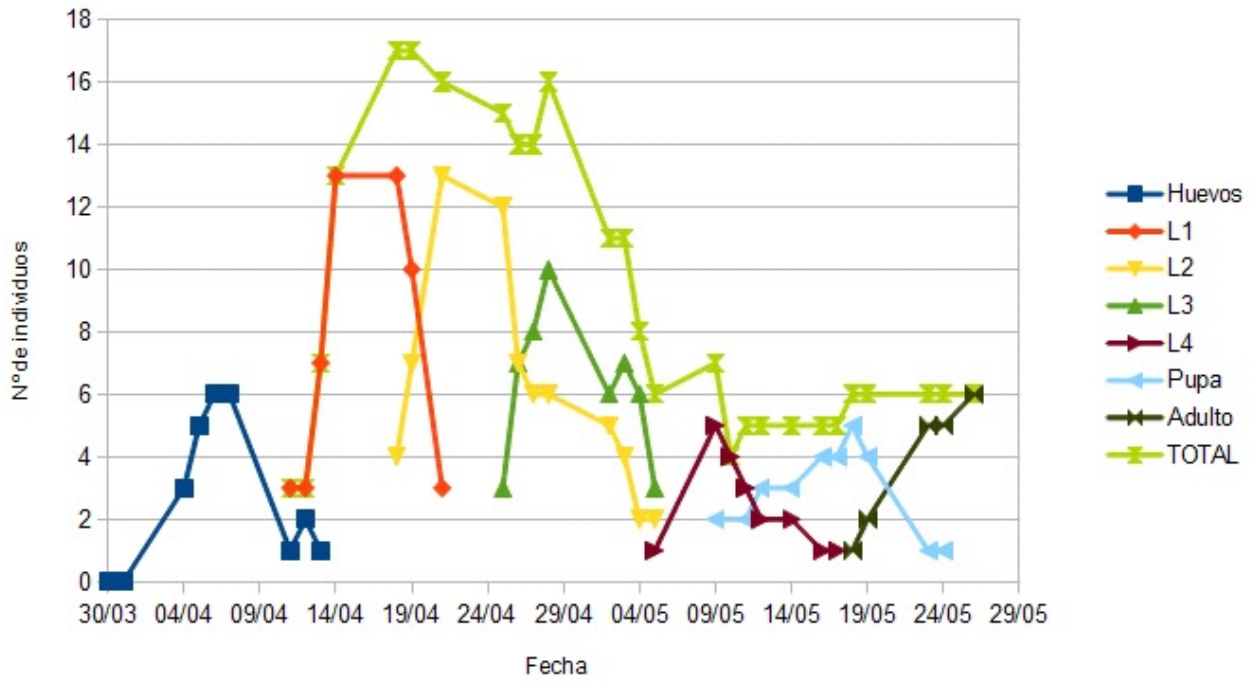


Figura 33. Gráfica con la evolución cuantitativa a lo largo del tiempo de las diferentes fases de *C. bipustulatus*

4.2.- Diferente dosificación de *Chilocorus bipustulatus* en calabazas con *Aspidiotus nerii*

A los 20 días de iniciar esta experiencia observamos que una de las calabazas, en concreto de la tercera repetición donde realizaba la dosificación de 15 adultos por calabaza, comienza a mostrar signos de pudrición, obligándonos a retirarla para que no afecte al resto y condicionando en su totalidad el experimento. Ocurrió lo mismo en la misma repetición pero en la dosificación de 20 adultos por calabaza, teniendo que retirarla también. Al no disponer del material vegetal ni del tiempo necesarios para realizar de nuevo esta repetición, optamos por seguir adelante de todas formas con esta experiencia a pesar de que sus resultados no serán significativos.

Estos son los adultos obtenidos en todas las repeticiones por tres calabazas:

Tabla 3. Adultos recogidos según la dosificación de sus parentales.

Repetición	Dosis de parentales <i>C. bipustulatus</i> (en 3 calabazas)	
	D45	D60
A	37	96
B	36	52
C	13	11
MEDIA	28,67	53

Realizando el análisis de ANOVA obtenemos que la significación de las tres medidas es de 0,398.

Tabla 4. ANOVA realizada con el programa Spss de las medias de adultos de *Chilocorus bipustulatus* recogidos según la dosis de parentales utilizada.

Adultos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	888,167	1	888,167	,892	,398
Intra-grupos	3982,667	4	995,667		
Total	4870,833	5			

Calculamos también cuál sería el resultado obtenido por calabaza en cada repetición. Para esto cogemos los resultados obtenidos anteriormente y los dividimos entre el número de calabazas empleadas en cada repetición, es decir, tres en la repetición A, tres en la B y dos en la C, obteniendo la siguiente tabla:

Tabla 5. Adultos recogidos según la dosificación de sus parentales dividido entre cada calabaza de la repetición.

	Dosis de parentales <i>C. bipustulatus</i> por calabaza	
Repetición	D15	D20
A	12,33	32,02
B	12	13,33
C	6,5	5,5
MEDIA	10,28	18,28

Realizamos el análisis ANOVA para comparar las medias y obtenemos lo siguiente:

Tabla 6. ANOVA realizada con el programa Spss de las medias de adultos de *Chilocorus bipustulatus* recogidos según la dosis de parentales utilizada por calabaza.

Adultos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	66,800	1	66,800	,680	,456
Intra-grupos	392,761	4	98,190		
Total	459,561	5			

Calculamos también el análisis ANOVA de las repeticiones A y B para ver si entre estas dos repeticiones que no dieron experimentalmente ningún problema puede haber diferencias significativas entre sus medias. Hemos de tener en cuenta que al hacerlo con sólo dos repeticiones los resultados que obtengamos no nos desprendemos del error de dispersión y, por tanto, no serán válidos.

