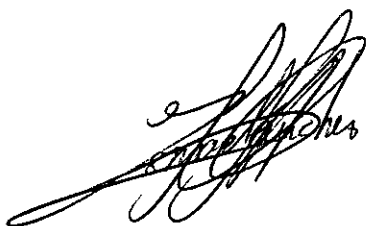


T 24417

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL I

Biología y control de
Tyrophagus putrescentiae (Schrank, 1781)
(Astigmata: Acaridae), plaga de productos almacenados

Memoria presentada por Ismael Ignacio Sánchez Ramos
para optar al grado de Doctor



618264505

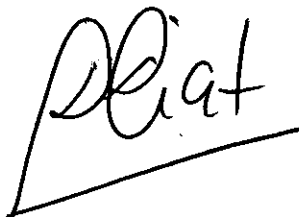
Fdo.: Ismael Ignacio Sánchez Ramos 125042841

Vº Bº del Director



Fdo.: Pedro Castañera Domínguez
Profesor de Investigación del C.S.I.C.
Dpto. Biología de Plantas
C.I.B., C.S.I.C., Madrid

Vº Bº del Tutor



Fdo.: Darío Díaz Cosín
Catedrático de Invertebrados no Artrópodos
Dpto. Biología Animal I
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid

24417



BIBLIOTECA

ÍNDICE

RESUMEN	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1. 1. Los ácaros como plagas de productos alimenticios almacenados.....	2
1. 1. 1. Daños e importancia económica	3
1. 1. 2. El problema de los ácaros en la producción de jamón curado.....	5
1. 2. El ácaro del moho, <i>Tyrophagus putrescentiae</i> (Schrank, 1781).....	6
1. 2. 1. Clasificación y descripción	7
1. 2. 2. Ecología de las poblaciones de <i>T. putrescentiae</i>	8
1. 3. Efecto de factores físicos sobre la biología de los ácaros de productos almacenados	10
1. 3. 1. Efecto de la temperatura.....	11
1. 3. 2. Efecto de la humedad relativa.....	11
1. 3. 3. Modelización de la biología frente a factores físicos.....	12
1. 3. 3. 1. Modelización de la tasa de desarrollo frente a la temperatura	13
1. 4. Métodos de control de ácaros de productos almacenados.....	16
1. 4. 1. Físicos.....	17
1. 4. 2. Químicos.....	19
1. 4. 3. Feromonas.....	21
1. 4. 4. Control biológico	22
1. 5. Métodos alternativos de control.....	24
1. 5. 1. Productos de origen botánico: monoterpenos.....	24
1. 5. 2. Plaguicidas potenciales.....	25
1. 5. 3. Inhibidores de proteasas y lectinas	28
1. 5. 3. 1. Los inhibidores de proteasas	29
1. 5. 3. 2. Las lectinas	30
1. 6. Objetivos de la tesis.....	31

2. MATERIAL Y MÉTODOS	32
2. 1. Ácaros	32
2. 1. 1. <i>Tyrophagus putrescentiae</i>	32
2. 1. 2. Otras especies	33
2. 2. Bioensayos	34
2. 2. 1. General	34
2. 2. 2. Efecto de factores físicos sobre la biología de <i>T. putrescentiae</i>	36
2. 2. 2. 1. Temperatura.....	36
2. 2. 2. 2. Humedad relativa	39
2. 2. 3. Evaluación de la actividad acaricida de monoterpenos componentes de aceites esenciales de plantas	40
2. 2. 3. 1. Productos ensayados.....	40
2. 2. 3. 2. Ensayos	40
2. 2. 3. 3. Determinación de la actividad acetilcolinesterasa.....	43
2. 2. 4. Ensayos de actividad de plaguicidas	44
2. 2. 4. 1. Productos ensayados.....	44
2. 2. 4. 2. Ensayos	45
2. 2. 5. Ensayos de actividad de inhibidores de proteasas y lectinas	46
2. 2. 5. 1. Ensayos con <i>T. putrescentiae</i>	46
2. 2. 5. 2. Ensayos con ácaros del polvo.....	46
2. 3. Métodos estadísticos	47
2. 3. 1. Modelización	47
2. 3. 1. 1. Supervivencia de estados inmaduros.....	47
2. 3. 1. 2. Modelos de desarrollo	48
2. 3. 1. 3. Modelos polinomiales.....	50
2. 3. 1. 4. Modelos de fecundidad	50
2. 3. 1. 5. Modelo de supervivencia en adultos	51
2. 3. 2. Análisis estadísticos	51
3. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA BIOLOGÍA DE <i>T. putrescentiae</i>	54
3. 1. Introducción	54
3. 2. Resultados	56
3. 2. 1. Efecto sobre el desarrollo de los estados inmaduros.....	56
3. 2. 1. 1. Mortalidad.....	56
3. 2. 1. 2. Duración del desarrollo	58

3. 2. 1. 3. Modelización del desarrollo de los estados inmaduros	60
3. 2. 2. Efecto sobre la reproducción y el desarrollo de los adultos	66
3. 2. 2. 1. Modelización de parámetros reproductores y longevidad	66
3. 2. 2. 2. Curvas de fecundidad	67
3. 2. 2. 3. Curvas de supervivencia	73
3. 2. 3. Tablas de vida de <i>T. putrescentiae</i> en relación a la temperatura.....	73
3. 3. Discusión	78
3. 3. 1. Desarrollo de los estados inmaduros	78
3. 3. 2. Modelización del desarrollo de los estados inmaduros	82
3. 3. 3. Reproducción y desarrollo de los adultos	85
3. 3. 4. Desarrollo de las poblaciones de <i>T. putrescentiae</i>	89
4. INFLUENCIA DE LA HUMEDAD RELATIVA EN LA BIOLOGÍA DE	
<i>T. putrescentiae</i>	92
4. 1. Introducción	92
4. 2. Resultados	94
4. 2. 1. Efecto sobre el desarrollo de los estados inmaduros.....	94
4. 2. 1. 1. Mortalidad.....	94
4. 2. 1. 2. Duración del desarrollo	94
4. 2. 2. Efecto sobre la reproducción y el desarrollo de los adultos	96
4. 2. 2. 1. Parámetros reproductores y longevidad.....	96
4. 2. 2. 2. Curvas de fecundidad	97
4. 2. 2. 3. Curvas de supervivencia	99
4. 2. 3. Tablas de vida de <i>T. putrescentiae</i> en relación a la humedad relativa	100
4. 3. Discusión	102
4. 3. 1. Desarrollo de los estados inmaduros	102
4. 3. 2. Reproducción y desarrollo de los adultos	105
4. 3. 3. Desarrollo de las poblaciones de <i>T. putrescentiae</i>	107
5. ACTIVIDAD ACARICIDA DE MONOTERPENOS SOBRE <i>T. putrescentiae</i>	108
5. 1. Introducción	108
5. 2. Resultados	110
5. 2. 1. Selección de compuestos activos	110
5. 2. 2. Rectas probit de mortalidad vs dosis	111
5. 2. 3. Efecto del sexo y el estado de desarrollo en la mortalidad	113

5. 2. 4. Efecto ovicida.....	113
5. 2. 5. Evaluación de la inhibición de la acetilcolinesterasa.....	114
5. 3. Discusión	115
6. EVALUACIÓN DEL EMPLEO DE PLAGUICIDAS	
PARA EL CONTROL DE <i>T. putrescentiae</i>	119
6. 1. Introducción	119
6. 2. Resultados	120
6. 2. 1. Efecto sobre la mortalidad y el desarrollo de los estados inmaduros.....	120
6. 2. 1. 1. Mortalidad.....	120
6. 2. 1. 2. Duración del desarrollo	121
6. 2. 2. Efecto sobre la fecundidad y la fertilidad	122
6. 3. Discusión	127
6. 3. 1. Azadiractina	127
6. 3. 2. Hexaflumurón.....	128
6. 3. 3. Spinosad	129
6. 3. 4. Piriproxifén	130
6. 3. 5. Halofenocida.....	131
7. EFECTO DE LA INGESTIÓN DE INHIBIDORES DE PROTEASAS Y LECTINAS	
SOBRE <i>T. putrescentiae</i>	134
7. 1. Introducción	134
7. 2. Resultados	136
7. 2. 1. Efecto de inhibidores de proteasas digestivas sobre <i>T. putrescentiae</i>	136
7. 2. 2. Efecto de lectinas sobre <i>T. putrescentiae</i>	138
7. 2. 3. Efecto de inhibidores de proteasas digestivas en dos especies de ácaros oligófagos, <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> y <i>D. farinae</i>	138
7. 3. Discusión	140
7. 3. 1. Efecto de inhibidores de proteasas digestivas y lectinas sobre <i>T. putrescentiae</i>	140
7. 3. 2. Comparación del efecto de inhibidores de proteasas digestivas en <i>T. putrescentiae</i> y en <i>D. pteronyssinus</i> y <i>D. farinae</i>	141
8. CONCLUSIONES	143
9. BIBLIOGRAFÍA	146

RESUMEN

Se han estudiado diferentes aspectos de la biología de *T. putrescentiae* en condiciones de laboratorio. En primer lugar, se ha determinado el efecto de siete temperaturas constantes (10, 15, 20, 25, 30, 32,5, y 34°C) sobre la supervivencia y el desarrollo de los estados inmaduros. El estado de larva fue el más susceptible a las temperaturas extremas con porcentajes de mortalidad de 93,6% y 53,7% a 10 y 34°C. La mortalidad del periodo de desarrollo total a esas temperaturas fue de 98,5% y 63,3%, respectivamente. El periodo de desarrollo total osciló entre 106,0 días a 10°C y 7,2 días a 30°C, siendo en todos los casos significativamente mayor para las hembras respecto a los machos.

Los modelos de desarrollo aplicados presentaron distinto comportamiento en la descripción de la relación existente entre la tasa de desarrollo y la temperatura. Los modelos de Logan III y Lactin proporcionaron los mejores ajustes, estimando en 5,0 y 6,8 °C, el umbral inferior y en 36,1 y 36,3 °C, el superior. La temperatura óptima de desarrollo predicha se sitúa alrededor de los 30°C.

La función Maxima y la función Weibull acumulada fueron empleadas para describir la evolución de la fecundidad diaria media y la fecundidad acumulada media en relación al tiempo para las diferentes temperaturas consideradas. Finalmente, la ecuación Weibull se usó para ajustar la probabilidad de supervivencia de machos y hembras a lo largo del tiempo a las siete temperaturas en estudio. Los coeficientes de determinación obtenidos en todos los casos fueron muy elevados.

Las temperaturas extremas aumentaron el periodo de preoviposición y disminuyeron el número de huevos puestos por hembra. El periodo de oviposición se incrementó linealmente a medida que la temperatura disminuía. La capacidad reproductora de *T. putrescentiae* fue muy alta, siendo capaz de poner entre 15 y 20 huevos diariamente a temperaturas favorables. La probabilidad de supervivencia fue

mayor para los machos respecto a las hembras, mostrando diferentes patrones tanto en relación al tiempo como a la temperatura.

La alta capacidad reproductora, junto con la reducida mortalidad de los estados inmaduros y la corta duración del desarrollo hace que la tasa intrínseca de crecimiento (r_m) de este ácaro sea muy elevada. La temperatura óptima de desarrollo de sus poblaciones se obtuvo tras aplicar el modelo de Lactin a la r_m , estimándose en 29,5°C. A esta temperatura las poblaciones de *T. putrescentiae* se duplican en tan solo 1,8 días. Los límites de desarrollo se estimaron en 10,4°C y 34,8°C. Estos resultados muestran la gran capacidad multiplicativa de este ácaro y explican su potencial como plaga a la vez que constituyen una importante información de cara a su control integrado.

Se estudiaron tres humedades relativas (70, 80 y 90%), determinándose el efecto sobre la supervivencia y el desarrollo de los estados inmaduros y sobre la reproducción y supervivencia de los adultos. A 70% HR se produjo cerca de un 60% de mortalidad en el estado de huevo y un 100% en las larvas. Los adultos presentaron una longevidad inferior a los 4 días y no fueron capaces de poner huevos. Para las otras dos humedades, *T. putrescentiae* mostró patrones diferentes de desarrollo y reproducción. A 80% HR la duración del desarrollo se prolongó respecto a 90% HR. El estado de larva fue el más susceptible debido a su menor tamaño y, por tanto, a su mayor relación superficie/volumen que le hace ser más proclive a la pérdida de fluidos a través de la superficie corporal. La capacidad reproductora también se reduce bruscamente al disminuir la humedad relativa, pasando la tasa de producción de huevos de 24 huevos a 90% HR a solamente 6 a 80% HR. Estos factores hacen que la capacidad multiplicativa de las poblaciones de *T. putrescentiae* se vea enormemente afectada por la humedad, lo que resulta de gran interés para el control de este ácaro.

Se ha evaluado la actividad acaricida por fumigación de 13 componentes de aceites esenciales de plantas, de los cuales siete mostraron una alta eficacia. Los compuestos seleccionados fueron pulegona, mentona, fenchona, linalol, eucaliptol α -terpineno y γ -terpineno. La respuesta mortalidad vs dosis de hembras de *T. putrescentiae*, se evaluó por medio de la obtención de rectas de regresión probit, estimándose las CL50 y CL90 para cada monoterpeno. Los compuestos más efectivos fueron pulegona, mentona, linalol y fenchona, con CL50 inferiores a los 14 μ l de aire.

Los machos y las larvas presentaron una mayor susceptibilidad al efecto de estas sustancias ya que se obtuvieron mortalidades cercanas al 100% para las CL50 calculadas previamente para las hembras. Por otra parte, no se observó efecto ovicida por fumigación con los monoterpenos seleccionados. También se ha evaluado el efecto inhibidor de la acetilcolinesterasa de los productos ensayados para determinar si este mecanismo está relacionado con su modo de acción. Los porcentajes de inhibición obtenidos no superaron el 35% en ningún caso a una dosis 150 veces mayor que la CI50 estimada para un insecticida organofosforado. Este hecho permite desestimar el citado modo de acción como el efecto principal de los productos considerados. El modo de acción de estas sustancias parece estar relacionado con procesos de deshidratación, lo que a su vez explicaría la mayor mortalidad de los individuos de menor tamaño.

Se ha evaluado el efecto por ingestión de diferentes reguladores del crecimiento de insectos y de un plaguicida neurotóxico de origen natural sobre larvas y adultos de *T. putrescentiae* en condiciones de laboratorio: hexaflumurón (inhibidor de la síntesis de quitina), halofenocida (análogo de la hormona de la muda), piriproxifén (análogo de la hormona juvenil), azadiractina (actiecdisoide de origen natural) y spinosad (neurotóxico). Ninguno de los productos tuvo efecto a las dosis de 10 y 100 ppm, mientras que a partir de 1.000 ppm se produjo un alargamiento del desarrollo de los estados inmaduros para todos los productos. A 1.000 ppm, el halofenocida produjo un 46% de mortalidad, concentrada principalmente en el estado de tritoninfa y a 10.000 ppm, este producto junto con el piriproxifén produjeron un porcentaje de mortalidad cercano al 100% en el estado de larva. Estos productos se evaluaron frente a adultos para determinar su efecto sobre su supervivencia y capacidad reproductora. El piriproxifén no tuvo ningún efecto mientras que el halofenocida redujo drásticamente la fecundidad a las dosis de 1.000 y 10.000 ppm. Asimismo, este producto incrementó la mortalidad de los adultos hasta valores próximos al 80%. El modo de acción de este compuesto sobre *T. putrescentiae* no parece estar relacionado con su condición de análogo de la hormona de la muda de insectos. La baja actividad acaricida observada para los diferentes plaguicidas ensayados hace que sean poco indicados para el control de las poblaciones de este ácaro.

Finalmente, se analizó el efecto de diferentes inhibidores de proteasas añadidos a la dieta de *T. putrescentiae* y de dos especies de ácaros oligófagos,

Dermatophagoides farinae y *D. pteronyssinus*. Los ensayos se iniciaron en el estado de larva a dosis de 10.000 ppm de inhibidores puros o de mezclas de éstos. En el caso de *T. putrescentiae*, las larvas no vieron afectada su supervivencia con ninguno de los inhibidores empleados y sólo los inhibidores de serín proteinasas STI, SBBI y LBI produjeron retrasos en el desarrollo. Estos inhibidores presentaron un efecto sinérgico cuando fueron añadidos en mezclas en la misma proporción a una dosis de 10.000 ppm. El mismo efecto se produjo al añadirse junto con el inhibidor de aminopeptidasas, bestatina y/o con el de carboxipeptidasas, PCPI, y cuando estos dos fueron añadidos en ausencia de los anteriores. En el caso de *D. farinae* y *D. pteronyssinus*, el inhibidor de cisteín proteinasas E-64 produjo un 100% de mortalidad sobre los estados de desarrollo de estos ácaros, lo que contrasta con el resultado obtenido para *T. putrescentiae*. La mayor plasticidad enzimática de esta especie derivada de su carácter polífago le hace menos susceptible al efecto de los inhibidores de proteasas.

INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de la humanidad, la necesidad de almacenar alimento para el futuro originó la aparición de un nuevo ecosistema, artificial y relativamente simple, que fue rápidamente colonizado y aprovechado por gran cantidad de organismos de todo tipo. Diversas clases de alimentos, desde grano y legumbres hasta carnes y toda una serie de productos crudos o procesados, particularmente ricos en nutrientes y originalmente destinados para el consumo humano o animal, se constituyeron en una excelente oportunidad para estos organismos que, a partir de ese momento, se vieron ineludiblemente asociados a la actividad humana.

Aunque las pérdidas durante los periodos de almacenamiento son considerablemente menores que aquéllas que se producen durante los procesos de producción y/o cosecha, los valores implicados son realmente grandes a escala mundial (Benz, 1987). En estas valoraciones no se incluyen los costes de las medidas preventivas establecidas para el control de las plagas, de tal forma que las pérdidas serían de mayor índole sin la utilización de dichas medidas. Un factor más a tener en cuenta es la depreciación de los productos en el comercio debido a razones estéticas, pero en mayor grado debido a la creciente apreciación por parte de los consumidores del daño potencial que las plagas representan.

Las plagas más importantes de los alimentos almacenados son de carácter cosmopolita y están compuestas principalmente por artrópodos, presentando en general un alto potencial de crecimiento y reproducción. Dentro de los artrópodos, las plagas de alimentos almacenados pertenecen a la clases Insecta y Arachnida, siendo todos los arácnidos implicados representantes de la subclase Acari (Benz, 1987).

En la actualidad, la protección de los productos alimenticios almacenados se basa en el uso de plaguicidas que mantengan a las plagas dentro de unos límites tolerables. Sin embargo, existe un creciente interés en el desarrollo de métodos que ayuden a mejorar la seguridad ambiental y la de los manipuladores de alimentos, y que permitan evitar la aparición de resistencias a los plaguicidas y minimizar los niveles de los residuos en los productos tratados. Por otra parte, existen numerosos productos alimenticios cuyas características de consumo impiden la utilización de plaguicidas para eliminar las plagas que disminuyen su valor comercial. En este contexto, las nuevas aproximaciones al problema acentúan las medidas preventivas y la integración de métodos de control físicos, mecánicos, biológicos y biotecnológicos con un uso de plaguicidas más juicioso y apropiado (Benz, 1987). En los distintos sistemas de almacenamiento es necesario además la identificación y estudio de las plagas potenciales y el desarrollo de técnicas que ayuden a prevenir, detectar y controlar estas plagas (Adler, 1998).

1.1. LOS ÁCAROS COMO PLAGAS DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS ALMACENADOS

Los Acari constituyen uno de los grupos más amplios y biológicamente más diversificados dentro de los arácnidos, presentando una distribución mundial y rivalizando con los insectos en la colonización de los hábitats terrestres y acuáticos. Algunos ácaros de vida libre viven sobre alimentos almacenados donde a menudo se multiplican rápidamente alcanzando la categoría de plagas. Taxonómicamente los ácaros de productos almacenados pertenecen a los órdenes Astigmata, Cryptostigmata, Prostigmata y Mesostigmata (Zdarkova, 1991a). El orden Astigmata contiene las especies de mayor importancia económica, infestando un amplio espectro de alimentos almacenados tales como grano, queso, carne de pescado, frutos secos y otros productos (Hughes, 1976). Los ácaros pertenecientes a los otros órdenes son depredadores, parásitos, o se alimentan de hongos (Zdarkova, 1991a), mientras que los Astigmata

pueden alimentarse directamente de los productos que contaminan o bien de los hongos asociados a los mismos (Hughes, 1976; Zdarkova, 1991a). Sin embargo, del gran número de especies de ácaros astigmátidos existente sólo relativamente unos pocos pueden ser considerados como plagas de importancia (Hughes, 1976). Los alimentos atacados por los ácaros astigmátidos deben proporcionar elevados niveles de humedad relativa ambiental, condición necesaria para el desarrollo de estos organismos (Cunnington, 1976; Hughes, 1976), ya que al presentar una cutícula fina y débilmente esclerotizada (Evans, 1992) tienen tendencia a perder fluidos corporales a través de la misma (Wharton y Furumizo, 1977; Wharton et al., 1979).

Por otra parte, si bien la importancia médica de los ácaros astigmátidos se centra principalmente en los denominados ácaros del polvo, al ser agentes causantes de enfermedades alérgicas, los ácaros astigmátidos de productos alimenticios almacenados también han sido descritos como agentes etiológicos de enfermedades de este tipo (Hallas, 1991; Zdarkova, 1991a; Van Hage-Hamsten y Johansson, 1992), existiendo casos de reacciones alérgicas por manejo o ingestión de alimentos infestados por ácaros (Cuthbert et al., 1979; Terho et al., 1985; Armentia et al., 1994; Matsumoto et al., 1996). Un ejemplo bien conocido es el denominado "asma del panadero", producido por la infestación de ácaros en la harina.

1. 1. 1. Daños e importancia económica

Las infestaciones de ácaros astigmátidos en los productos alimenticios almacenados causan cuantiosas pérdidas económicas y problemas de salud por distintos motivos. Al vivir y alimentarse en alimentos almacenados, estos ácaros pueden producir pérdidas directas de peso en los productos que contaminan (Zdarkova y Reska, 1976; Sinha, 1979), aunque quizá tenga mayor importancia la pérdida de valor comercial de los alimentos y los problemas de higiene derivados de su mera presencia (Zdarkova, 1991a). Otra fuente de contaminación se debe a su capacidad de actuar como medio de transporte de hongos y bacterias (Griffiths et al, 1959; Hughes, 1976).

Existe una gran variedad de productos atacados por los ácaros astigmátidos, tanto de origen vegetal como animal. En el caso del grano almacenado, la alimentación directa sobre este producto por parte de los ácaros produce pérdidas en peso así como disminución de la capacidad germinativa del mismo, debido al daño producido en el

embrión por parte de determinadas especies (Jeffrey, 1976; Sinha, 1979; Parkinson, 1990). Sinha (1979) estableció el papel que los ácaros desempeñan en la alteración del grano y apuntaba la gran capacidad de estos organismos como transformadores energéticos desde los productores hasta los consumidores secundarios (depredadores). Diversos autores han citado contaminaciones y pérdidas en grano almacenado en distintas partes del mundo (Krantz, 1961; Cusack et al., 1976; Griffiths et al., 1976; Lehtinen y Oskala, 1991; Mahmood, 1992; Emmanouel et al., 1994).

Las infestaciones de ácaros también son comunes en productos de fabricación tradicional como determinados tipos de quesos. Wilkin (1979) indica cómo estos ácaros han estado tradicionalmente asociados a la fabricación y almacenamiento de quesos, existiendo referencias de ello desde el siglo XVI. En Inglaterra son particularmente graves los ataques a los quesos tradicionales de Stilton, Cheshire y Cheddar, donde hasta un 25% de cada queso puede ser destruido por los ácaros en ausencia de medidas de control (Wilkin, 1979). En las infestaciones más graves, que generalmente se producen en los quesos más maduros, la actividad de los ácaros origina la acumulación de cadáveres, exuvias, heces, trozos de alimento y huevos formando un polvo de color ligeramente marrón que puede alcanzar una profundidad de 2 cm. (McClymont Peace, 1983). En España, la elaboración del tradicional queso asturiano de Cabrales también presenta problemas asociados con la degradación de los quesos por infestaciones de ácaros, produciendo severas pérdidas económicas (observación personal).

Otros productos alimenticios tales como cacahuetes (Zdarkova y Reska, 1976), cocos (Shave, 1984) o bebidas fermentadas (Quintero y Acevedo, 1991b) también son infestados y deteriorados por los ácaros, produciendo pérdidas económicas. Entre las referencias a alimentos atacados por ácaros destaca un informe de Filipinas donde se citan más de 25 tipos infestados por estos organismos (Corpuz-Raros et al., 1988). Sin embargo, su acción no sólo se restringe a productos alimenticios ya que otra serie de productos como bulbos de plantas ornamentales (Wilkin et al., 1976; Czajkowska y Kropczynska, 1991), sustrato de cría de aves de corral (Brady, 1970; Quintero y Acevedo, 1991a) cultivos de hongos de laboratorio (Bolaños et al., 1991) e incluso colmenas (Chmielewski, 1991) también son susceptibles de sufrir daños por la acción de los ácaros.

1. 1. 2. El problema de los ácaros en la producción de jamón curado

Las condiciones físicas de alta humedad y temperatura que se producen durante la maduración y almacenamiento del jamón curado favorecen el desarrollo de ácaros, los cuales constituyen uno de los problemas más importantes de los que deben afrontarse en la industria del jamón curado (Arnau y Guerrero, 1994; Guerrero y Arnau, 1995; Arnau, 1998). Este problema es de especial importancia en la elaboración de jamones de larga curación como el jamón ibérico curado, cuya producción esta basada en procedimientos de elaboración tradicional. La simple presencia de estos organismos a menudo reduce la capacidad de comercialización del producto además de provocar la pérdida de alrededor de un 10% de unidades en el proceso de elaboración de los jamones (Arnau et al., 1987). La mayoría de los ácaros identificados en los secaderos de jamón ibérico pertenecen a la especie *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Astigmata: Acaridae) aunque otras especies también pertenecientes al orden Astigmata, tales como *Tyrolichus casei* Oudemans, *Tyrophagus longior* (Gervais) y *Tyrophagus palmarum* Oudemans (Acaridae), *Carpoglyphus lactis* (L.) (Carpoglyphidae), *Glyciphagus domesticus* (De Geer) (Glyciphagidae) (Arnau y Guerrero, 1994) y *Tyroborus lini* Oudemans, (Acaridae) (Estrada-Peña et al., 1981) han sido también citadas infestando jamón curado. Asimismo, la presencia de otras especies de ácaros no astigmátidos tales como *Cheyletus eruditus* (Schrank) y *Cheletomorpha lepidopterorum* (Shaw) (Prostigmata: Cheyletidae) y *Androlaelaps casalis casalis* (Berlese) (Mesostigmata: Dermanyssidae) y *Blattisocius dentriticus* (Berlese) (Mesostigmata: Ascidae) también ha sido confirmada en secaderos de jamón ibérico curado (Arnau y Guerrero, 1994), aunque éstas son especies depredadoras asociadas al desarrollo de ácaros astigmátidos de los que se alimentan.

La elevada humedad y temperatura existentes durante el proceso de curado del jamón ibérico son consideradas como esenciales por parte de los productores españoles de forma que resulta improbable que puedan ser modificadas sustancialmente para controlar las poblaciones de ácaros sin alterar las características organolépticas de este producto. De hecho, se han citado alteraciones de la calidad de la carne debido al empleo de métodos físicos para controlar las infestaciones (Arnau y Guerrero, 1994). El desarrollo de un procedimiento de eliminación de los ácaros por medio de la combinación de atmósferas modificadas de CO₂ con alteraciones de la presión (Guerrero et al., 1991), aunque inicialmente resultó efectivo, se reveló inaplicable a escala industrial por el efecto negativo del proceso sobre la calidad de los jamones.

Por otra parte, la eliminación de plagas por medio del empleo de métodos químicos aplicados directamente sobre alimentos preparados para consumo inmediato está absolutamente prohibida por parte de la legislación española, según queda expresamente indicado en el artículo 10, apartado 3.3c del Real Decreto 3349/83. La aplicación de plaguicidas sobre los jamones provocaría su acumulación sobre el producto, especialmente en la grasa, constituyendo un grave peligro para los consumidores (Guerrero et al., 1991).

Por tanto, actualmente no existe ningún método que combine al mismo tiempo eficacia contra todos los estados de desarrollo de los ácaros, facilidad de aplicación, inocuidad para el consumidor y ausencia de efectos dañinos en el jamón (Arnau, 1998). Hoy en día, el mejor método de lucha es la prevención a través de la ejecución de un buen plan de saneamiento, regulación de la temperatura y la humedad relativa dentro de los márgenes admitidos por los productores, aislamiento de los secaderos y tratamiento de los secaderos vacíos por medio de la aplicación de productos químicos por parte de empresas especializadas (Arnau et al., 1987).

1. 2. EL ÁCARO DEL MOHO, *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)

Una de las especies más importantes de ácaros de productos alimenticios almacenados es el ácaro astigmátido *Tyrophagus putrescentiae*, comúnmente conocido como ácaro del moho. Esta especie presenta una distribución cosmopolita y ha sido identificada infestando una gran diversidad de alimentos almacenados con un alto contenido en lípidos y proteínas tales como huevos secos, jamón, carne de arenque, queso y diferentes tipos de frutos secos (Hughes, 1976). Su presencia en grano también ha sido confirmada por diversos autores (Griffiths et al., 1976; Sinha, 1979; Pankiewicz-Nowicka y Boczek, 1984; Van Hage-Hamstem y Johansson, 1992).

Por otra parte, la presencia de este ácaro en los alimentos almacenados ha sido indicada como causante de distintos tipos de procesos alérgicos entre consumidores y manipuladores de alimentos. Cuthbert et al., (1979) detectaron casos de asma y rinitis debido a distintas especies de ácaros de almacén entre las que se encontraba *T. putrescentiae*; Tehro et al. (1985) observaron casos de rinitis entre ganaderos de vacuno producidas por esta especie y Armentia et al. (1994) asociaron un caso de

rinoconjuntivitis y eczemas a la manipulación de jamones infestados también por *T. putrescentiae*. Asimismo, Matsumoto et al. (1996) describió dos casos de anafilaxis sistémica por ingestión de alimentos contaminados con este ácaro.

1. 2. 1. Clasificación y descripción

La posición taxonómica de *T. putrescentiae* es como sigue a continuación (Evans, 1992):

PHYLLUM:	Arthropoda
CLASE:	Arachnida
SUBCLASE:	Acari
SUPERORDEN:	Actinotrichida
ORDEN:	Astigmata
DIVISION:	Acaridia
SUPERFAMILIA:	Acaroidea
FAMILIA:	Acaridae
GÉNERO:	<i>Tyrophagus</i>
ESPECIE:	<i>putrescentiae</i> (Schrank, 1781)

Originalmente este ácaro fue denominado como *Acarus putrescentiae* Scrank, 1781, hasta que Oudemans en 1924 estableció el género *Tyrophagus* y su especie tipo *T. putrescentiae* (Robertson, 1959). Las sinonimías existentes indicadas por Hughes (1976) son *Tyrophagus longior* var *castellanii* Hirst, 1912; *T. noxius* Zachvatkin, 1941; y *T. brauni* E. and F. Türk, 1957.

Además de ácaro del moho (mold mite) (Kramer y McGregor, 1976; Leal et al., 1989), otros nombres vulgares empleados para denominar a esta especie son ácaro del queso (cheese mite) (Kuwahara et al., 1975), ácaro de los hongos (mushroom mite) (Sinha y Mills, 1968) y ácaro de la copra (copra mite) (Ignatowicz, 1981).

Esta especie es un ácaro de pequeño tamaño de cutícula blanquecina lisa y brillante (Figura 1. 1.), en la que el grado de coloración de los apéndices depende de la naturaleza del alimento. Como el resto de ácaros astigmátidos presenta el cuerpo recubierto de setas sensoriales aunque éstas no se proyectan de manera tan rígida

350 μm , mientras que las hembras son sensiblemente más grandes con una longitud del idiosoma entre 320 y 415 μm (Hughes, 1976). Los huevos son blanquecinos y ovalados, con unas dimensiones de $120 \pm 7 \mu\text{m}$ de largo por $66 \pm 3 \mu\text{m}$ de diámetro (Callaini y Mazzini, 1984). Presenta tres estados preimaginales móviles: larva, protoninfa y tritoninfa. La larva, como en general en todos los ácaros, presenta tres pares de patas, lo que la diferencia fácilmente de los estados ninfales ya que éstos poseen cuatro. Durante la vida de cada estado móvil, el cuerpo va aumentando en volumen, de forma que en la parte final del desarrollo se encuentra completamente distendido, dando lugar a una fase quiescente de aspecto vítreo en la que cesa la alimentación y la locomoción (Evans, 1992). Durante esta fase tiene lugar la síntesis de la nueva cutícula del estado siguiente, la cual se origina con unos plegamientos característicos de las cutículas extensibles que permiten el aumento en tamaño de los sucesivos estados.