Tabla 7. ANOVA realizada con el programa Spss de las medias de adultos de *Chilocorus bipustulatus* recogidos según la dosis de parentales utilizada por calabaza en las repeticiones A y B.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1406,250	1	1406,250	2,904	,230
Intra-grupos	968,500	2	484,250		
Total	2374,750	3			

4.3.- Exposición de diferentes estadios de *Aspidiotus nerii* para *Chilocorus bipustulatus*

Dada la elevada mortalidad de los adultos apartados durante 10 días, nos vimos obligados a reducir la dosis de *Chilocorus bipustulatus* de 30 a 22 individuos por cada calabaza, siendo una cifra que consideramos aceptable para que haya una población equitativa entre machos y hembras en todas las repeticiones.

A los 17 días de la suelta de los adultos comenzamos a apreciar las primeras larvas de *Chilocorus bipustulatus* sobre las calabazas, algo que ocurre de la misma forma en las otras dos repeticiones. Lo mismo ocurre con la emergencia de adultos, observando los primeros a partir del 43 o 44 día después de la suelta.

Tabla 8. Media de los adultos de *Chilocorus bipustulatus* recogidos según el estadio de *Aspidiotus nerii* con el que ha sido alimentado. Siendo N1: Ninfa joven, Hj: Hembra joven y Ha: Hembra adulta.

Repeticón	Estadio de <i>Aspidiotus nerii</i> suministrado		
	N1	Hj	Ha
A	20	58	62
B	32	43	75
C	12	35	52
MEDIA	21,33	45,33	63

Realizando la ANOVA de las tres medias de adultos recogidos obtenemos que su significación es de 0.011:

Tabla 9. ANOVA realizada con el programa Spss de las medias de adultos de *Chilocorus bipustulatus* recogidos según el estadio de *Aspidiotus nerii* con el que ha sido alimentado.

Adultos					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2624,222	2	1312,111	10,620	,011
Intra-grupos	741,333	6	123,556		
Total	3365,556	8			

Dado que el análisis ANOVA nos confirma que las medias obtenidas pertenecen a grupos distintos y sus diferencias no son fruto del azar, procedemos a realizar el análisis post hoc mediante el método LSD de Fisher, obteniendo la siguiente tabla:

Tabla 10. Método LSD de Fisher realizado con el programa Spss aplicado a las medias de adultos de *Chilocorus bipustulatus* recogidos según el estadio de *Aspidiotus nerii* con el que ha sido alimentado.

(I)VAR00002	(J)VAR00002	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
N1	Hj	-24,0000*	9,07581	,038	-46,2077	-1,7923
	Ha	-41,6667*	9,07581	,004	-63,8744	-19,4590
Hj	N1	24,0000*	9,07581	,038	1,7923	46,2077
	Ha	-17,6667	9,07581	,100	-39,8744	4,5410
Ha	N1	41,6667*	9,07581	,004	19,4590	63,8744
	Hj	17,6667	9,07581	,100	-4,5410	39,8744

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 123,556.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel

4.4.- Sexado de *Chilocorus bipustulatus*

No se apreciaron notables diferencias en la morfología de los individuos adultos de *Chilocorus bipustulatus* que sirvan para diferenciar machos y hembras. La única distinción morfológica que se pudo apreciar fue en la terminación de su abdomen, en el último segmento de este (Figura 34), que presenta una mayor vellosidad en las hembras que en los machos, aunque es un criterio algo relativo.

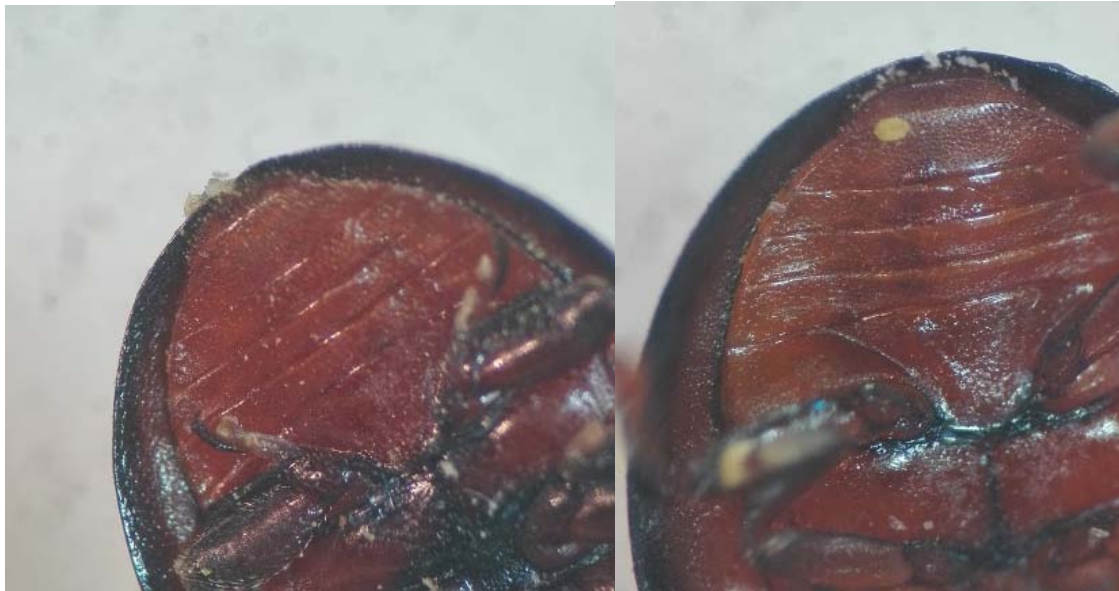


Figura 34. Abdomen de una hembra (i) y un macho (d) de *C. bipustulatus*

Sí se observaron diferencias entre adultos que sirven para sexar en vida a los individuos de *Chilocorus bipustulatus*. Siguiendo las explicaciones de Hattingh y Samways (1994), las hembras de *C. bipustulatus* mostraban su aparato reproductor al ser puestas con el abdomen hacia arriba (Figura 35).



Figura 35. Hembras de *C. bipustulatus* mostrando su aparato reproductor

Por otra parte, los machos en lugar de mostrar su aparato reproductor, se podía apreciar a través de su abdomen una mancha oscura serpenteante en la parte derecha (Figura 36) que es su edeago, el aparato copulador masculino (Figura 37).