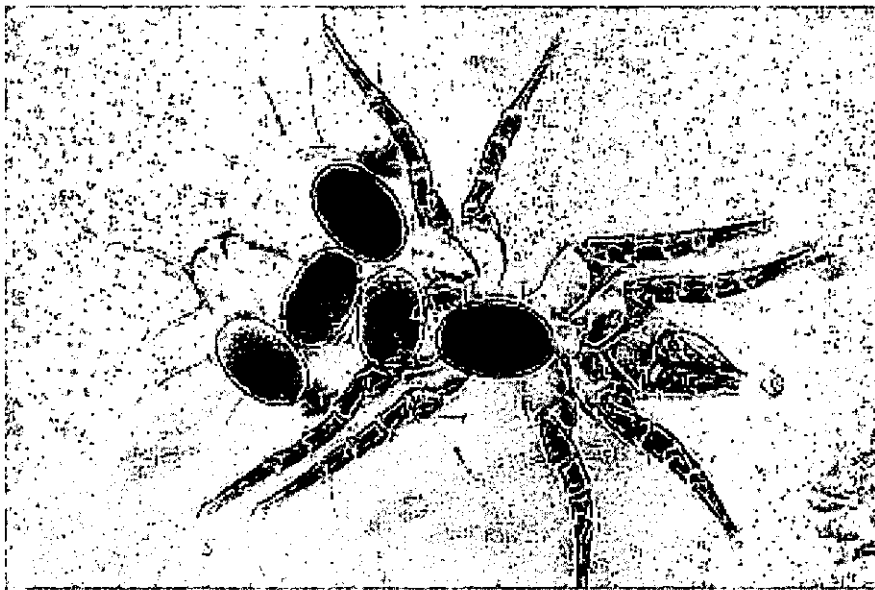


Figura 1. 1. Fotografía realizada al microscopio óptico de una hembra de *T. putrescentiae*.

1. 2. 2. Ecología de las poblaciones de *T. putrescentiae*

Las teorías actuales acerca de la evolución de los ácaros astigmátidos plagas de alimentos almacenados consideran que el origen de estos organismos se encuentra en hábitats naturales especializados o efímeros, que se encontraban espacial y/o temporalmente restringidos y donde desarrollaron unos hábitos alimenticios fungívoros (Oconnor, 1979). La habilidad para explotar dichos hábitats depende de la capacidad

para dispersarse y localizar tales recursos, de forma que en los astigmátidos ancestrales la solución fue el desarrollo de la foresia, forma de comensalismo que consiste en el transporte físico de un organismo en el cuerpo de otro. En los Astigmata evolucionaron especializaciones morfológicas y comportamentales en el segundo estado ninfal de desarrollo, la deutoninfa, para dar lugar a un estado de resistencia especializado para la foresia llamado hipopo (Oconnor, 1982). Sin embargo, en muchas especies de ácaros astigmátidos esta capacidad se perdió al colonizar ambientes más estables y predecibles (Oconnor, 1982). La asociación con otro tipo de hábitats como madrigueras de roedores (Krantz, 1961) o nidos de aves (Woodroffe, 1953) pudo entonces permitir el transporte de los ácaros sobre estos animales hacia el nuevo hábitat constituido por los alimentos almacenados, tal y como Sinha (1979) argumenta en el caso de los almacenes de grano.

Así, como el resto de ácaros astigmátidos de productos almacenados, *T. putrescentiae* sufrió un proceso de dispersión desde sus restringidos hábitats originales hasta los hábitats naturales que ahora ocupa, desde los que a su vez fue capaz de colonizar el nuevo ecosistema representado por los alimentos almacenados. Oconnor (1982) indica que presumiblemente los hábitats originales de las especies del género *Tyrophagus* fueran nidos de himenópteros, encontrándose actualmente en gran variedad de hábitats naturales, aunque de manera preferente en suelos de pastos y en deshechos (Oconnor, 1979). Entre los hábitats naturales donde se ha detectado la presencia de *T. putrescentiae* se encuentran suelos de cultivos de alfalfa y trigo, donde además es la especie dominante (Smrz y Catská, 1987; Smrz y Jungová, 1989), pilas de grano y paja (Griffiths, 1960), nidos de aves (Asmat y Kader, 1990) y colmenas (Chmielewski, 1991). Robertson (1959) en su revisión del género *Tyrophagus* proporcionó una extensa lista de la diversidad de hábitats de esta especie citados hasta entonces.

Como se ha comentado previamente, este proceso de colonización de hábitats estables y ampliamente distribuidos junto con una mayor tolerancia a condiciones ambientales variables fue lo que, según Oconnor (1979 y 1982), llevó a algunos linajes del orden Astigmata a perder la capacidad de originar formas foréticas de resistencia o hipopos, tal y como sucede en *T. putrescentiae*.

En sus hábitats naturales, los ácaros del género *Tyrophagus* son considerados como consumidores de material vegetal en descomposición y de microflora (Luxton y Petersen, 1982). En consonancia con esta afirmación, diversos autores señalan a

T. putrescentiae como una especie principalmente fungívora y/o saprófaga (Sinha y Mills, 1968; Hughes, 1976; Sinha, 1979). Numerosos estudios han establecido las relaciones alimenticias existentes entre *T. putrescentiae* y las especies de hongos presentes en hábitats naturales (suelos) y/o en alimentos almacenados ocupados por este ácaro (Griffiths et al, 1959; Sinha y Mills, 1968; Pankiewicz-Nowicka y Boczek, 1984; Smrz y Catská, 1987; Abdel-Sater et al., 1995). Las preferencias indicadas por dichos autores se centraron en determinadas especies de hongos de los géneros *Eurotium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Mucor* y *Cylindrocarpon*.

Sin embargo, debido a la diversidad de sustratos alimenticios sobre los que *T. putrescentiae* es capaz de desarrollarse, sería posible considerar a esta especie como omnívora (Hughes, 1976; Pankiewicz-Nowicka y Boczek, 1984; Walter et al., 1986). Incluso existen citas de *T. putrescentiae* como especie depredadora de nemátodos (Walter et al., 1986; Bilgrami y Tahseen, 1992; Bilgrami, 1994) y de otros organismos, como *Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber (Coleoptera: Chrysomelidae) (Brust y House, 1988).

Este amplio espectro alimenticio indica la plasticidad enzimática y la capacidad adaptativa de *T. putrescentiae* (Smrz y Catská, 1987), lo que a su vez permite comprender su potencial como plaga de productos alimenticios almacenados.

1. 3. EFECTO DE FACTORES FÍSICOS SOBRE LA BIOLOGÍA DE LOS ÁCAROS DE PRODUCTOS ALMACENADOS

Resulta obvio que la magnitud del daño producido por una población de ácaros de productos almacenados es proporcional al tamaño de la población y que el futuro daño que pueda causar depende de la rapidez con que dicha población pueda incrementarse. Esta capacidad de incremento viene determinada por una serie de factores bióticos y abióticos siendo los más importantes dentro de estos últimos la temperatura y la humedad relativa (Cunnington, 1976; Zdarkova, 1991a). Otro factor físico que también influye es el fotoperiodo (Zdarkova y Voracek, 1993), aunque su incidencia en las poblaciones de ácaros de alimentos almacenados es escasa debido a que generalmente estos organismos viven en condiciones de completa oscuridad durante la totalidad de su ciclo vital (Zdarkova y Voracek, 1993).

1. 3. 1. Efecto de la temperatura

Como en todo organismo ectotérmico, la actividad de los ácaros de los productos almacenados viene determinada por la temperatura ambiental. Dentro de la gama favorable de temperaturas en la que las poblaciones de ácaros astigmátidos pueden desarrollarse, su capacidad de incremento puede ser tal que en condiciones óptimas multipliquen varias veces el tamaño de la población en pocos días. Así, Cunnington (1976) indica como a 25°C, y una humedad relativa del 90%, las poblaciones de *Lepidoglyphus destructor* (Schrank, 1781) (Astigmata: Glycyphagidae), *Acarus siro* L., 1758 (Astigmata: Acaridae) y *T. putrescentiae* potencialmente podrían multiplicarse 4, 7 y 10 veces respectivamente en una semana. Esta gran capacidad de incremento se reduce considerablemente a medida que la temperatura se aleja, por encima o por debajo, de ese rango óptimo de desarrollo. En general, bajo condiciones extremas de temperatura diversos procesos fisiológicos se ven fatalmente alterados (Fields, 1992) de forma que si dichas condiciones se mantienen a lo largo del tiempo las poblaciones tenderían a desaparecer. En este sentido, la determinación de los umbrales térmicos superior e inferior de desarrollo sobrepasados los cuales las poblaciones de una especie plaga no pueden desarrollarse resulta fundamental para el establecimiento de estrategias eficaces de control.

1. 3. 2. Efecto de la humedad relativa

Los ácaros astigmátidos de los productos almacenados son más tolerantes a los cambios en temperatura que a los cambios en humedad relativa ambiental (Zdarkova, 1991a), presentando tendencia a perder fluidos a través de la superficie corporal (Wharton y Furumizo, 1977; Wharton et al., 1979). Para contrarrestar este efecto, los ácaros astigmátidos han desarrollado un mecanismo de absorción de la humedad ambiental basado en las denominadas glándulas supracoxales, órganos osmorreguladores situados en la base del primer par de patas que producen una secreción higroscópica con capacidad de absorber vapor de agua del aire (Wharton y Furumizo, 1977; Wharton et al., 1979). La mínima humedad relativa a la que un organismo es capaz de mantener su balance hídrico se denomina *actividad crítica de equilibrio* (Wharton y Devine, 1968). En los ácaros astigmátidos, por debajo de este valor característico de cada especie, la bomba de agua es incapaz de compensar las pérdidas a través de la cutícula, de forma que en ausencia de otras fuentes de agua estos

organismos no son capaces de sobrevivir. Debido a esta circunstancia, estos organismos precisan de altos valores de humedad relativa ambiental para desarrollarse, en general superiores al 70% (Wharton y Arlian, 1972). La capacidad de desarrollarse en valores de humedad relativa ambiental inferiores a la actividad crítica de equilibrio se debe al contenido de agua libre del alimento y a estrategias de comportamiento de los ácaros (Cutcher, 1973). Como en el caso de la temperatura, el establecimiento del límite de humedad relativa ambiental por debajo del cual las poblaciones de las distintas especies de ácaros plaga de productos almacenados no son capaces de proliferar resulta de enorme interés desde el punto de vista de su control.

1. 3. 3. Modelización de la biología frente a factores físicos

Una vez identificados los factores clave responsables de las fluctuaciones de las poblaciones de los organismos plaga, el siguiente paso consiste en la cuantificación de su efecto con el fin de modelizar los diferentes aspectos de su biología. La elaboración de modelos que simulen el desarrollo de las poblaciones de las plagas de los productos almacenados resulta de gran utilidad para predecir los niveles poblacionales y optimizar las estrategias a aplicar dentro del control integrado de plagas. Para realizar estos modelos se debe evaluar el desarrollo, la supervivencia y la reproducción bajo un rango de valores de los factores considerados y establecer relaciones por medio del ajuste a funciones matemáticas (Parajulee et al., 1995; Lysyk, 1998; Tsai y Wang, 1999). Las funciones empleadas con este propósito van desde simples ecuaciones lineales hasta complejas ecuaciones no lineales que generan la forma adecuada para ajustarse al comportamiento de los parámetros a cuantificar (Hilbert, 1995).

El creciente interés en la modelización del desarrollo de los organismos plaga ha llevado al empleo de muchas de estas funciones para describir el comportamiento de diferentes parámetros biológicos ante los factores físicos. Así, se han empleado funciones para describir la tasa de desarrollo de los distintos estados de un organismo (Lamb et al., 1984; Logan, 1988; Marco et al., 1997; Briere y Pracros, 1998; Tsai y Liu, 1998), la tasa intrínseca de incremento natural de las poblaciones (Logan et al., 1976; Lysyk, 1998; Tsai y Wang, 1999), la fecundidad diaria (Nowierski et al., 1995; Tsai y Wang, 1999) y la fecundidad acumulada (McClymont Peace, 1983; Carpenter, 1995), otros parámetros reproductores (Mason y Mack, 1984; Lysyk, 1998; Tsai y Wang, 1999), la supervivencia preimaginal (Fomasari, 1995; Wagner, 1995; Lysyk, 1998) y la del

estado adulto (Nowierski et al., 1995; Tsai y Wang, 1999) o la longevidad (Mason y Mack, 1984; Lysyk, 1998). El desarrollo computacional ha permitido la elaboración de modelos cada vez más complejos e incluso modelos que consideran a la vez más de un factor, como modelos bidimensionales de temperatura y humedad relativa (Throne et al., 1998) o modelos para la tasa de desarrollo con respecto a la nutrición y a la temperatura (Hilbert, 1995).

Sin embargo, el interés de los entomólogos ha estado tradicionalmente más centrado en el efecto de la temperatura sobre la tasa de desarrollo de los organismos plaga, existiendo una gran variedad de funciones desarrolladas para describir dicha relación que se emplean como aplicación para predecir su fenología (Wagner et al., 1984a; Higley et al., 1986; Logan, 1988; Logan et al., 1991; Marco et al., 1997). Esta circunstancia es debida a que la temperatura es considerada como uno de los principales factores que influyen en la ecología de los invertebrados terrestres (Tauber et al., 1986) de forma que la relación entre la tasa de desarrollo y la temperatura representa un componente fundamental de la dinámica de poblaciones y su correcta descripción resulta esencial en la construcción de modelos fenológicos (Lactin et al., 1995). Este amplio desarrollo de la modelización del efecto de la temperatura sobre la tasa de desarrollo se considera de manera más extensa en el apartado siguiente.

1. 3. 3. 1. Modelización de la tasa de desarrollo frente a la temperatura

En los organismos ectotérmicos, la relación entre la tasa de desarrollo y la temperatura es de carácter no lineal, presentando una forma asimétrica compuesta por tres secciones (Wagner et al., 1984a; Briere y Pracros, 1998). En la primera, la tasa de desarrollo se aproxima asintóticamente al punto de desarrollo cero, debido a que estos organismos a menudo son capaces de sobrevivir durante largos periodos de tiempo a bajas temperaturas con su desarrollo detenido o ralentizado. Por esta razón, el umbral térmico inferior de desarrollo es difícil de medir con precisión. En la segunda sección, a medida que la temperatura se incrementa, la tasa de desarrollo se vuelve proporcional a la temperatura. Finalmente, una vez sobrepasada la temperatura óptima (esto es, la temperatura asociada con la tasa más alta) el desarrollo se ralentiza y cae bruscamente hasta el umbral térmico superior de desarrollo.

Muchos modelos empíricos y biofísicos han sido desarrollados para describir la relación entre la tasa de desarrollo y la temperatura. Como Wagner et al. (1984a) indican, una de las primeras aproximaciones fue el modelo lineal de grados-día, que se centra en la porción lineal de la curva para establecer dicha relación, de forma que ésta queda representada por medio de una línea recta. Este modelo calcula la duración del desarrollo en forma de unidades termales, los grados-día, que se interpretan como el número de grados de temperatura acumulados diariamente por encima del umbral térmico inferior que son necesarios para completar el desarrollo. Para calcular los grados-día se debe multiplicar el tiempo de desarrollo predicho por el modelo a una temperatura determinada por la diferencia entre esa temperatura y el umbral inferior. Al ser el modelo una línea recta dichos productos son constantes a lo largo de todo el rango de temperaturas. El umbral inferior de temperatura se calcula extrapolando la línea recta hasta cortar el eje de temperaturas. Este modelo es y ha sido ampliamente utilizado debido a que requiere pocos datos para su formulación y a ser fácil de calcular y aplicar (Wagner et al., 1984a).

Sin embargo, el hecho de que este modelo no considerara las porciones no lineales de la relación entre la tasa de desarrollo y la temperatura motivó a numerosos investigadores a la formulación de modelos más complejos que tuvieran en cuenta esta circunstancia. Así, Stinner et al. (1974) emplearon una ecuación sigmoidea modificada; Logan et al. (1976) desarrollaron dos modelos, uno por combinación de dos ecuaciones exponenciales (ecuación 6) y otro por combinación de una ecuación sigmoidea y otra exponencial (ecuación 10); Sharpe y DeMichele (1977) elaboraron un complejo modelo biofísico basado en cinética enzimática que contenía 6 parámetros con interpretación bioquímica y termodinámica; este modelo fue posteriormente simplificado por Schoolfield et al. (1981) para subsanar ciertos problemas que surgían durante la estimación de los parámetros; Hilbert y Logan (1983) combinaron nuevamente una ecuación sigmoidea con una exponencial para obtener un modelo que predecía a la vez los umbrales térmicos superior e inferior; Lactin et al. (1995) modificaron la ecuación 6 de Logan et al. (1976) para permitir la estimación del umbral inferior de desarrollo; Briere et al. (1999) desarrollaron un modelo simplificado con menor número de parámetros que estimaba también los umbrales de desarrollo.

Esta amplia disponibilidad ha originado la necesidad de establecer una serie de criterios de selección que permitan escoger aquél o aquéllos modelos que ofrezcan mejores resultados. La premisa básica es la descripción precisa de los datos (Lamb et al.,

1984), para lo cual resulta esencial que el modelo tenga en cuenta la no linealidad así como la asimetría asociada a la temperatura óptima de desarrollo (Logan y Hilbert, 1983). Debido a que en numerosas ocasiones los coeficientes de determinación que establecen el grado de ajuste de los modelos a los datos observados son elevados y similares entre sí (Briere y Pracros, 1998), este criterio por sí solo no permite la realización de una selección adecuada de los modelos. Por ello es necesario aplicar otros criterios, como los establecidos por Lamb et al. (1984) y Wagner et al. (1984a). Otro punto a considerar son las distintas necesidades a la hora de aplicar un modelo (Logan, 1988), como, por ejemplo, si existe o no interés en la predicción de los umbrales térmicos de desarrollo. Teniendo en cuenta todas estas circunstancias no resulta extraño que en los últimos años diversos estudios se hayan centrado en la comparación del ajuste de diferentes modelos a datos de desarrollo (Got et al., 1997; Marco et al., 1997; Briere y Pracros, 1998; Tsai y Liu, 1998).

La realización de estudios de desarrollo en los que se aplican modelos para describir la relación entre la tasa de desarrollo y la temperatura generalmente tiene su base en experimentos de laboratorio a temperaturas constantes. Sin embargo, la velocidad a la que un organismo ectotérmico se desarrolla depende no sólo de la curva que relaciona la tasa de desarrollo con la temperatura, sino también del régimen de temperaturas en el que vive (Andrewartha y Birch, 1954; Taylor, 1981). Debido a esta circunstancia, los datos de desarrollo obtenidos en laboratorio bajo condiciones de temperatura constantes proporcionan aproximaciones al desarrollo en condiciones naturales bajo temperaturas fluctuantes (Hagstrum y Milliken, 1991). Así, en diferentes insectos, la comparación de las tasas de desarrollo bajo regímenes de temperaturas fluctuantes respecto a las obtenidas bajo temperaturas constantes que representaban la media correspondiente a esos regímenes ha dado lugar a resultados muy diversos (Beck, 1983). En unos casos el desarrollo se producía más rápidamente, en otros de manera más lenta y en un tercer grupo se producía a la misma velocidad.

Ante esta situación, para modelizar el desarrollo de los organismos ectotérmicos en un ambiente sometido a fluctuaciones de temperatura, varios autores han propuesto un modelo global obtenido a partir de la integración, a través del régimen de temperaturas fluctuantes, de la función que describa la relación existente entre la tasa de desarrollo y la temperatura (Stinner et al., 1974; Logan et al., 1976; Logan y Hilbert, 1983; Hilbert y Logan, 1983; Logan, 1988).

Logan (1988) indica la existencia de dos asunciones necesarias para la aplicación de este modelo global. La primera se refiere al ajuste instantáneo de las tasas de desarrollo frente a las variaciones de temperatura mientras que la segunda implica la ausencia de sinergismo debido a las fluctuaciones de temperatura frente a las temperaturas constantes.

El modelo global también puede ser aplicado al nivel poblacional a través de dos aproximaciones diferentes. En la primera, la distribución de frecuencias de las tasas de desarrollo para cada temperatura se transforma en una única distribución normalizada de probabilidades acumuladas de forma sigmoidea. En esta distribución el valor de D_i corresponde a la tasa de desarrollo normalizada y se emplea como variable independiente para predecir la fracción de una cohorte de individuos que completa el desarrollo en función de las tasas acumuladas (Wagner et al., 1984b). En este sentido, cuando D_i toma el valor 1, la mitad de la población ha completado el desarrollo (Logan, 1988). En la segunda aproximación, la función $r[T(t)]$ se emplea para describir la relación entre la tasa intrínseca de incremento de una población (r_m) y la temperatura, ya que el patrón de dicha relación es similar al de la tasa de desarrollo frente a la temperatura. De esta forma, ajustando dicha función a los valores de r_m obtenidos a distintas temperaturas e incorporándolo al modelo global, se podría predecir la evolución de una población en un régimen fluctuante de temperaturas (Logan et al., 1976).

1. 4. MÉTODOS DE CONTROL DE ÁCAROS DE PRODUCTOS ALMACENADOS

La protección de productos alimenticios almacenados, especialmente los destinados al consumo humano, es particularmente crítica debido a que deben encontrarse libres de artrópodos vivos o muertos así como de evidencias de su presencia anterior (Benz, 1987). Esto provoca que los niveles de tolerancia admitidos sean extraordinariamente bajos. La primera medida para la protección de estos productos consiste en evitar la aparición de las infestaciones por medio del empleo de diversos métodos de control *preventivos* (Benz, 1987). Sin embargo, no siempre resulta factible conseguir la exclusión completa de las plagas de los productos que se desean proteger, haciéndose entonces necesaria la aplicación de medidas de control *curativas* eficaces. En este sentido, la detección temprana de la infestación es de gran importancia para el éxito de estas medidas (Benz, 1987; Zdarkova, 1991a). En el caso de los ácaros, su gran

capacidad de incremento hace que en pocos días sus densidades poblacionales alcancen niveles no tolerables, por lo que se hace aún más importante la aplicación urgente de métodos de control efectivos. Como para el resto de las plagas de productos almacenados, se han usado y experimentado variados procedimientos de control para luchar contra estos organismos. Estos procedimientos se han centrado principalmente en el empleo de métodos físicos y químicos, pero también incluyen el uso de feromonas y la lucha biológica.

1. 4. 1. Físicos

- *Limpieza*. Una de las más importantes medidas preventivas a tener en cuenta en la industria alimentaria consiste en la limpieza de almacenes, graneros, silos y maquinaria de procesado de alimentos, lo que priva a muchas plagas de lugares de cría y alimentación que puedan actuar como refugios (Benz, 1987). En este sentido, las grietas de paredes y techos deben ser rellenadas con materiales inertes para evitar la acumulación de productos que puedan ser empleados como sustrato alimenticio (Benz, 1987).

- *Barreras mecánicas*. El aislamiento físico de los almacenes respecto al medio externo es otra medida preventiva bastante conveniente. Esto puede conseguirse colocando mallas protectoras en las aberturas de ventilación y ventanas, si es posible en combinación con aparatos de electrocución (Benz, 1987)

El empaquetado de las mercancías por medio de diferentes tipos de envolturas herméticas es otro método de aislamiento de los alimentos que los protege de las diferentes plagas de productos almacenados. Un perfecto sellado evita, por una parte, la penetración de las plagas y, por otra, la emanación de olores que las puedan atraer (Benz, 1987).

- *Eliminación mecánica*. Benz (1987) señala como uno de los procedimientos más simples para la eliminación de las plagas de productos almacenados el empleo de métodos mecánicos de extracción, como el tamizado o la aspiración. Sin embargo, los métodos mecánicos no siempre son enteramente satisfactorios ni aplicables a todo tipo de productos.

• *Modificación de factores ambientales.* Una de las metodologías más empleadas para eliminar o disminuir las poblaciones de ácaros en productos almacenados consiste en la alteración de las condiciones de temperatura y humedad relativa (Benz, 1987; Zdarkova, 1991a), para lo cual resulta de gran utilidad el conocimiento previo del efecto de la modificación de estos factores sobre las poblaciones de ácaros plaga.

El uso de temperaturas extremas ha constituido una técnica empleada con gran éxito durante muchos años contra las plagas de productos almacenados (Fields, 1992), existiendo diversos estudios de su efecto sobre ácaros de este tipo (Sinha, 1964; Burrell y Havers, 1976; Zdarkova y Voracek, 1993; Arnau y Guerrero, 1994). Para obtener bajas temperaturas el método más empleado consiste en la ventilación del producto almacenado por medio de aire refrigerado (Armitage, 1980; Zdarkova, 1991a; Fields, 1992), existiendo también disponibilidad de equipamientos para congelación en la industria alimentaria (Zdarkova y Voracek, 1993). Asimismo, el sobrecalentamiento a temperaturas letales por medio de calefactores (Benz, 1987), aire caliente (Fields, 1992) o microondas (Fields, 1992; Halverson et al., 1996) es también un método común aplicable a la eliminación de ácaros de productos almacenados.

Por otra parte, como los ácaros son más tolerantes a los cambios en la temperatura que a los cambios en humedad ambiental (Zdarkova, 1991a) la disminución de la humedad relativa se presenta como un sistema más eficaz, aunque menos extendido, para el control de estos organismos, al provocar en ellos procesos de desecación. En este sentido, Zdarkova (1991a) indica que los procesos de aireación no sólo modifican la temperatura ambiental sino que también eliminan gran parte de la humedad de los productos almacenados, manteniendo las poblaciones en niveles bajos. Además afirma que en almacenes de grano en los que se lleva a cabo una aireación activa desde el momento de la carga, generalmente no se desarrollan problemas de plagas de ácaros. Sin embargo, Hurlock et al. (1980) indicaron que el trigo almacenado en contenedores aireados presentaba un contenido de humedad de un 0,5% a un 1% mayor que en los no aireados, exceptuando en la superficie, donde generalmente se mantenían condiciones más secas. La aplicación de esta técnica dependería, por tanto, de la capacidad de los ácaros de penetrar en el interior de los productos a proteger.

• *Radiaciones.* Otro método disponible para el control de ácaros en productos almacenados es el uso de radiaciones ionizantes, generalmente de tipo gamma (Benz,

1987). Existen diversos estudios que certifican la eficacia del método, tanto para eliminar los ácaros como para producir esterilidad de los adultos, lo que depende de la intensidad de la radiación (Ignatowicz et al., 1983; Kumud y Mathur, 1989; Ignatowicz, 1992; Arnau y Guerrero, 1994). Sin embargo, hasta ahora sólo unos pocos países han aprobado el uso de esta metodología para controlar las plagas de artrópodos de los alimentos almacenados (Benz, 1987), lo que supone un serio impedimento para el desarrollo e instalación de equipos de irradiación en la industria alimenticia. Un ejemplo lo constituye España, donde esta técnica se ha mostrado especialmente eficaz a nivel experimental para el control de ácaros en jamones curados pero donde su uso no está permitido (Arnau y Guerrero, 1994).

- *Atmósferas modificadas.* De acuerdo con Jay (1984) una atmósfera modificada se origina cambiando la atmósfera original de un contenedor de almacenamiento por otra letal para los artrópodos al añadir dióxido de carbono (CO₂), nitrógeno (N₂) o aire exento de oxígeno a través de la aplicación de gases de combustión desde un generador de "atmósferas inertes". Este control en la composición de la atmósfera puede ser empleado para la eliminación de plagas de insectos y ácaros en alimentos almacenados tales como grano (Benz, 1987; Zdarkova, 1991a), siendo el máximo problema la transformación de los graneros y silos existentes en cámaras herméticas al gas (Benz, 1987). Para determinado tipo de productos tales como carne de cerdo curada, este procedimiento se ha mostrado efectivo con exposiciones de tres días en atmósferas con un 100% de CO₂ (Pagani y Ciampitti, 1990; Guerrero y Arnau, 1995). En el caso del jamón ibérico curado, la aplicación de atmósferas de CO₂ a distintos valores de presión produjo inicialmente resultados satisfactorios a nivel experimental con tratamientos de tan sólo una hora de duración, aunque los posteriores procesos de despresurización producían alteraciones de la calidad del producto (Arnau y Guerrero, 1994).

1. 4. 2. Químicos

En muchas ocasiones los métodos físicos no son suficientes para controlar las poblaciones de ácaros e insectos plaga de productos almacenados, por lo que, en la actualidad, el método de control más eficaz y ampliamente empleado es la aplicación de plaguicidas (Benz, 1987; Zdarkova, 1991a). Estos productos son utilizados como medida preventiva para eliminar las poblaciones de organismos plaga presentes en los

almacenes que puedan infestar los alimentos a proteger, o como medida curativa cuando el ataque ya se ha producido para evitar que las pérdidas económicas sean elevadas.

Numerosos productos han demostrado tener actividad acaricida sobre *T. putrescentiae* y otros ácaros de almacén (Zdarkova y Horak, 1973; Wilkin y Hope, 1973; Bowley y Bell, 1981; Stables, 1984; Tigar y Pinniger, 1989; Zdarkova, 1994). Sin embargo, existen estrictos requerimientos para el uso de plaguicidas en la industria alimenticia. Los productos empleados deben tener la mínima toxicidad para el hombre, mínima actividad residual y no deben afectar la apariencia, olor, sabor u otras cualidades de los productos alimenticios (Zdarkova, 1991a). Por ello, actualmente en España el número de productos cuyo empleo está permitido para controlar las plagas de productos alimenticios almacenados es muy reducido (De Liñán, 1999). En general, el control químico se emplea principalmente para proteger grano almacenado de cereales o leguminosas (Benz, 1987).

Los productos químicos empleados como plaguicidas pueden ser divididos en fumigantes y no fumigantes según su forma de actuación. Los primeros son gases tóxicos caracterizados por tener una gran capacidad de difusión y penetración dentro del sustrato y nula actividad residual, aunque su manejo es peligroso, laborioso y muy caro (Zdarkova, 1991a). En cuanto a los no fumigantes, su forma de actuación es por contacto o por ingestión, con capacidad fumigante limitada (Zdarkova, 1991a). Presentan mayor actividad residual y menor toxicidad para los mamíferos, siendo extremadamente tóxicos para los insectos y otros artrópodos, por lo que pueden ser aplicados en concentraciones muy bajas (Benz, 1987; Zdarkova, 1991a).

Sin embargo, muchos de los productos alimenticios que potencialmente son susceptibles de ser atacados por ácaros caen fuera del espectro de alimentos que pueden ser protegidos por medio del control químico en nuestro país. Además, otro problema relacionado con las plagas de ácaros es su menor sensibilidad a los plaguicidas empleados actualmente en comparación con los insectos (Zdarkova, 1991a). Como resultado, los tratamientos químicos rutinarios contra plagas de insectos de productos almacenados son a menudo inefectivos contra los ácaros que se dan simultáneamente. Los operadores del control de plagas a veces resuelven este problema seleccionando acaricidas más específicos, en los lugares donde esté permitida su aplicación, o

incrementando las dosis de insecticidas convencionales. Esta última aproximación presenta serios problemas sanitarios y ambientales (Zdarkova, 1991a).

Por otra parte, existen estudios que indican la capacidad de los ácaros de desarrollar líneas resistentes a determinados plaguicidas usados actualmente (Wilkin, 1973; Stables, 1984). En este sentido Zdarkova (1991a) recomienda que los productos a emplear sean alternados con el fin de mantener su efectividad.

1. 4. 3. Feromonas

Dentro de los métodos de control de plagas de productos almacenados, el empleo de feromonas supone una metodología atractiva debido a su alta especificidad. La aplicación de estas sustancias como sistema de detección temprana constituye un gran ventaja, ya que permite disponer de mayor cantidad de tiempo para introducir otras prácticas de control ambientalmente seguras (Benz, 1987). El empleo de las feromonas como método de control también ha sido sugerido, al haberse comprobado la capacidad de estos productos para capturar masivamente a los individuos de una especie (Burkholder, 1984). Sin embargo, Benz (1987) indica que son necesarias enormes cantidades de feromonas para el tratamiento de grandes almacenes, lo que supondría problemas económicos para el desarrollo de esta tecnología.