Figura 36. Machos adultos de *C.bipustulatus* a los que se le puede apreciar el edeago



Figura 37. Genitalia de macho de *C. bipustulatus*

En el análisis posterior de genitalia por disolución de KOH pudimos corroborar que este método funciona, ya que se apreció el edeago en todos los adultos catalogados como machos, mientras que a las hembras se les pudo apreciar con mayor facilidad su aparato reproductor (Figura 38).



Figura 38. Genitalia de hembra (i) y macho (d) de *C. bipustulatus*

En cuanto a las pupas, sólo se apreció una diferencia en una de las siete empleadas en la experiencia notando una variación cromática en una de ellas (Figura 39), pero finalmente el análisis de genitalia indicó que no había relación alguna con la posterior diferenciación en macho o hembra.



Figura 39. Pupas de *C. bipustulatus* totalmente negra (i) y con marcas anaranjadas (d)

5.- DISCUSIÓN

5.1.- Seguimiento del ciclo de *Chilocorus bipustulatus*

Basándonos en los resultados obtenidos, la duración del ciclo biológico de *Chilocorus bipustulatus* en las condiciones climáticas de 25°C, 60% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16:8 (luz:oscuridad) sobre la presa *Aspidiotus nerii*, ha sido de 31,06 días desde que emerge del huevo hasta que alcanza la fase adulta. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios que datan este ciclo con una duración total de 26.0 ± 0.41 días (Uygun, 1998), 29.0 ± 0.4 días (Hattingh, 1994) o 35.25 ± 0.85 días (Sevinç, 2013). Los datos de los que se disponen en el insectario datan la duración del ciclo inmaduro de *C. bipustulatus* en 28,5 días en las mismas condiciones (Boix, 2012).

Al detectar que su fase de huevo era la más crítica dado el elevado número que terminaban siendo inviables, obligándonos a cambiar en dos ocasiones de metodología para llevar a cabo el seguimiento de su ciclo, decidimos tomar varias medidas para propiciar una correcta y viable oviposición. Una de estas medidas fue la introducción de exuvias de larvas de los propios *Chilocorus* ya que también son usadas para sus puestas (Stansly, 1984), algo que quedó demostrado que se cumplía. De hecho, la primera larva en emerger lo hizo de uno de estos huevos (Figura 40).



Figura 40. Huevo de *C. bipustulatus* en exuvia de una larva de *Chilocorus* antes (i.) y después (d.) de emerger

También optamos por incluir trozos de cartón ondulado ya que suelen servir como refugio para ovipositar y para larvas, algo que también pudo apreciarse que funciona en este caso para favorecer la puesta de huevos de *C. bipustulatus*.



Figura 41. Huevos de *Chilocorus bipustulatus* dentro de cartón ondulado

Apreciamos también puestas bajo los escudos que forma *Aspidiotus nerii*, donde los huevos se encuentran más resguardados y, además, próximos al alimento para cuando eclosionen. El hecho de que el cuerpo de la hembra adulta de *A. nerii* tenga el mismo color que los huevos de *C. bipustulatus* puede complicar su detección.



Figura 42. Vista frontal (i) y lateral (d) de un huevo de *Chilocorus bipustulatus* bajo escudo de *Aspidiotus nerii*

El hecho de que los adultos de *C. bipustulatus* depreden huevos de su misma especie es algo habitual en este género (Ponsonby, 1998), pero no se conocía que también lo hicieran con los de su propia puesta. Esto podría deberse a que al haber estado sometidos a condiciones de superpoblación o escasez de alimentos, instintivamente terminen de esta forma con sus huevos.

Una vez llegó a su fase de larva su desarrollo continuó de forma normal, con unos plazos en cada estadio similares a los que marcaba la bibliografía sobre este coccinélido, tal y como puede apreciarse en la Tabla 2.

En cuanto al comportamiento como población, apreciamos en la Figura 33 cómo la cantidad de huevos encontrados no se corresponde con la cantidad de individuos que apreciamos posteriormente en el evolucionario, siendo mucho menor al total de larvas emergidas. Esto se debe a la dificultad de detectar los huevos tal y como hemos comentado anteriormente. Lo mismo ocurre con el conteo de la población en otras etapas, ya que por su pequeño tamaño es fácil que se oculten y pasen desapercibidas.

Otra de las características que apreciamos es cómo mengua la población total, pasando de un máximo de 17 individuos entre larvas en L1 y L2 hasta una población final de 6 adultos, es decir, una mortalidad del 64.70%. Por lo observado, esto se debe principalmente al canibalismo propio de este género (Ponsonby, 1998), que se acentúa durante las primeras etapas de su ciclo vital, aunque pueden llegar a depredar hasta las pupas (Figura 44). Este comportamiento se aprecia cuando comienza a escasear la presa *Aspidiotus nerii*, a pesar de disponer de papilla nutritiva suficiente, y al no tener tampoco mucha superficie para refugiarse unas larvas de otras.

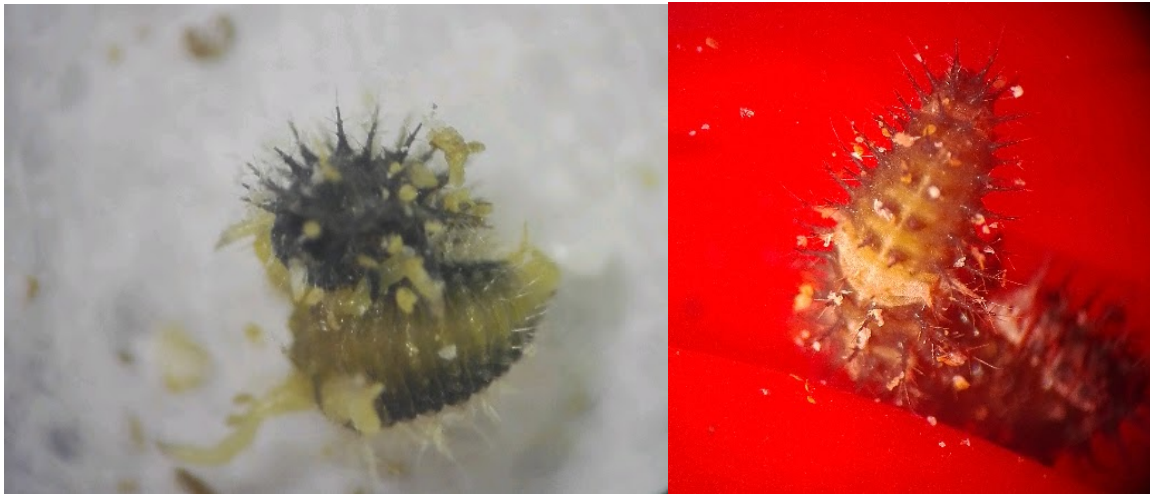


Figura 43. Canibalismo en *C. bipustulatus*. Larvas alimentándose de otras (i.) y de pupas (d.)