En el caso de los ácaros de productos almacenados, su gran capacidad de incremento en poco tiempo hace que sea de enorme importancia la detección temprana de su presencia, con el fin de aplicar cuanto antes medidas de control. Como se ha comentado, dentro de este contexto las feromonas resultan de gran ayuda, siendo necesaria su identificación así como la determinación del efecto que producen. En ácaros astigmátidos el complejo de feromonas implicado en sus procesos biológicos se encuentra ampliamente estudiado, habiéndose detectado feromonas de agregación (Kuwahara et al., 1982; Mori y Kuwahara, 1986), de alarma (Kuwahara et al., 1975; Leal et al., 1988; Kuwahara et al., 1989) y sexuales (Kuwahara, 1991; Mori y Kuwahara, 1995). Dichos autores caracterizaron las distintas sustancias implicadas y determinaron el papel de las mismas dentro de la ecología de las poblaciones de ácaros. Dentro de los tipos de sustancias detectadas, las feromonas de alarma abren otra posibilidad a desarrollar dentro de las estrategias de control, al poder ser empleadas como método de protección de alimentos. Un ejemplo lo constituye *T. putrescentiae*, donde dos monoterpenos han

sido identificados como feromonas, el formato de nerilo, que actúa como feromona de alarma (Kuwahara et al., 1975) y el β -acaridial, que actúa como feromona sexual (Leal et al., 1989). Rodríguez et al. (1979) demostraron la capacidad de la feromona de alarma de *T. putrescentiae* para prevenir la invasión de este ácaro en comida de animales domésticos aplicándola en el envoltorio. Otra sustancia químicamente similar, el citral, también se mostró igualmente efectiva para proteger el alimento frente a la entrada de los ácaros de esta especie por medio del mismo método de aplicación (Rodríguez et al., 1979). El citral es el principal constituyente del aceite de limoncillo (*Andropogon schoenanthus*) (Gramineae) y aparece en numerosos otros aceites (Templeton, 1969). Este monoterpeno está compuesto por dos isómeros, el neral y el geranial (Templeton, 1969), los cuales actúan como feromona de alarma en otros ácaros astigmátidos, habiéndose encontrado en las glándulas opistonotales de otras especies en mayor o menor cantidad (Kuwahara, 1991).

Por tanto, el conocimiento del complejo de feromonas de las distintas especies de ácaros plaga de productos almacenados resulta fundamental para la introducción de esta tecnología en los programas de control integrado. Según Sonenshine (1985) la necesidad prioritaria radica en la recopilación e interpretación de la información básica sobre feromonas y otros semioquímicos de los ácaros. El siguiente paso sería la evaluación de la posible aplicación de estos productos a nivel práctico (Silverstein, 1981). Por tanto, y atendiendo a la problemática apuntada por Benz (1987) respecto a su uso en almacenes, sería necesario determinar el grado de protección que proporcionan, el tiempo necesario para alcanzar las concentraciones requeridas y la duración del periodo de efectividad, las cantidades a emplear y la viabilidad económica de su aplicación.

1. 4. 4. Control biológico

El término *control biológico* implica la utilización de depredadores, parasitoides y patógenos para el control de plagas de insectos y ácaros. Esta metodología proporciona enormes ventajas debido a su alta especificidad y a la ausencia de riesgos de toxicidad y de otros efectos ambientales indeseables derivados del empleo de plaguicidas químicos (Davies, 1991.). Sin embargo, en el caso de las plagas de productos almacenados, esta metodología presenta a su vez determinados inconvenientes. Arbogast (1984) indica que la función de control por parte de enemigos naturales generalmente comienza cuando ya se han producido daños serios en los productos a proteger, aunque esta situación puede

ser bastante diferente cuando los enemigos naturales se liberan deliberadamente durante los primeros estados de la infestación. Otro problema asociado a este tipo de metodología radica en el hecho de que la introducción de enemigos naturales puede incrementar la contaminación del producto (Benz, 1987). En cualquier caso, este mismo autor indica que, aunque esta crítica es correcta, no justifica el sistemático rechazo del control biológico, considerando además que los restos de enemigos naturales son comparativamente de escasa importancia en muchos productos alimenticios que, además, pueden ser objeto de limpiezas antes o durante el procesado.

Las perspectivas actuales de control biológico de los ácaros astigmátidos de productos almacenados se basan en el empleo de depredadores. La diversidad de parasitoides y patógenos de los ácaros en general es mucho menos conocida que la de los insectos (Lipa, 1971) debido a que el pequeño tamaño de los ácaros ha limitado la cantidad de investigaciones sobre enfermedades de este importante grupo de artrópodos (Poinar y Poinar, 1998).

Las principales especies depredadoras de los ácaros plaga de productos almacenados están constituidos por ácaros de los órdenes Mesostigmata y Prostigmata (McMurtry, 1984). De todas ellas, el prostigmátido *Cheyletus eruditus* ha demostrado tener un gran potencial como agente de control biológico en grano almacenado (Norris, 1958; Pulpan y Verner, 1965; Berreen, 1976). Este ácaro se alimenta de ácaros astigmátidos de las familias Acaridae y Glycyphagidae, principalmente sobre las especies *T. putrescentiae*, *A. siro* y *L. destructor* (Zdarkova, 1991a y 1991b). Respecto a su capacidad como depredador, Norris (1958) observó la eliminación de densas poblaciones de *A. siro* y *L. destructor* en almacenes de trigo en grano. Asimismo, Pulpan y Verner (1965) indicaron la existencia de control espontáneo en graneros donde la proporción depredador-presa era de 1 a 75-100, siempre y cuando la infestación no excediera los 1000 individuos de ácaros plaga por 500 gramos de grano. Los mismos autores sugerían como medida preventiva la introducción en grano aún no infestado de un individuo de *C. eruditus* por cada 100 Kg. de grano. Berreen (1976) señaló que la tasa de depredación de este ácaro era de 5 presas por depredador y por día. Bajo este contexto se desarrollaron planes de control biológico de ácaros astigmátidos con este depredador en alimento almacenado en Checoslovaquia, donde actualmente se comercializa el bio-preparado "Cheyletin" en forma de bolsas que contienen entre 2000 y 3000 individuos de esta especie (Zdarkova, 1991b). El problema fundamental radica en que el control

biológico con *C. eruditus* no es eficaz cuando la densidad de presa es superior a los 1000 individuos por Kg de grano, debido a que el depredador es incapaz de erradicar poblaciones tan densas de ácaros plaga (Pulpan y Verner, 1965; Zdarkova, 1994). Esta situación imposibilita la aplicación de esta metodología para la protección de determinado tipo de productos donde las condiciones de elaboración y almacenamiento hacen que las densidades de ácaros plaga sean muy superiores a la cifra indicada.

1. 5. MÉTODOS ALTERNATIVOS DE CONTROL

Uno de los objetivos prioritarios del control integrado de plagas es el empleo de diversos métodos que reduzcan al máximo la utilización de los plaguicidas sintéticos convencionales. Con este fin se han venido desarrollando nuevas tecnologías de control, más selectivas, con diferentes modos de acción y de menor toxicidad para el resto de organismos. Entre las posibles alternativas consideradas está el empleo de productos naturales de origen vegetal, idea que retoma las tendencias originales de obtención de plaguicidas a partir de extractos y compuestos derivados de plantas. Por otra parte, existen en el mercado diversos plaguicidas que actúan como reguladores de crecimiento, al intervenir en distintos procesos fisiológicos del desarrollo (Oberlander, 1997 et al.). Estos productos fueron denominados originalmente como "plaguicidas de tercera generación" (Williams, 1967). Además, los avances en técnicas de biología molecular han posibilitado la obtención de plantas transgénicas que expresan proteínas con capacidad plaguicida. Actualmente existe un amplio espectro de genes que potencialmente serían capaces de conferir resistencia a las plantas cultivadas frente al ataque de insectos (Reeck et al., 1997; Czaplá, 1997; Schuler et al., 1998).

En los siguientes apartados se considera la posible aplicación de las distintas estrategias citadas para el control de plagas de alimentos almacenados, y en particular de las de ácaros.

1. 5. 1. Productos de origen botánico: monoterpenos

La toxicidad de numerosos aceites esenciales y de sus constituyentes principales ha sido evaluada frente a diversas plagas de productos almacenados por medio de diferentes métodos de aplicación, habiéndose obtenido en general resultados

satisfactorios (Schoonhoven, 1978; Messina y Renwick, 1983; Don-Pedro, 1989; Risha et al., 1990; Shaaya et al., 1991; Stamopoulos, 1991; Shaaya y Kostjukovsky, 1998; Huang et al., 1999). Otros estudios han demostrado también la efectividad de estas sustancias en el control de ácaros y garrapatas (Delaplane, 1992; Mwangi et al., 1995), siendo de especial relevancia la actividad observada sobre determinadas especies de ácaros de productos alimenticios almacenados como *T. putrescentiae* (Gulati y Mathur, 1995) y *T. longior* (Perrucci, 1995).

La mayor parte de los constituyentes principales que se consideran en los estudios citados corresponden a monoterpenos, siendo este grupo el principal componente de los que integran los aceites esenciales. Estos productos representan la serie de terpenoides de diez átomos de carbono y comprenden una amplia variedad de hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas y otros compuestos que contienen oxígeno, caracterizados por sus olores generalmente agradables (Templeton, 1969). El mecanismo de acción tóxico de monoterpenos y aceites esenciales no es aún muy claro, aunque se han sugerido procesos de asfixia (Schoonhoven, 1978; Messina y Renwick, 1983) o efectos neurotóxicos (Ryan y Byrne, 1988; Coats et al., 1991) como posibles modos de actuación. Debido a que se considera que la actividad de este tipo de compuestos presenta escasos riesgos para la salud humana (Schoonhoven, 1978; Coats et al., 1991; Coats, 1994; Perrucci, 1995), su aplicación para controlar las poblaciones de insectos y ácaros plaga de productos almacenados le confiere gran interés.

1. 5. 2. Plaguicidas potenciales

Actualmente existe disponible en el mercado una nueva generación de plaguicidas con formas de actuación diferente a los productos convencionales y con una mayor selectividad y una menor toxicidad para los mamíferos y otros vertebrados. Dicha selectividad se relaciona con su modo de acción, al intervenir en procesos fisiológicos específicos de los organismos objeto del control. Los productos que forman parte de este nuevo tipo de plaguicidas son los denominados reguladores de crecimiento de insectos (RCIs), los cuales interfieren en el crecimiento y desarrollo de estos organismos (Retnakaran et al., 1985). Los RCIs están constituidos por inhibidores de la síntesis de quitina, análogos y antagonistas de la hormona juvenil y análogos y antagonistas de la ecdisona u hormona de la muda. Los efectos que estas sustancias producen incluyen desde alteraciones en los procesos de muda de los insectos, dando lugar a individuos no

viables que acaban muriendo, hasta alteraciones en la reproducción de los adultos, inhibiendo la puesta de huevos o la eclosión de los mismos (Retnakaran et al., 1985; Dhadialla et al., 1998). La utilización de este nuevo tipo de plaguicidas para el control de plagas agrícolas se encuentra en proceso de expansión y todo parece indicar que su uso tenderá a incrementarse en los próximos años.

Los RCIs también pueden constituir un factor importante a largo plazo dentro del manejo integrado de plagas de insectos de productos almacenados (Oberlander et al., 1997). Su posible empleo para el control de este tipo de plagas fue anticipado en los años 70 como una alternativa valiosa al uso de otros plaguicidas. Las investigaciones realizadas al respecto han demostrado los efectos de una gran variedad de RCIs sobre diversos insectos de productos almacenados (ver revisión de Oberlander et al., 1997), mostrando un gran potencial como candidatos para su control. De hecho en algunos países ya se han registrado productos de este tipo para su uso en almacén, aunque dicha circunstancia aún no ha tenido lugar en España (De Liñán, 1999).

Además de estos compuestos, se han desarrollado otros nuevos plaguicidas de origen natural y de menor toxicidad que los convencionales. Entre ellos se encuentran principios activos obtenidos a partir de extractos del árbol del Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) (Meliaceae) y un metabolito del actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* Mertz y Yao, que actúa sobre el sistema nervioso aunque de forma distinta a la del resto de productos neurotóxicos conocidos hasta el momento (Salgado, 1997).

Las características y modo de acción de algunos compuestos pertenecientes a las distintas categorías de plaguicidas previamente indicadas y que han demostrado su efectividad sobre plagas de diferentes órdenes de insectos se describen brevemente a continuación:

- *Azadiractina*. Este producto es un actiecdisoide natural extraído del árbol del Neem (*Azadiracta indica*) cuyos extractos han sido empleados como plaguicidas desde antiguo en el sudeste de Asia (Schmutterer, 1990). Se considera que actúa como regulador de crecimiento de los estados juveniles de insectos y otros artrópodos, interfiriendo en la actividad de la ecdisona y por tanto en el proceso de la muda (Rembold, 1995). A dosis altas presenta también efecto antiapetitivo (Kraus, 1995; Blaney y Simmonds, 1995).

• *Piriproxifén*. El piriproxifén es un análogo de la hormona juvenil que ocasiona la supresión de la embriogénesis afectando asimismo a la metamorfosis y a la formación del adulto. También se han descrito efectos negativos en la reproducción de determinadas especies (Ishaaya y Horowitz, 1992; Ishaaya et al., 1994).

• *Halofenocida*. El halofenocida es un nuevo tipo de plaguicida que interfiere con el normal desarrollo del proceso de metamorfosis. Pertenece al grupo de los análogos de la hormona de la muda de insectos, la 20-hidroxiecdisona, afectando principalmente a los estados juveniles aunque también reduce dramáticamente la fecundidad en insectos adultos tratados y tiene propiedades ovicidas (RohMid, 1996). Presenta un mínimo impacto sobre organismos beneficiosos tales como depredadores (Kunkel et al., 1999).

• *Hexaflumurón*. El hexaflumurón actúa inhibiendo la síntesis de quitina en la cutícula de los insectos. Este proceso ocurre normalmente tras la ingestión del producto por parte de los estados juveniles, produciendo graves lesiones durante el proceso de muda o ecdisis hacia el siguiente estado de desarrollo. También presenta actividad ovicida (Komblas y Hunter, 1986; Horowitz et al., 1992) así como efectos sobre la fecundidad y la fertilidad de diferentes especies (Ascher et al., 1986; Horowitz et al., 1992; Marco y Viñuela, 1994). Este producto, además, carece de efectos perjudiciales sobre la fauna asociada de insectos y arácnidos si es aplicado de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes.

• *Spinosad*. El spinosad es un plaguicida de origen biológico, con un novedoso modo de acción, compuesto por dos metabolitos, el spinosin A y el spinosin D, derivados del actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa*. Este producto actúa sobre el sistema nervioso de los insectos induciendo actividad continua de las neuronas motoras lo que a su vez origina la contracción de la mayoría de los músculos del cuerpo. Este efecto se debe a una activación en la neurona postsináptica de los receptores nicotínicos de acetilcolina (Salgado, 1997). El spinosad actúa sobre un amplio espectro de insectos plaga, pero presenta mucho menor toxicidad para los enemigos naturales que los plaguicidas sintéticos convencionales (Bret et al., 1997). Asimismo su toxicidad para los vertebrados es también mucho menor que la de los plaguicidas convencionales (Bret et al., 1997).

El conocimiento acerca de la actividad de productos de este tipo sobre ácaros presenta un menor desarrollo que en el caso de los insectos. Determinados estudios han analizado el efecto de RCIs sobre ácaros fitófagos (Schauer y Schmutterer, 1981; Meazza et al., 1992; Sundaram et al., 1995), depredadores (Spollen e Isman, 1996), parásitos (Abo-Taka, 1990; Teel et al., 1996; Donahue et al., 1997; Ross et al., 1997) y ácaros del polvo (Downing et al., 1990), siendo menos abundantes las investigaciones acerca de cómo afectan este tipo de plaguicidas a los ácaros de productos almacenados así como su posible aplicación en programas de control. En este sentido, la evaluación del efecto de estos productos en el desarrollo y reproducción de especies de ácaros plaga de productos almacenados podría suponer una nueva y valiosa información para el control de estos organismos.

1. 5. 3. Inhibidores de proteasas y lectinas

La introducción de genes en plantas para dotarlas de resistencia frente al ataque de insectos ha supuesto un nuevo y revolucionario método a tener en cuenta dentro del control integrado. Esta tecnología proporciona una protección más efectiva y selectiva y de menor riesgo para la salud humana al reducir la cantidad de plaguicida necesaria para combatir las plagas (Gatehouse et al., 1992). Aunque actualmente el uso de estas técnicas se restringe a la protección de las plantas cultivadas (Hilder y Boulter, 1999), la posibilidad de su uso para la protección de productos derivados tales como grano de cereales o leguminosas no debe ser descartada. Esto permitiría un avance muy importante en las estrategias encaminadas a la protección frente a insectos y ácaros plaga de determinados productos almacenados.

Hasta el momento, todos los genes de resistencia frente a insectos transferidos a las plantas dirigen su actuación al sistema digestivo de los insectos (Schuler et al., 1998). Por esta razón resulta fundamental el conocimiento de las funciones digestivas de las especies a controlar, habiéndose producido en los últimos años un enorme progreso en el conocimiento de los procesos fisiológicos y de los complejos enzimáticos implicados en la digestión de los insectos (Terra et al., 1996). Entre los genes candidatos para ser transferidos se encuentran aquéllos que expresan inhibidores de proteasas digestivas (ver revisión de Reeck et al., 1997) y los que expresan lectinas (Czapla, 1997), al haberse comprobado el efecto negativo de estos compuestos añadidos a la dieta sobre distintas

especies plaga o inducidos en plantas (Broadway and Colvin, 1992; Jongsma y Bolter, 1997; Czapla, 1997).

1. 5. 3. 1. Los inhibidores de proteasas

Durante el proceso digestivo, las proteínas ingeridas con la dieta son hidrolizadas a oligómeros, dímeros y finalmente aminoácidos debido a la acción secuencial de las proteasas, las cuales actúan sobre los enlaces peptídicos internos de las proteínas (endoproteasas) o sobre los extremos de las cadenas peptídicas (exoproteasas). Las exoproteasas se clasifican según la especificidad de los sustratos hidrolizados, recibiendo el nombre de aminopeptidasas si hidrolizan un aminoácido del extremo N-terminal y carboxipeptidasas si el aminoácido pertenece al extremo C-terminal. Por su parte, las endoproteasas se clasifican de acuerdo con el mecanismo catalítico de su centro activo, habiéndose citado en insectos cuatro tipos: serín proteinasas, cisteín proteinasas, aspartil proteinasas y metaloproteasas, presentando cada una de ellas distintos pHs óptimos de actividad (Terra et al., 1996).

Los inhibidores de proteasas son proteínas que se unen al centro activo de estas enzimas alterando la digestión proteica del insecto tras su ingestión. Estas sustancias presentan una amplia distribución en plantas (Ryan, 1981 y 1990; Whitaker, 1997), donde intervienen en mecanismos de regulación fisiológica así como en la defensa frente a insectos y patógenos (Ryan, 1990; Whitaker, 1997; Royo et al., 1999). Muchos inhibidores se encuentran constitutivamente en órganos de reserva, tales como semillas y tubérculos, pero también pueden ser inducidos en respuesta a daños provocados por herbívoros (Ryan, 1990).

Debido a la especificidad de los inhibidores, la caracterización de las proteasas que participan en el proceso digestivo resulta fundamental para seleccionar aquéllos que potencialmente sean útiles como método de control. Como se ha comentado, existe un amplio conocimiento acerca de las proteasas digestivas de insectos, especialmente en Lepidópteros (Christeller et al., 1992; Terra y Ferreira, 1994; Ortego et al., 1996) y Coleópteros (Murdock et al., 1987; Wolfson y Murdock, 1990; Novillo et al., 1997). Sin embargo, los componentes bioquímicos del sistema digestivo en ácaros son bastante desconocidos. Dentro de Astigmata, el estudio de proteasas tiene gran interés en los denominados ácaros del polvo debido a que están implicados en procesos alérgicos y a

que precisamente muchos de los alérgenos de estos ácaros son enzimas proteolíticas (Thomas, 1993; Stewart, 1995). Por otra parte, algunos estudios han revelado la presencia de actividad proteolítica en varias especies de ácaros de productos almacenados, incluyendo *Tyrophagus spp.* (Bowman, 1981 y 1984), aunque las proteasas responsables de esta actividad no han sido caracterizadas en detalle. En este sentido, el conocimiento de las proteasas implicadas en el proceso digestivo de los ácaros de productos almacenados así como el efecto que los inhibidores específicos tienen sobre estas enzimas resulta de gran utilidad de cara a su posible utilización en programas de control integrado.

1. 5. 3. 2. Las lectinas

Las lectinas son proteínas de origen no inmune que se unen a hidratos de carbono pudiendo aglutinar células o unirse a la parte glucídica de glicoproteínas, glicolípidos o polisacáridos (Goldstein et al., 1980). Estas proteínas están presentes en numerosos órganos vegetales tales como raíces, hojas, rizomas, tallos (Etzler, 1986), aunque aparecen de manera predominante en las semillas, dónde pueden constituir una gran porción de la proteína total de este órgano (Liener, 1976 y 1979).

En relación a la función de estas sustancias en las plantas, se ha propuesto que, además de su implicación en distintos procesos fisiológicos, actúan como mecanismo de defensa frente a patógenos víricos, bacterianos o fúngicos, así como frente a herbívoros, incluyendo insectos (Peumans y Van Damme, 1995; Gatehouse et al., 1995). En este sentido, las lectinas han demostrado tener un efecto tóxico en Coleoptera (Czapla y Lang, 1990; Allsopp y McGhie, 1996), Lepidoptera (Czapla y Lang, 1990; Law y Kfir, 1997), Diptera (Eisemann et al., 1994) y Homoptera (Habibi et al., 1993; Sauvion et al., 1996), lo que las convierte en útiles herramientas biológicas para ser empleadas como alternativa en el control de plagas. El mecanismo de acción subyacente a la toxicidad de las lectinas frente a insectos no ha sido aún establecido con exactitud, aunque es probable que implique la unión específica a glicoconjugados localizados en el tubo digestivo medio de los insectos (Czapla, 1997).

1. 6. OBJETIVOS DE LA TESIS

El conocimiento de los umbrales de desarrollo del ácaro astigmátido *T. putrescentiae*, plaga de productos almacenados, y la determinación de la capacidad de incremento de sus poblaciones resultan fundamentales para el desarrollo de estrategias eficaces de control. Por otra parte, el moderno desarrollo computacional ha permitido la elaboración de complejos modelos que describen los más diversos parámetros biológicos respecto a diferentes factores ambientales, así como la posibilidad de manejar gran número de datos. En este contexto se enmarca el primero de los objetivos abordados en la presente tesis doctoral:

1. Modelizar el efecto de la temperatura y la humedad relativa sobre el desarrollo y la reproducción de *T. putrescentiae*, con el fin de optimizar las estrategias encaminadas al control de sus poblaciones.

Por otra parte, los problemas asociados al control de *T. putrescentiae* y otros ácaros astigmátidos sobre productos almacenados han motivado la investigación de métodos de control más eficaces y ambientalmente más seguros respecto a los procedimientos empleados actualmente. Los otros tres objetivos están enfocados en este sentido:

2. Evaluar la actividad acaricida de monoterpenos componentes de aceites esenciales de plantas sobre *T. putrescentiae*.

3. Estudiar el efecto de diferentes reguladores del crecimiento y otros plaguicidas sobre el desarrollo y la reproducción de *T. putrescentiae*.

4. Determinar la actividad de inhibidores de proteasas digestivas y de lectinas sobre el desarrollo y la supervivencia de los estados juveniles de *T. putrescentiae*.

MATERIAL Y MÉTODOS

2. 1. ÁCAROS

2. 1. 1. *Tyrophagus putrescentiae*

La población de *T. putrescentiae* procedía de muestras de jamón ibérico obtenidas en la primavera de 1996 y el otoño de 1999 en los secaderos situados en la localidad de Almendralejo (Badajoz, España). La identificación de la especie se realizó por medio de la clave de Hughes (1976). A partir de estas muestras se mantuvo una población de reserva que fue criada usando como sustrato levadura de cerveza en copos (Santiveri S.A., Barcelona), suministrada *ad libitum* y considerada como una dieta ideal según Parkinson et al. (1991b). Para la cría se empleó un método similar al descrito por Kuwahara et al. (1975), consistente en cajas cilíndricas de plástico (9 cm de diámetro y 3 cm de altura) cubiertas por su correspondiente tapadera. En ésta se realizaba un agujero de 3 cm de diámetro que posteriormente se cerraba por la cara interior de la tapa con discos de papel de filtro adheridos con pegamento, lo que permitía el intercambio gaseoso y la entrada de humedad (Figura 2. 1.). La zona de contacto entre la tapadera y la caja se sellaba con vaselina (Vaseline Chesebrough, EGSA, Madrid) para evitar fugas. Las cajas se mantenían sobre bandejas con agua, renovadas semanalmente, con el fin

de inmovilizar los ácaros que pudieran escapar de las cajas. Las condiciones de cría de la población de reserva se establecieron en $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y $90 \pm 5\%$ de humedad relativa y oscuridad total dentro de cámaras de cría SANYO MLR-350H (SANYO, Japón). Todos los experimentos de la presente tesis se realizaron en esas condiciones excepto cuando se indica lo contrario. Cada dos semanas los cultivos eran renovados transfiriendo la tapadera de un cultivo saturado a una caja con alimento fresco. Los ácaros concentrados en la cara interna de la tapadera eran suficientes para establecer una nueva población. Los cultivos saturados eran eliminados previa congelación. Al menos 3 cultivos fueron mantenidos de manera simultánea durante todo el periodo que duró la investigación.

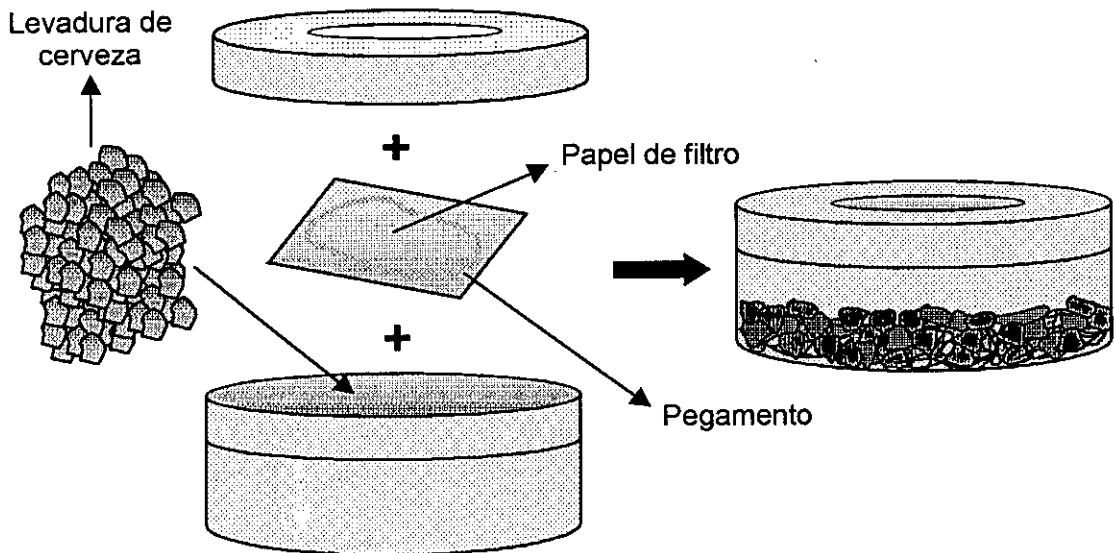


Figura 2. 1. Método de cría de ácaros astigmátidos.

2. 1. 2. Otras especies

Las poblaciones de *Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961 y *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart, 1897) (Astigmata: Pyroglyphidae) fueron proporcionadas por la empresa farmacéutica ALK Abelló S. A. (Madrid, España), que asimismo cedió los laboratorios para la realización de los ensayos. Las condiciones de cría de estos ácaros en sus instalaciones eran de $24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y $80 \pm 5\%$ HR y oscuridad total. Los ácaros eran criados en matraces cubiertos por un tapón de algodón que permitía el intercambio gaseoso y la entrada de humedad a la vez que evitaba que los ácaros pudieran escapar.

Los matraces se situaban en cajas cúbicas de metacrilato (40 cm de lado) abiertas por su cara superior, sobre un soporte apoyado en la base cuyos bordes no contactaban con las paredes de la caja. El fondo de la misma se inundaba de aceite de vaselina, sin alcanzar el soporte donde se encontraban los matraces, para inmovilizar los ácaros que pudieran escapar (Figura 2. 2.). Como alimento se empleaba una mezcla 1:1 suministrada *ad libitum* de levadura de cerveza en copos (Santiveri S.A., Barcelona) y un suplemento alimenticio, cuya composición había sido desarrollada en los laboratorios de la empresa.

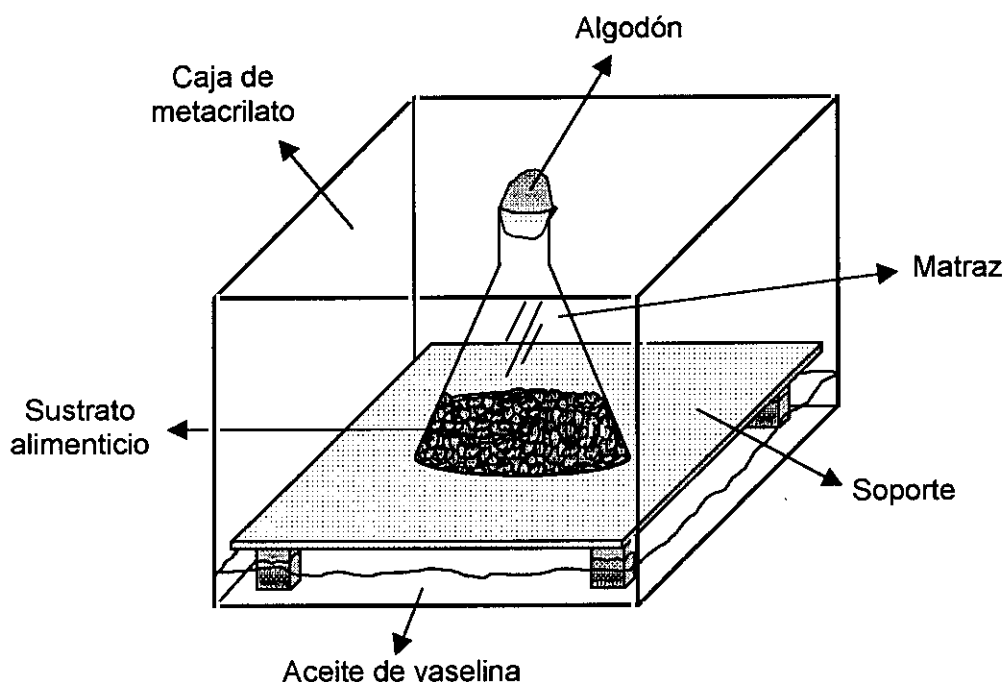


Figura 2. 2. Método de cría de *D. farinae* y *D. pteronyssinus*.

2. 2. BIOENSAYOS

2. 2. 1. General

Las celdas de cría empleadas para los diferentes ensayos fueron análogas a las descritas por Barker (1967). Éstas consistían en un porta excavado con un diámetro de excavación de 16 mm aproximadamente y una profundidad en el centro de alrededor de 0,8 mm, la cuál se cubría con un cubreobjetos de 22 × 22 mm. Para sellar el cubre se hacía correr una gota de agua entre éste y el porta y se aplicaba una gota de agua. Al

secarse quedaba perfectamente sellado sin que se impidieran tanto el intercambio gaseoso como el de humedad. Previamente los ácaros, en número y estado correspondiente a cada tipo de ensayo, eran introducidos en cada porta junto con una escama de levadura de cerveza por medio de la utilización de un pincel de calibre 00 humedecido en agua destilada (Figura 2. 3.).