Para tratar de minimizar los niveles de canibalismo entre larvas, actualmente en el insectario se colocan tiras de papel arrugado en los evolucionarios con la finalidad de aumentar la superficie de los mismos en los que las larvas pueden ocultarse y empupar sin toparse con otras y correr el riesgo de ser depredadas (Figura 45). Visto lo ocurrido en esta experiencia, sería recomendable añadir también cartón ondulado ya que no sólo facilita refugio para las larvas, sino también para la puesta de huevos, algo que puede aumentar la emergencia de individuos por evolucionario.



Figura 44. Evolucionario de *Chilocorus bipustulatus*

5.2.- Diferente dosificación de *Chilocorus bipustulatus* en calabazas con *Aspidiotus nerii*

Basándonos en el trabajo de Uygun y Elekçioğlu (1998), una hembra de *Chilocorus bipustulatus* es capaz de poner 528.6 huevos a lo largo de su periodo de oviposición en las mismas condiciones que en este proyecto y también sobre *Aspidiotus nerii*, con una mortalidad del 9.6%, es decir, con un total de 477.85 huevos viables del total de los cuales emergerán larvas. Según el mismo estudio, la mortalidad de los estadios inmaduros de *C. bipustulatus* es del 16.6%, por lo que de estas larvas llegarán a la fase adulta un total de 397.81, siendo esta la descendencia de una sola hembra de este coccinélido.

En base a esto, conocemos por el trabajo de Hattingh y Samways (1994) que *C. bipustulatus* puede alimentarse en su fase larval de hasta 2.6 hembras de *Aspidiotus nerii* cada 4 horas, es decir, de 15.6 hembras al día. Si su ciclo larval dura 17.2 días (Uygun, 1998), eso significa que cada larva necesita 268.32 hembras a lo largo de su vida para alimentarse hasta llegar a la fase de pupa. Ahora podemos calcular cuántas hembras de *Aspidiotus nerii* son necesarias para alimentar a la descendencia de una hembra de *C. bipustulatus* en su etapa inmadura multiplicando su descendencia total por el alimento que precisa cada una, es decir, 397.81 larvas por 268.32 hembras de *A. nerii* que necesita cada una, obteniendo un total de 106740.38 hembras de *A. nerii*. Esto significa que para mantener la descendencia ideal de una hembra de *C. bipustulatus* serían necesarias más de dos calabazas infestadas de *A. nerii* ya que cada una puede producir 49325.23 hembras adultas, tal y como está calculado en el punto 7.4 del Anexo de este proyecto.

Todo esto nos hace ver que la dosificación de la cantidad de adultos de *Chilocorus bipustulatus* que empleamos para que se reproduzcan y críen nuevos individuos es esencial para lograr unos buenos niveles de producción. Necesitamos encontrar el equilibrio entre un número suficiente de individuos sin llegar al extremo de que puedan quedarse sin alimento y recurran con más facilidad al canibalismo.

Los resultados obtenidos nos dan una media de 28,67 adultos recogidos en las dosificaciones de 45 parentales por evolucionario y de 53 en las de 60 (Tabla 3), no obstante, su significatividad es de 0,398 (Tabla 4), mucho mayor que 0,05, lo que significa que no hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, que es que las medias son iguales, por lo tanto no tiene sentido plantearse el análisis separando por los distintos grupos, es decir, por las distintas dosificaciones. Esto puede ser debido a lo comentado anteriormente sobre la pudrición de calabazas que nos obligó a realizar la tercera repetición con tan sólo dos en lugar de tres.

Es por este motivo que intentamos rescatar algún dato que pueda indicarnos qué dosificación de *C. bipustulatus* puede ser mejor para su cría. Para esto cogemos los resultados obtenidos anteriormente y los dividimos entre el número de calabazas empleadas en cada repetición, es decir, tres en la repetición A, tres en la B y dos en la C, obteniendo que de media se recogen 10,28 adultos por calabaza en las que hemos soltado 15 parentales y 18,28 por calabaza en la que hemos soltado 20 (Tabla 5). No obstante, como podemos apreciar en la Tabla 6, su significación es más alta (0,456) que antes de realizar la división de los adultos recogidos por calabaza (0,398), por lo que el estudio por separado de ambos grupos de dosis sigue sin ser significativo y no podemos asegurar que se tratan de dos medias distintas, es decir, no podemos afirmar que el

emplear una dosis de 45 adultos (15 por calabaza) y una de 60 (20 por calabaza) produzca diferentes resultados en la producción de adultos de *C. bipustulatus*.

Insistimos de nuevo en que el principal factor para no obtener un resultado determinante en este experimento ha sido el hecho de la pudrición de calabazas en una de las repeticiones, sin embargo, volvemos a intentar encontrar algún indicio sobre qué dosis podría ser mejor observando tan sólo las dos primeras repeticiones y realizando el análisis de ANOVA –a pesar de no cumplir de esta forma las tres repeticiones mínimas para desprendernos del error de dispersión- obtenemos que su significación es de 0,23 (Tabla 7), siendo de nuevo superior al 0,05 que este análisis nos marca como máximo.