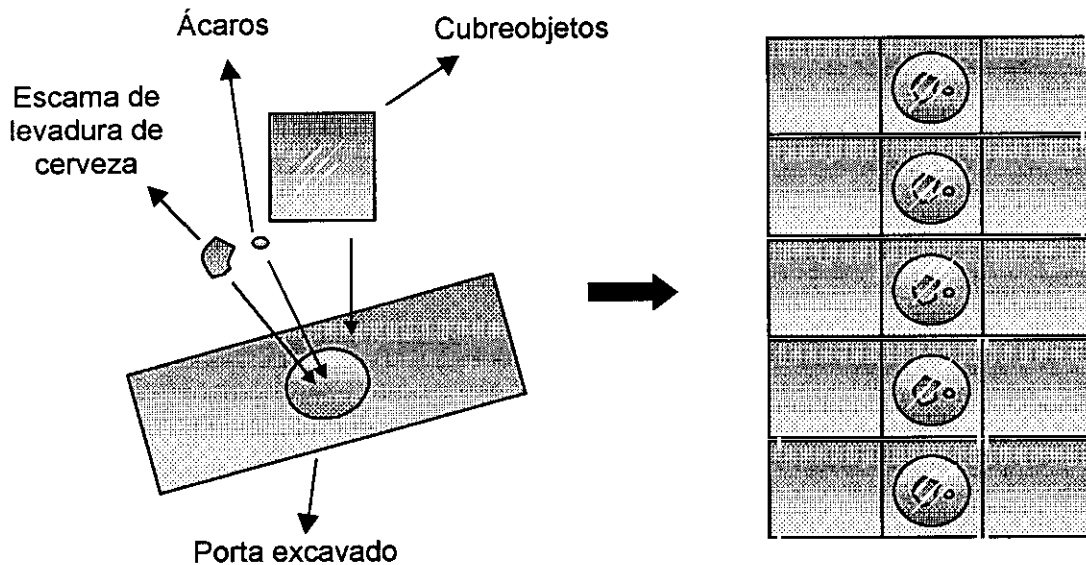


Figura 2. 3. Esquema del método empleado para los ensayos con ácaros astigmátidos.

La diferenciación de los sexos se efectuó atendiendo a los caracteres sexuales secundarios descritos por Hughes (1976). La identificación del estado de larva se realizó contando el número de patas, ya que este estado, a diferencia de los de protoninfa y tritoninfa, presenta tres pares de patas en vez de cuatro. La determinación de los dos estados ninfales se llevó a cabo atendiendo al tamaño relativo.

En los ensayos en los que fue necesario pesar cantidades pequeñas, éstas se realizaron por medio de una balanza de precisión Mettler AM100 (Mettler-Toledo, Suiza).

Todas las observaciones se realizaron por medio de una lupa binocular Wild M8 (Wild Heerbrugg, Suiza) con zoom de 6-50 aumentos y con una fuente de luz fría Intralux 5000 (Volpi, Suiza) para evitar el efecto del calor de las lámparas convencionales sobre los ácaros.

2. 2. 2. Efecto de factores físicos sobre la biología de *T. putrescentiae*

2. 2. 2. 1. Temperatura

Para estudiar el efecto de la temperatura sobre la biología del ácaro del moho se establecieron poblaciones de reserva a la temperatura correspondiente que fueron mantenidas durante un periodo mínimo de un mes antes del inicio de los ensayos, con el fin de lograr su aclimatación (Fields, 1992). De esta forma, para todas las temperaturas en estudio excepto para 10° C, se conseguía que al menos una generación completara su desarrollo en la condiciones deseadas antes de iniciarse los ensayos.

El desarrollo y reproducción de *T. putrescentiae* fueron determinados a las temperaturas constantes de 10, 15, 20, 25, 30, 32,5 y 34°C. El empleo de tres temperaturas en el rango de 30 a 34°C permitía una mejor caracterización del desarrollo de los estados inmaduros a temperaturas cercanas al umbral superior de desarrollo, donde la respuesta de la tasa de desarrollo frente a la temperatura sufre un descenso no lineal desde la temperatura óptima de desarrollo hasta la temperatura letal superior (Logan et al., 1976; Wagner et al., 1984a; Logan, 1988; Briere y Pracros, 1998).

- *Desarrollo y supervivencia de estados inmaduros.* Para establecer la duración de los distintos estados inmaduros de *T. putrescentiae* se partió de 100 huevos individualizados de menos de 24 horas para las temperaturas situadas entre 15 y 32,5°C, mientras que para 10 y 34°C se emplearon 200 y 120 respectivamente debido a que a dichas temperaturas era de esperar una mayor mortalidad al situarse cerca de los umbrales de desarrollo inferior y superior indicados por Cunnington (1969). Para la obtención de los huevos se extrajeron hembras de las poblaciones aclimatadas y se dispusieron en portas con escamas frescas de levadura de cerveza. Al día siguiente se recogían los huevos que habían sido depositados a lo largo del día y se individualizaban. El desarrollo desde el estado de huevo hasta adulto era registrado diariamente, estableciéndose tanto la duración como la mortalidad de cada estado.

- *Reproducción y supervivencia imaginal.* Para estudiar la reproducción de *T. putrescentiae*, 70 parejas individualizadas de menos de 24 horas fueron establecidas para cada temperatura. Para obtener los machos y hembras, tritoninfes quiescentes fueron recogidas de los cultivos de reserva aclimatados e introducidas dentro de celdas

de cría junto con escamas frescas de levadura de cerveza. Al día siguiente, los nuevos adultos eran sexados y emparejados registrándose diariamente el número de huevos puestos por cada pareja hasta la muerte de la hembra. Las parejas se transferían a nuevas celdas de cría con dieta fresca antes de la eclosión de los huevos. Cuando un macho moría antes que su correspondiente hembra era sustituido por otro macho de la misma edad, para lo cual se disponía de una reserva de machos procedentes de las tritoinfas quiescentes a partir de las cuales se estableció la población en estudio.

Para cada temperatura, la tasa de fertilidad (calculada como: número de parejas fértiles / número inicial de parejas \times 100), el periodo de preoviposición, el periodo de oviposición, el número total de huevos producidos por hembra (fecundidad), el número de huevos producidos por hembra y por día (tasa de producción de huevos) y la longevidad de machos y hembras fueron calculados. La producción diaria de huevos de la población fue empleada para construir curvas de fecundidad diaria media por hembra y curvas de fecundidad acumulada media por hembra. Para construir estas curvas se consideró el número inicial de hembras fértiles durante todo el periodo de oviposición de la población. El porcentaje diario de machos y hembras supervivientes de las parejas fértiles fue empleado para construir curvas de supervivencia.

• *Tabla de vida y parámetros poblacionales.* Una vez determinado el periodo pre-reproductivo, la supervivencia pre-reproductiva y las matrices de nacimientos, se construyó la tabla de vida para cada temperatura y se calcularon los distintos parámetros poblacionales por medio del programa r_m 2.0 (Taberner et al., 1993). Por medio de este programa se obtuvo una estimación de la varianza de la tasa intrínseca de incremento natural (r_m), así como su intervalo de confianza, a través de la aplicación de técnicas de Bootstrap, empleando 500 réplicas, tal y como Meyer et al. (1986) recomiendan.

Los parámetros calculados a partir de la tabla de vida fueron los siguientes:

- Tasa intrínseca de incremento natural (r_m), que representa *la tasa de incremento por individuo bajo condiciones físicas específicas, en un ambiente ilimitado donde los efectos del incremento de la densidad no son considerados* (Birch, 1948). La r_m es la constante en la ecuación diferencial para el incremento de una población en un ambiente ilimitado:

$$dN/dt = r_m N$$

siendo la forma integrada:

$$N_t = N_0 e^{r_m t}$$

donde,

N_0 = número de individuos a tiempo igual a 0

N_t = número de individuos a tiempo igual a t

r_m = tasa infinitesimal de incremento

t = tiempo

La r_m se interpreta como la diferencia entre la tasa de natalidad (n) y la de mortalidad (m): $r_m = n - m$

- Tasa finita de incremento (λ). Se define como el *número de veces que una población con una distribución de edades estable se multiplica en la unidad de tiempo* (Birch, 1948). Se calcula como:

$$\lambda = e^{r_m}$$

- Tasa de reproducción neta (R_0). Se define como el *número de hembras producidas por una hembra durante su vida* (Hone, 1992). También suele definirse como el *número de veces que una población se multiplica por generación* (Laughlin, 1965) o, según la definición original de Lotka (1945), como *la tasa de multiplicación en una generación*. Se obtiene a partir de la siguiente expresión:

$$R_0 = \sum_0^{\infty} l_x m_x$$

donde,

l_x = proporción de individuos supervivientes a la edad x (días)

m_x = número medio de hembras producidas en la unidad de tiempo (días) por una hembra de la edad x (días).

- Duración media de una generación (T). Según Laughlin (1965), se define como la *edad media en el momento de la reproducción en una población con una distribución de edades estable*. De forma más sencilla se definiría como el *tiempo que transcurre desde que una generación nace hasta el momento medio de nacimiento de toda su progenie*. T se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$T = \ln R_0 / r_m$$

- Tiempo de duplicación de la población (TDP). Es el tiempo necesario para que una población duplique su número de individuos. Se obtiene como:

$$\text{TDP} = \ln 2 / r_m$$

- Distribución de edades estable. Para las temperaturas con un valor obtenido de r_m positivo se calculó la distribución estable de edades según el método descrito por Birch (1948).

2. 2. 2. 2. Humedad relativa

Se escogieron 3 humedades relativas para evaluar el efecto de este factor físico sobre la biología de *T. putrescentiae*. Estas humedades fueron 70, 80 y 90%. El procedimiento general para el estudio del desarrollo, reproducción y cálculo de los parámetros poblacionales respecto de la humedad relativa fue igual al realizado para la temperatura con algunas particularidades.

Para la humedad relativa de 90% se emplearon los mismos datos obtenidos en los experimentos de temperatura a 25°C. Para la humedad de 80% se estableció una población de reserva que se mantuvo durante un mes antes del inicio de los ensayos para lograr su aclimatación. Para los ensayos a 70% de humedad se recogieron 100 huevos de menos de 24 horas de una población aclimatada a 80% de humedad relativa y se establecieron 70 parejas individualizadas de menos de 24 horas a partir de tritoninfes quiescentes desarrolladas también a 80% HR.

2. 2. 3. Evaluación de la actividad acaricida de monoterpenos componentes de aceites esenciales de plantas

2. 2. 3. 1. Productos ensayados

Las sustancias empleadas para evaluar su efecto acaricida fueron cariofileno, mirtanol, pineno, terpineol y valenceno (proporcionados por el Dr. Benjamín Rodríguez del Instituto de Química Orgánica de Madrid (C.S.I.C., Madrid, España)); linalol, α -terpineno y γ -terpineno (Sigma Chemical Co., St. Louis, EEUU), linalil acetato, eucaliptol, fenchona y mentona (Acros Organics, New Jersey, EEUU) y pulegona (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza). Para su aplicación fueron disueltos en metanol, a excepción del γ -terpineno que fue disuelto en ciclohexano.

2. 2. 3. 2. Ensayos

Para evaluar la actividad acaricida, se emplearon como cámaras de fumigación cajas de plástico de 134 mm \times 95 mm \times 30 mm, con un volumen interior de 300 cm³. Dentro de la caja se introducía un porta excavado con diez individuos del estado correspondiente a cada ensayo y una escama de levadura de cerveza en el interior de la excavación, sellándose ésta con un cubre, de forma que cada caja con un porta constituía una réplica (Figura 2. 4.). Las sustancias a evaluar se administraban en la dosis necesaria previa disolución, por medio de una micropipeta Gilson P20 (Gilson Medical Electronics, Francia) sobre un tapón de 8 mm de diámetro, que hacía de recipiente y que se colocaba en el interior de la caja adyacente al porta. El volumen de disolución aplicado fue de 20 μ l/caja para todos los ensayos. Las dosis empleadas se expresan en forma de μ l de producto por litro, referido al volumen de la cámara de fumigación. El periodo de exposición fue de 24 horas en todos los ensayos. Los ensayos de selección y caracterización de los productos naturales se realizaron sobre hembras debido a que observaciones preliminares revelaron que éstas eran el estado móvil más resistente a los monoterpenos en estudio.

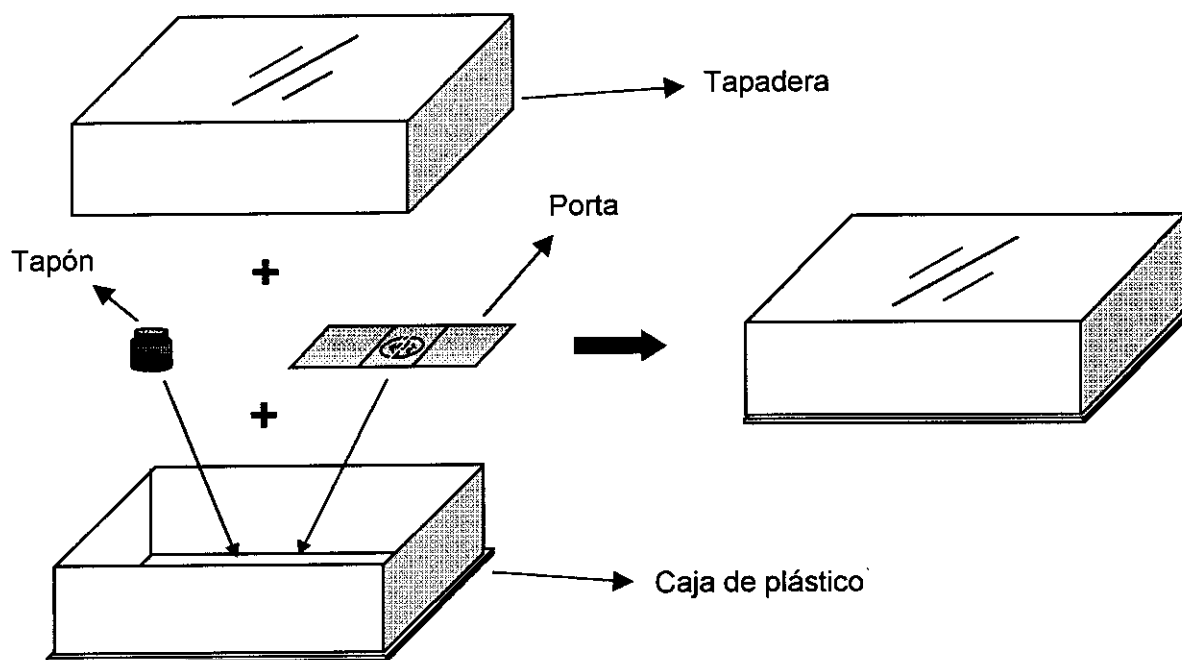


Figura 2. 4. Cámara de fumigación empleada en los ensayos de actividad de monoterpenos componentes de aceites esenciales de plantas.

- *Ensayos de actividad.* Se probaron todos los productos mencionados a una dosis de $66,7 \mu\text{l/l}$ (equivalente a $20 \mu\text{l/caja}$) para seleccionar aquéllos que tuvieran un mayor efecto acaricida. Cinco réplicas de diez hembras de menos de una semana de edad fueron empleadas para cada producto. Como control se emplearon los disolventes utilizados para las disoluciones, esto es, el metanol y el ciclohexano, a una dosis también de $66,7 \mu\text{l/l}$. Aquellos compuestos que produjeron una mortalidad superior al 90% fueron seleccionados para la evaluar su actividad a distintas dosis.

- *Ensayos de dosis-mortalidad.* Para cada producto seleccionado en los ensayos de discriminación se establecieron seis dosis y un control tratado con el disolvente empleado para cada sustancia. Cinco repeticiones de diez hembras de menos de una semana de edad fueron utilizadas para cada dosis y para los controles. Como el porcentaje de mortalidad es, en general, proporcional al logaritmo de la dosis, se emplearon series de las mismas que seguían, aproximadamente, una progresión geométrica. Para cada producto se estimó la CL50 y la CL90, es decir las concentraciones que producen un 50% y un 90% de mortalidad respectivamente. La Tabla 2. 1. muestra las dosis empleadas para cada producto.

Tabla 2. 1. Dosis ($\mu\text{l/l}$) utilizadas para los productos naturales en los ensayos de dosis-mortalidad.