La primera conclusión que sacamos de estos resultados es que debe repetirse el experimento, algo que no hemos podido realizar dada la falta de tiempo y material. A parte de esto, los resultados obtenidos nos hacen ver que la cantidad de adultos recogidos ha sido siempre menor, salvo en un caso, a la dosis inicial de los parentales introducida, haciendo que no sólo no se mantenga la población de *C. bipustulatus*, sino que descienda drásticamente. Esto puede deberse al hecho de que optamos por no añadir ninguna toalla de papel para que sirviera como refugio de las larvas para tratar de no añadir más condicionantes en este experimento, ya que en las mismas condiciones y con este mismo material se obtuvieron mayores producciones en comparación a la dosis inicial en el experimento sobre la exposición de diferentes estadios de *Aspidiotus nerii* para *Chilocorus bipustulatus*.

5.3.- Exposición de diferentes estadios de *Aspidiotus nerii* para *Chilocorus bipustulatus*

Como podemos apreciar en los resultados obtenidos en la Tabla 8, el estadio más propicio de *Aspidiotus nerii* para la cría de *Chilocorus bipustulatus* es el de Hembra adulta (Ha), que es el que actualmente se le está administrando a este coccinélido en el insectario de Almazora. La media de adultos recogidos habiéndose alimentado de este estadio es de 63, casi un 50% más que los alimentados con Hembras jóvenes (45.33 adultos) y un 300% más que los alimentados con ninfas en su primer estadio (21.33 adultos). El análisis ANOVA nos muestra que su significación es de 0,011, menor que 0,05 (Tabla 9), por lo que rechazamos la hipótesis nula del contraste de ANOVA, que es que todas las medias son iguales, por lo que podemos afirmar que las medias obtenidas de N1, Hj y Ha son diferentes. No obstante, el análisis LSD de Fisher nos dice que sólo la media de adultos recogidos alimentados con N1 es distinta a las otras, por lo que en este experimento sólo podemos confirmar que hay diferencias en la producción de *C. bipustulatus* entre cuando son alimentadas con ninfas en este estadio y cuando son alimentadas con hembras de *A. nerii*, aunque no podemos distinguir entre Hembra adulta y Hembra joven.

Las Hembras adultas, al tratarse de hembras a punto de avivar ninfas, suponen un mayor alimento tanto por su tamaño como por el hecho de que su descendencia también alimenta a los parentales de *C. bipustulatus*, algo que puede ocurrir con las Hembras jóvenes que durante el periodo de oviposición del coccinélido pueden alcanzar el estadio de Hembras adultas e incluso comenzar a producir ninfas. Este puede ser el motivo por el cual no podemos asegurar que haya una diferencia significativa entre estos dos estadios como alimento. Por otro lado, los adultos de *Chilocorus* a los que se les suministró *A. nerii* en N1 se alimentaron de una presa de menor tamaño, es decir, tuvieron una menor cantidad de comida.

Estos resultados coinciden con el experimento de Sevinç, Karaca y Özgökçe (2013) que ofreciendo el doble de presa *A. nerii* a adultos de *C. bipustulatus* lograron el doble de descendencia. Es decir, a mayor alimento, mayor descendencia, y esto se logra suministrando Piojo blanco en su fase de Hembra adulta o joven.

Además de lograr una mayor descendencia, la presa en Ha y Hj hace que haya más alimento disponible para las larvas que emergen a los pocos días de retirar a los adultos de *C. bipustulatus*, haciendo que sus niveles de canibalismo sean menores y acentuando de esta forma la diferencia de cantidad de población respecto a los otros dos casos.

5.4.- Sexado de *Chilocorus bipustulatus*

A pesar de que distintos artículos y estudios de la bibliografía, como los de Hattingh y Samways (1994) o Uygun y Elekçioğlu (1998), aseguraran que no se pueden sexar en vida los adultos de *Chilocorus bipustulatus*, sí que hemos encontrado un método para poder distinguir machos y hembras.

Este método consiste en pegar por los élitros con jabón a los adultos de *C. bipustulatus*, de tal forma que queden con el abdomen hacia arriba. Cuando se encuentran en esta posición, en un principio permanece inmóvil, pero a los pocos minutos trata de darse la vuelta de cualquier manera, momento en el que si es hembra saca su aparato reproductor al exterior, siendo sencillo su sexado, mientras que el macho no exhibe el suyo. Para cerciorarnos de que un adulto que no muestra su aparato reproductor es macho debemos fijarnos en su se transparente su edeago a través del abdomen, algo que ha ocurrido con todos los machos sexados en esta experiencia a pesar de que la pigmentación de alguno de ellos haya podido dificultar el trabajo.

Uno de los problemas que puede presentar este método es cómo puede afectar el jabón que se emplea para fijar a los adultos, por lo que recomendamos uno orgánico y/o evanescente, que no contenga ningún producto nocivo para este coccinélido y que al cabo del tiempo pierda su efecto adherente.

El sexado de los adultos de *C. bipustulatus* permitirá manejar y planificar mejor las poblaciones en el insectario al conocer la cantidad de machos y hembras de las que se disponen y sueltan.

6.- CONCLUSIONES

Mediante la ejecución de este proyecto y basándonos en los resultados obtenidos así como en las observaciones llevadas a cabo durante la evolución del mismo, llegamos a las siguientes conclusiones.

Sobre el ciclo y la evolución de la cría de *Chilocorus bipustulatus* en el insectario de Almazora:

- Su ciclo inmaduro desde que emerge del huevo hasta que culmina su metamorfosis y se convierte en adulto es de $31,06 \pm 1$ días.
- Dado el elevada canibalismo entre las larvas a pesar de disponer de suficiente alimento, es necesario aportar materiales que doten de una mayor superficie a los evolucionarios en los que se lleve a cabo la cría de este coccinélido, a la que ya se aportan toallas de papel. Sería recomendable además incluir cartón ondulado ya que sirve de refugio tanto para la oviposición como para las larvas y pupas, que son los estadios en los que *C. bipustulatus* es más vulnerable.
- Los adultos de *C. bipustulatus* tienden a devorar los huevos de su propia especie incluso habiéndolos puesto ellos mismos, un comportamiento que todavía no se había registrado según la bibliografía consultada aunque sí en otras especies del mismo género como es el caso de *Chilocorus nigritus* (Ponsonby, 1998). Esto podría deberse al haberse visto sometidos a condiciones de superpoblación en algunos momentos de este proyecto.

En cuanto a la exposición de diferentes estadios de *Aspidiotus nerii* como presa para la cría de *C. bipustulatus*:

- El mejor estadio para llevar a cabo la cría de este coccinélido son los de Hembra adulta y Hembra joven. El motivo puede ser el hecho de que en el momento de soltar los adultos para realizar las puestas, sean más propensos a hacerlo cuando más alimento haya, y en este caso se encuentran con hembras desarrolladas de *A. nerii* que además están avivando ninfas móviles, lo que hace que haya una mayor cantidad de presa que en el estadio de N1. Actualmente el tipo de presa que se suministra a *C. bipustulatus* en el insectario son Hembras adultas de *A. nerii*, por lo que es un tipo de alimento óptimo para la cría de este coccinélido.

Sobre la dosificación de adultos de *C. bipustulatus* sobre *A. nerii*:

- No hemos podido concluir nuestro objetivo ya que esta experiencia se vio condicionada por la pudrición de una de las calabazas. Dado que parece ser el mejor material vegetal para la cría de *A. nerii* dado su tamaño, resistencia y manejabilidad, tan sólo podemos recomendar realizar la experiencia en otra época del año ya que durante la que se llevó a cabo en este proyecto (febrero - mayo) es cuando presentan unos mayores índices de pudrición. En total, de las 27 calabazas empleadas entre todos los experimentos, hasta 11 presentaron síntomas de pudrición al final del proyecto, un 40% del total. Debería repetirse este experimento teniendo en cuenta el cálculo del potencial de cría de una hembra de *C. bipustulatus* además de la cantidad de presa de *A. nerii* que puede proporcionar cada calabaza tal y como hemos calculado.

En referencia al sexado de *Chilocorus bipustulatus*:

- En esta experiencia sí hemos podido sexar en vida los adultos de *C. bipustulatus* a pesar de que varios artículos de la bibliografía afirmaran lo contrario. Fijando a los adultos por los élitros con el abdomen hacia arriba, las hembras sacan su aparato reproductor mientras que a los machos se les transparenta a través del abdomen. Este método, utilizando un material evanescente para fijarlos por los élitros, puede permitir al insectario manejar mejor las poblaciones de *C. bipustulatus* ya que no trabajarán 'a ciegas' sin conocer el género de cada adulto de este coccinélido.

En resumen, la conclusión final en relación a la mejora de la cría de *Chilocorus bipustulatus* sobre *Aspidiotus nerii* para el control de *Aonidiella aurantii* es que se debe proporcionar mayor refugio en los evolucionarios o jaulas donde se lleve su cría en el insectario mediante la adición de materiales como toallas de papel arrugadas y cartón ondulado. Además, también sería recomendable mantener dentro de lo posible restos de exuvias de generaciones anteriores ya que sirven como un buen refugio para la oviposición de huevos viables. Por otra parte, la presa sobre la cual la cría de *C. bipustulatus* es más productiva es *Aspidiotus nerii*, como ya hemos comentado en este proyecto, pero en concreto el estadio sobre el que mayor producción de este coccinélido se consigue es sobre Hembras adultas y jóvenes, bastante más que sobre el primer estadio ninfal, tal y como hemos podido apreciar. Actualmente en el insectario este es el tipo de presa que se le suministra a *C. bipustulatus*.

7.- ANEXOS

7.1.- Resultados completos del seguimiento del ciclo de *Chilocorus bipustulatus***Tabla 11.** Individuos de *Chilocorus bipustulatus* observados en evolucionario según su fase

Tiempo (días)	Fecha	Huevos	L1	L2	L3	L4	Pupa	Adulto	TOTAL
1	04/04	3							
2	05/04	5							
3	06/04	6							
4	07/04	6							
8	11/04	1	3						3
9	12/04	2	3						3
10	13/04	1	7						7
11	14/04		13						13
15	18/04		13	4					17
16	19/04		10	7					17
18	21/04		3	13					16
22	25/04			12	3				15
23	26/04			7	7				14
24	27/04			6	8				14
25	28/04			6	10				16
29	02/05			5	6				11
30	03/05			4	7				11
31	04/05			2	6				8
32	05/05			2	3	1			6
36	09/05					5	2		7
37	10/05					4			4
38	11/05					3	2		5
39	12/05					2	3		5
41	14/05					2	3		5
43	16/05					1	4		5

44	17/05					1	4		5
45	18/05						5	1	6
46	19/05						4	2	6
50	23/05						1	5	6
51	24/05						1	5	6
53	26/05							6	6

7.2.- Resultados completos de la diferente dosificación de *Chilocorus bipustulatus* en calabazas con *Aspidiotus nerii*

Tabla 12. Adultos recogidos de *C. bipustulatus* con parentales en dosis de 45 adultos

Tiempo (días)	D45 (A)	D45 (B)	D45 (C)	Media	Acumulado
43	0	1	0	0,33	0,33
44	0	0	0	0	0,33
45	0	15	0	5	5,33
46	0	8	2	3,33	8,67
47	12	4	8	8	16,67
48	5	5	1	3,67	20,33
49	2	3	1	2	22,33
50	8	0	1	3	25,33
51	6	0	0	2	27,33
52	0	0	0	0	27,33
53	1	0	0	0,33	27,67
54	1	0	0	0,33	28
55	1	0	0	0,33	28,33
56	0	0	0	0	28,33
57	0	0	0	0	28,33
58	0	0	0	0	28,33
59	0	0	0	0	28,33
60	1	0	0	0,33	28,67
Total	37	36	13		
Media total	28,67				

Tabla 13. Adultos recogidos de *C. bipustulatus* con parentales en dosis de 60 adultos

Tiempo (días)	D60 (A)	D60 (B)	D60 (C)	Media	Acumulado
43	5	0	1	2	2
44	8	0	1	3	5
45	5	11	0	5,33	10,33
46	5	8	5	6	16,33
47	15	6	2	7,67	24
48	18	8	1	9	33
49	9	12	0	7	40
50	2	4	1	2,33	42,33
51	6	1	0	2,33	44,67
52	2	1	0	1	45,67
53	3	1	0	1,33	47
54	4	0	0	1,33	48,33
55	6	0	0	2	50,33
56	4	0	0	1,33	51,67
57	2	0	0	0,67	52,33
58	2	0	0	0,67	53
Total	96	52	11		
Media total	53				

7.3.- Resultados completos de la dosificación de diferentes estadios de *Aspidiotus nerii* para *Chilocorus bipustulatus*

Tabla 14. Cantidad recogida de adultos de *Chilocorus bipustulatus* alimentados con *Aspidiotus nerii* en N1

Tiempo (días)	N1 (A)	N1 (B)	N1 (C)	Media	Acumulado
43	0	0	0	0	0
44	0	1	0	0,33	0,33
45	0	0	1	0,33	0,66
46	0	4	0	1,33	2
47	0	0	0	0	2
48	17	6	0	7,66	9,66
49	2	5	8	5	14,66
50	1	3	3	2,33	17
51	0	3	0	1	18
52	0	0	0	0	18
53	0	0	0	0	18
54	0	0	0	0	18
55	0	7	0	2,33	20,33
56	0	0	0	0	20,33
57	0	3	0	1	21,33
Total	20	32	12		
Media total	21,33				

Tabla 15. Cantidad recogida de adultos de *Chilocorus bipustulatus* alimentados con *Aspidiotus nerii* en Hj

Tiempo (días)	Hj (A)	Hj (B)	Hj (C)	Media	Acumulado
43	0	0	3	1	1
44	2	4	6	4	5
45	0	0	7	2,33	7,33
46	0	4	0	1,33	8,67
47	0	0	0	0	8,67
48	41	4	0	15	23,67
49	3	10	17	10	33,67
50	4	7	2	4,33	38
51	0	4	0	1,33	39,33
52	0	0	0	0	39,33
53	7	0	0	2,33	41,67
54	0	0	0	0	41,67
55	1	4	0	1,67	43,33
56	0	3	0	1	44,33
57	0	3	0	1	45,33
Total	58	43	35		
Media total	45,33				

Tabla 16. Cantidad recogida de adultos de *Chilocorus bipustulatus* alimentados con *Aspidiotus nerii* en Ha

Tiempo (días)	Ha (A)	Ha (B)	Ha (C)	Media	Acumulado
43	0	0	4	1,33	1,33
44	12	6	11	9,67	11
45	0	0	22	7,33	18,33
46	0	14	0	4,67	23
47	0	0	0	0	23
48	41	25	0	22	45
49	4	10	11	8,33	53,33
50	1	9	1	3,67	57
51	3	7	3	4,33	61,33
52	0	0	0	0	61,33
53	0	0	0	0	61,33
54	0	0	0	0	61,33
55	0	4	0	1,33	62,67
56	1	0	0	0,33	63
57	0	0	0	0	63
Total	62	75	52		
Media	63				

7.4.- Cálculo de la densidad de *Aspidiotus nerii* en Ha por calabaza

Para conocer la densidad de hembras adultas de *Aspidiotus nerii* por calabaza primero debemos calcular el área del material vegetal y después tomar la densidad de este diaspídido en zonas acotadas para luego extrapolarla y obtener la cantidad total estimada.

En primer lugar, dada la forma irregular de las calabazas, asumimos que son cilíndricas para simplificar los cálculos. Tomamos las medidas de longitud (L) y radio (r) de la calabaza y empleamos la fórmula del área del cilindro:

$$A = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot (L+r)$$

Una vez tengamos el área de la calabaza calculada, tomamos la densidad en cinco puntos distintos del material vegetal. Para que estas cinco medidas sean en la misma superficie nos ayudamos de un tubo cuya área es de 1.039 cm², dentro del cual contaremos el número de hembras adultas de *A. nerii* que encontremos. Después de realizar las cinco medidas, sacamos la media de estas para conocer cuántas hay en la superficie que nos facilita el tubo y lo extrapolamos a la superficie de toda la calabaza.

Para nuestra experiencia hemos realizado este cálculo con tres calabazas aleatorias infestadas de hembras adultas de *Aspidiotus nerii*:

Tabla 17. Medidas de las tres calabazas empleadas para la media de su superficie

Calabaza	Dimensiones (cm)	Medidas Ha (n)
A	L=23, r=4.75	a=70, b=100, c=50, d=110, e=11
B	L=16, r=6	a=90, b=25, c=80, d=15, e=40
C	L=19, r=5	a=50, b=110, c=100, d=20, e=90

Aplicando la fórmula del área del cilindro obtenemos que las distintas áreas son 282.20 cm², 829.38 cm² y 753.98 cm² respectivamente, por lo que el área media de estas tres calabazas es de 803.85 cm².

Por otro lado, la densidad media de hembras adultas de *A. nerii* en cada calabaza es de 68.2 Ha/1.039 cm², 50 Ha/1.039 cm² y 74 Ha/1.039 cm², haciendo una densidad media de 64.07 Ha/1.039 cm², que podemos simplificar en 61.66 Ha por cada centímetro cuadrado.

Ahora sólo queda multiplicar la densidad media por la superficie media de las calabazas: 61.66 Ha/cm² x 803.85 cm² = 49565.4 Hembras adultas de *Aspidiotus nerii* por calabaza.

7.5.- Cálculo del potencial de cría de cada evolucionario

El método de cría que se lleva en el insectario de Almazora se basa en exponer 8 calabazas infestadas de *Aspidiotus nerii* en Ha a 200 *Chilocorus bipustulatus* adultos (25 por calabaza) durante 7 días para que realicen la oviposición. Una vez transcurrido este tiempo, se retiran todos los adultos y se deja que las puestas vayan evolucionando.

Basándonos en esto, calculamos primero cuántas hembras adultas de *A. nerii* depredan los adultos de *C. bipustulatus* por calabaza durante ese periodo. Teniendo en cuenta que 1 sólo adulto se alimenta de 14.4 hembras de este diaspídido por día (Hattingh, 1994), 25 lo harán de 360, y estos durante 7 días (periodo que están los adultos sobre las calabazas) se comerán un total de 2520, que deberemos restarlo al total disponible en la calabaza: $49325.23 - 2520 = 46805.23$ Ha de *A. nerii* que irán directamente para el desarrollo de las larvas.

Sabiendo que cada larva de *C. bipustulatus* come hasta 15.6 Ha de *A. nerii* al día y teniendo en cuenta que su ciclo hasta empupar es de 17.2 días, se alimenta de 268.32 durante toda su fase larvaria. Dividimos el total de presa restante entre esta cifra para obtener cuántas larvas podemos alimentar por calabaza (calculado en el punto 7.4 del anexo): $46805.23 / 268.32 = 174.44$ larvas en total. Al haber ocho calabazas por evolucionario, multiplicamos esta cifra para conocer el potencial de cría de cada una, que es de 1395.52 larvas que se convertirán en adultos.

Según los datos del insectario, de media se recogen 738.75 larvas por evolucionario, poco más de la mitad de lo que se debería recoger teóricamente tal y como hemos calculado anteriormente.

8.- BIBLIOGRAFÍA

- Agustí, M.** 1999. Citricultura. Ed. Mundi - Prensa.
- Balachowsky A.** y Mesnil, L. 1935. Les insectes nuisibles aux plantes cultivées. París. 474-542.
- Bodenheimer, F.S.** 1951. Citrus Entomology. Ed. Dr. W. Junk, The Hague, The Holanda.
- Boix, I. y García, A.** 2012. Métodos de cría masiva de insectos útiles: 51-62.
- Bono, R.** 1991. Variedades cultivadas.- Historia de la naranja. Ed. Prensa Valenciana SA.
- Compere, H.** 1961. The red scale and its insects enemies. Hilgardia, 31: 173-278.
- DeBach, P.** 1964. Biological control of insect pests and weeds. Rienhold. New York. 844pp.
- DeBach, P.** y Rosen, D. 1991. Biological control by natural enemies. Cambridge University Press. London, Reino Unido.
- Ebeling, W.** 1959. Subtropical fruit pests. University of California, Division of Agricultural Science, Berkeley, California, EEUU.
- García-Marí, F.** 2012. Plagas de los Cítricos: Gestión Integrada en países de clima mediterráneo. Ed. Phytoma.
- Gómez Clemente, F.** 1943. Cochinillas que atacan a los agrios en la región de Levante. Bol. Pat. Veg. Ent. Agr., XIII. 299-328.
- Hattingh, V.** y Samways, M. 1994. Physiological and Behavioral Characteristics of *Chilocorus* spp. (Coleoptera: Coccinellidae) in the Laboratory Relative to Effectiveness in the Field as Biocontrol Agents.
- Núñez, E.,** Tizado, E.J. y Nieto, J.M. 1992. Coccinélidos (Col.: *Coccinellidae*) depredadores de pulgones (Hom. *Aphididae*) sobre plantas cultivadas de León. Bol. San. Veg. Plagas, 18: 765-775.
- Ponsonby, D.J.** y Copland, M.J.W. 1998. Environmental influences on fecundity, egg viability and egg cannibalism in the scale insect predator, *Chilocorus nigritus*. Biocontrol 43: 39-52.
- Quayle, H.J.** 1941. Insects of citrus and other subtropical fruits. Comstock, Ithaca, New York, EEUU.
- Samways, M.,** Osborn, R., Hastings, H., Hattingh, V. 1999. Global climate change and accuracy of prediction of species' geographical ranges: establishment success of introduced ladybirds (Coccinellidae, *Chilocorus* spp.) worldwide. Journal of Biogeography, 26, 795–812

Sevinç, S., Karaca, I. y Özgökçe, M. 2013. Lifetable parameters of *Chilocorus bipustulatus* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae) on two different prey [*Aspidiotus nerii* (Bouché) (Hemiptera: Diaspididae)] densities. Integrated Control in Citrus Fruit Crops, IOBC-WPRS Bulletin Vol. 95: 121-129.

Stansly, P. 1984. Introduction and evaluation of *Chilocorus bipustulatus* for control of *Parlatoria blanchardi* in date groves of Niger. Entomophaga: 29-39.

Uygun, N. y Elekçioğlu, N.Z. 1998. Effect of three diaspididae prey species on development and fecundity of the ladybeetle *Chilocorus bipustulatus* in the laboratory. BioControl 43: 153-162.

Willard, J.R. 1974. The rhythm of emergence of crawlers of California red scale *Aonidiella aurantii* (Mask.), (Homoptera: Diaspididae). Aust. J. Zool. 49-65.

Williams, D.J. y Watson, G. 1988. The Scale Insects of the Tropical South Pacific Region: The armoured scales (Diaspididae). Ed. CAB International Institute of Entomology.

Memorias del Control Biológico de los Insectarios de Almazora y Silla. Años 2011, 2012, 2013 y 2014.

Fauna Europaea, 2013 (última modificación):
<http://www.faunaeur.org/index.php> (02/06/2016)

9.- AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar toda la ayuda que me han prestado Maribel Deval y Nacho Boix, además de por soportarme, enseñarme una profesión y devolverme la ilusión por la carrera, al igual que a todo el Servicio de Sanidad Vegetal de Almassora. También a mi tutor Josep Jaques, Tatiana Pina y otros profesores de la UJI, así como a Ferrán García-Marí y Cristina Navarro de la UPV.

A mis padres y mis abuelos. A Fran, Manu, Diego, Jesús y otros compañeros con los que no habría llegado hasta aquí. A Pove para que no me mate, Adrián, Xenxo y antiguos compañeros de la UV, así como también a Julio, del que tampoco me puedo olvidar.

No sería justo no agradecer su inestimable ayuda a las miles de ninfas y hembras de *Aspidiotus nerii* así como a las centenares de larvas y adultos de *Chilocorus bipustulatus* gracias a los cuales ha sido posible este trabajo.