Fenchona	Mentona	Linalol	Eucaliptol	Pulegona	α -Terpineno	γ -Terpineno
5,3	2,5	4,3	10	2,7	20	22,7
6,3	3	5,3	13	3,3	23,3	25,3
7,7	3,7	6,3	15	3,7	28,3	28,3
9,3	4,3	7,7	17,3	4	33,3	31,7
11,3	5	9	19,7	5	37,3	35,7
13,7	6	10,7	22,7	6,3	41,7	40

• *Efecto del sexo y el estado de desarrollo en la mortalidad.* La mortalidad diferencial de larvas, machos y hembras fue determinada para cada producto a la CL50 estimada a partir de los resultados de los ensayos de caracterización. Para cada estado y producto se emplearon diez réplicas con diez individuos cada una. El ensayo se realizó con machos y hembras de menos de una semana de edad así como con larvas de menos de 16 horas de edad. Para la obtención de las larvas se extrajeron huevos de menos de 24 horas de edad que eran controlados diariamente hasta la eclosión de las primeras larvas. El ensayo tenía lugar dentro de las 16 horas siguientes a ese momento.

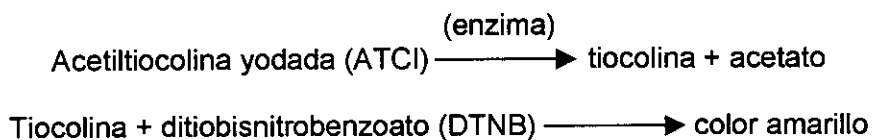
Una vez transcurridas las 24 horas se procedía a la observación de la mortalidad. Para establecer la muerte de los ácaros se empleó un criterio similar al descrito por Perrucci (1995), aunque con una pequeña modificación que se describe a continuación: todos los ácaros que, aún presentando movimientos de las patas, eran incapaces de caminar se trasladaban con ayuda de un pincel fino humedecido a nuevos portos con dieta fresca. Estos ácaros eran observados durante tres días para determinar si eran capaces de recuperarse. Los ácaros que no recuperaban su capacidad para desplazarse eran finalmente estimulados mecánicamente con un pincel fino, de forma que la ausencia de reacción fue considerada como indicativa de su muerte (Stendel y Fuchs, 1984).

• *Efecto de los monoterpenos sobre los huevos.* Para determinar el efecto de los monoterpenos seleccionados en los ensayos de actividad sobre el estado de huevo se

emplearon huevos de menos de 24 horas de edad que fueron obtenidos de la misma forma que los empleados en los ensayos de desarrollo frente a factores físicos. Para cada producto se emplearon cinco réplicas de diez huevos cada una que fueron expuestos a las CL90 estimadas para cada producto durante 24 horas. Diariamente se observó la evolución de los huevos hasta que eclosionaban, registrándose tanto la mortalidad como la duración de dicho estado.

2. 2. 3. 3. Determinación de la actividad acetilcolinesterasa

La actividad acetilcolinesterasa fue determinada según el método de Ellman et al. (1961). Este método se basa en el incremento de absorbancia (A_{405}) que se produce tras la reacción de la tiocolina con el ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB). La tiocolina se origina por la acción de la acetilcolinesterasa sobre la acetiltiocolina yodada (ATCI):



Los monoterpenos ensayados fueron pulegona, mentona, fenchona, linalol, eucaliptol y α -terpineno, todos ellos disueltos en metanol. El γ -terpineno no pudo ser ensayado debido a que el disolvente empleado (ciclohexano) hacía inviable la reacción. Para determinar la actividad enzimática se homogeneizaron 9 mgr de ácaros en 500 μ l de tampón fosfato 0,1 M pH 8, que contenía un 1% de Tritón X-100. El extracto obtenido se mantuvo durante una hora a 4°C antes de ser centrifugado, extrayéndose posteriormente el sobrenadante. Se emplearon 20 μ l del extracto obtenido para cada reacción. El DTNB (50 μ l) y la ATCI (20 μ l) fueron añadidos diluidos en tampón fosfato 0,1 M pH 7,5. Las disoluciones de los monoterpenos se añadieron en un volumen de 50 μ l. La concentración final de cada producto respecto al volumen de reacción fue la siguiente: DTNB, 1 mM; ACTI, 1 mM; monoterpenos, 10 mM. El volumen final de la reacción fue de 1 ml, añadiéndose tampón fosfato 0,1 M pH 8 con 1% de Tritón-X-100, hasta alcanzar dicho volumen. La reacción se iniciaba, previa incubación durante 10 minutos a 30°C, al añadir la ACTI, determinándose el incremento de absorbancia a 405 nm durante 10 minutos. Para el control se emplearon 50 μ l de metanol en lugar de las disoluciones que contenían los monoterpenos y en cada reacción se estableció un blanco que carecía de extracto. El porcentaje de actividad se estableció como la media de los porcentajes de actividad registrados en tres repeticiones.

Para establecer una referencia comparativa, previamente se determinó la concentración que producía un 50% de inhibición (CI50) para el clorpirifos, insecticida organosfosforado cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la acetilcolinesterasa. El clorpirifos fue disuelto en agua destilada, empleándose 4 dosis (10 μ M, 30 μ M, 60 μ M y 100 μ M, respecto al volumen final de la reacción) con su blanco correspondiente más un control a partir del cual se determinó el porcentaje de inhibición. Los valores obtenidos se ajustaron a una regresión logarítmica para establecer la CI50. En cada ensayo se emplearon 3 repeticiones.

En todo los ensayos, el incremento de absorbancia fue medido en un espectrofotómetro Hitachi U-2000 .

2. 2. 4. Ensayos de actividad de plaguicidas

2. 2. 4. 1. Productos ensayados

Los plaguicidas seleccionados para determinar su efecto por ingestión sobre *T. putrescentiae* fueron los siguientes:

- *Azadiractina*. Producto con un 95% de pureza suministrado por Sigma Chemical Co. (St Louis, EEUU).
- *Piriproxifén*. Concentrado emulsionable al 10%, suministrado por Sumitomo Chemical Co., (Osaka, Japón).
- *Halofenocida*. Producto técnico, suministrado por Rohm & Haas Co. (Spring House, PA, EEUU).
- *Hexaflumurón*. Concentrado emulsionable, 100 g. i.a./litro, de nombre comercial Consult 10EC, suministrado por Dow-Elanco España.
- *Spinosad*. Suspensión concentrada, 480 g. i.a./litro, de nombre comercial Tracer, suministrado por Dow-Elanco (Indianapolis, EEUU).

• *Clorpirifos*. Líquido emulsionable, 480 g. i.a./litro, de nombre comercial Dursban 48, suministrado por Agrocros España.

El organofosforado clorpirifos y los controles correspondientes fueron empleados como tratamientos de referencia.

2. 2. 4. 2. Ensayos

El halofenocida y la azadiractina fueron disueltos en metanol para su aplicación y el resto en agua destilada. Estos disolventes fueron asimismo empleados como controles. Todos los productos fueron aplicados por medio de una micropipeta Gilson P2 (Gilson Medical Electronics, Francia) en 2 μ l del disolvente correspondiente sobre escamas de levadura de cerveza de alrededor de 1,3 mg de peso, las cuales fueron proporcionadas a los ácaros como alimento.

Las dosis empleadas en los experimentos de desarrollo fueron 10, 100, 1.000 y 10.000 ppm respecto al peso de la escama para todos los productos. Diez réplicas de 5 larvas menores de 16 horas fueron empleadas para cada tratamiento. Diariamente se controlaba el desarrollo de los ácaros registrándose la duración y la mortalidad total.

Los plaguicidas que mostraron mayor actividad sobre los estados inmaduros fueron seleccionados para los experimentos de fecundidad, aplicándose en dosis de 1.000 y 10.000 ppm respecto al peso de la escama. Diez parejas individualizadas de menos de 24 horas fueron establecidas para cada dosis y producto seleccionado, con su control correspondiente. Para ello se extraían tritoninfas quiescentes de los cultivos de reserva y se disponían sobre escamas de levadura de cerveza tratadas a la dosis correspondiente. Al día siguiente los adultos se sexaban y emparejaban introduciéndose cada pareja dentro de las celdas de cría sobre una escama tratada. Diariamente y durante un periodo de 25 días se contabilizaba el número de huevos puestos. La fecundidad se obtuvo teniendo en cuenta el número inicial de parejas y para la supervivencia se consideraron los machos y hembras juntos dentro de cada tratamiento. De los huevos puestos dentro de los primeros 5 días de oviposición, diez por pareja fueron extraídos y transferidos a celdas de cría con una escama de levadura de cerveza, siguiéndose su evolución para determinar el efecto sobre la fertilidad y el desarrollo.

2. 2. 5. Ensayos de actividad de inhibidores de proteasas y lectinas

2. 2. 5. 1. Ensayos con *T. putrescentiae*

Los inhibidores empleados se eligieron tomando como referencia la caracterización de las proteasas digestivas de *T. putrescentiae* realizada por Ortego et al. (2000). Diferentes inhibidores correspondientes a los distintos tipos de proteasas detectadas fueron seleccionados para la realización de los ensayos *in vivo*.

En dichos ensayos se emplearon 10 réplicas de 5 larvas de menos de 16 horas para cada producto y control. Las larvas se observaron cada 24 horas hasta que los ácaros alcanzaron el estado adulto, registrándose la duración del desarrollo y la mortalidad total. Los ácaros fueron alimentados con una escama de levadura de cerveza de aproximadamente 1,3 mg de peso tratada con un 1% en peso de albúmina (usada como control), un 1% de los siguientes inhibidores de proteasas seleccionados: SBBI (Soybean Bowman-Birk Inhibitor), CEOM (Chicken Egg White Ovomuroid), TEI (Turkey Egg White Inhibitor), STI (Soybean Trypsin Inhibitor), LBI (Lima Bean Inhibitor), E-64 (L-trans-epoxisuccinil-leucilamido-(4-guanidino)-butano), pepstatina-A, bestatina, y PCPI (Potato Tuber Carboxypeptidase Inhibitor); o un 1% de las siguientes lectinas: VSA (*Vicia sativa* Agglutinin), LEA (*Lycopersicon esculentum* Agglutinin), WGA (Wheat Germ Agglutinin), Con-A (Concavalin-A) y DBA (*Dolichos biflorus* Agglutinin); solos o en mezclas. Todos los sustratos, inhibidores de proteasas y lectinas fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, EEUU). Los compuestos fueron añadidos en 2 μ l de disolución acuosa de NaCl 0,15 M, excepto la pepstatina-A que fue añadida en 2 μ l de metanol.

2. 2. 5. 2. Ensayos con ácaros del polvo

La selección de los inhibidores para los ensayos *in vivo* se realizó basándose en los resultados *in vitro* obtenidos Pemas et al. (en prensa). Para estudiar el efecto de los inhibidores seleccionados sobre la mortalidad y el desarrollo de *D. pteronyssinus* y *D. farinae* se emplearon 10 réplicas por tratamiento y especie, cada una con 10 huevos de menos de 24 horas. Los ensayos se iniciaron en el estado de huevo debido a que las larvas de ambas especies se mostraron muy sensibles a la manipulación directa. Para la obtención de los huevos, se extrajeron hembras de las poblaciones de reserva mantenidas

por ALK Abelló S. A. (Madrid, España) y se dispusieron en portas excavados sobre dieta fresca dejándolas poner huevos durante 24 horas y retirándolas tras ese periodo de tiempo. Inmediatamente, los huevos eran recogidos y agrupados de 10 en 10. Un día antes del periodo mínimo para la eclosión de los huevos de cada especie, estimado a partir de observaciones preliminares, se introducía una escama de levadura de cerveza de alrededor de 1,3 mg de peso que se trataba con el inhibidor correspondiente. Los inhibidores seleccionados fueron el SBBI y el E-64, los cuales fueron aplicados a una concentración del 1% en peso en 2 µl de agua destilada, que asimismo fue utilizada como control. Diariamente se observaba el desarrollo de los ácaros hasta que alcanzaban el estado de protoninfa, registrándose la duración del estado de huevo, la duración total desde huevo hasta protoninfa y la mortalidad del estado de larva. Los ensayos tuvieron lugar bajo unas condiciones de $24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y $80 \pm 5\%$ HR y en oscuridad total.

2. 3. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

2. 3. 1. Modelización

El ajuste de los modelos no lineales y la estimación de los parámetros se realizaron por medio de los programas Tablecurve 2D (Jandel Scientific, San Rafael, CA) y SAS (SAS Institute, Cary, NC). Por su parte, el ajuste y obtención de los parámetros de los modelos lineales se realizaron a través del programa estadístico Statgraphics Plus 3.0 (Statgraphics, user's guide, STSC, Rockville, MD)

2. 3. 1. 1. Supervivencia de estados inmaduros

Los porcentajes de mortalidad obtenidos a las temperaturas constantes consideradas para los diferentes estados de desarrollo de *T. putrescentiae* así como la mortalidad preimaginal total fueron ajustados a la siguiente ecuación no lineal, extraída de Parajulee et al. (1995):

$$\ln y = a + bT^2 + cT^3$$

donde $\ln y$ representa el porcentaje de mortalidad, T es la temperatura y a , b y c son parámetros.

2. 3. 1. 2. Modelos de desarrollo

La relación entre la temperatura (T) y la tasa de desarrollo, obtenida como la inversa del tiempo empleado para completar un estado ($r=1/d$), fue determinada por medio del ajuste al modelo lineal clásico de grados-día y a los modelos no lineales de Logan tipo III (Hilbert y Logan, 1983), Lactin et al. (1995) y Briere et al. (1999). El modelo lineal fue seleccionado por su simplicidad mientras que los modelos no lineales fueron seleccionados ya que, a diferencia de otros modelos, son capaces de predecir los umbrales superior e inferior de temperatura para el desarrollo. Los modelos fueron aplicados a los estados de huevo, larva, protoninfa, tritoninfa y a la duración total del periodo preimaginal. La estimación inicial de los parámetros para los modelos no lineales fue realizada siguiendo las indicaciones de Logan (1988).

- *Modelo lineal de grados-día.* La relación entre la temperatura (T) y la tasa de desarrollo $r(T)$ fue predicha por medio de un análisis de la regresión donde

$$r(T) = a + bT$$

siendo el parámetro a la ordenada de la recta en el origen y b la pendiente. El umbral mínimo de desarrollo (t_b) y los grados-día (GD) requeridos para completar el desarrollo fueron estimados por medio de las ecuaciones $t_b = -a/b$ y $DD = 1/b$. El rango de temperaturas empleado para la obtención de los modelos lineales fue de 10 a 30°C.

- *Modelo de Logan tipo III* (Hilbert y Logan, 1983). La expresión matemática de este modelo es una combinación de dos funciones. La primera representa el incremento de la tasa de desarrollo en relación al incremento de la temperatura. Dicha función es de tipo sigmoïdal y es análoga a la forma de la curva de respuesta funcional tipo III de Holling (1965). La segunda función, desarrollada por Logan et al. (1976), representa la porción descendente de la tasa de desarrollo en relación al incremento de la temperatura. La expresión del modelo es

$$r(T) = \psi [(T - T_b)^2 / ((T - T_b)^2 + D^2) - e^{-((T_m - (T - T_b)) / \Delta T)}]$$

donde T es la temperatura; $r(T)$ es la tasa de desarrollo a la temperatura T ; T_b es la temperatura base (a temperaturas inferiores a la temperatura base la tasa de desarrollo

es cero según el modelo); T_m es el umbral de temperatura máxima letal expresada en °C por encima de la temperatura base de forma que $T_m + T_b = T_{max}$; ΔT es la anchura del área límite de temperaturas altas y representa el rango de temperaturas en el que la crisis termal tiene una influencia decisiva; ψ y D son dos constantes empíricas.

- *Modelo de Lactin et al.* Lactin et al. (1995) modificaron el modelo no lineal de Logan et al. (1976, ecuación 6) para obtener un modelo que estimara el umbral mínimo de desarrollo. Para ello eliminaron el parámetro ψ del modelo original e introdujeron uno nuevo (λ) que permite la estimación del umbral mínimo de desarrollo. La expresión del modelo es la siguiente

$$r(T) = e^{\rho T} - e^{[\rho T_{max} - (T_{max} - T) / \Delta]} + \lambda$$

donde T es la temperatura; $r(T)$ es la tasa de desarrollo a la temperatura T ; T_{max} es la temperatura supraóptima a la que $r(T) = \lambda$; Δ es la diferencia entre T_{max} y la temperatura a la que $r(T)$ es máxima (T_{rmax}); ρ describe la aceleración de la función desde el umbral mínimo de temperatura hasta la temperatura óptima; λ permite a la curva cortar a la abcisa a temperaturas subóptimas permitiendo a su vez la estimación de un umbral mínimo de desarrollo; este parámetro representa la asíntota a la que la función tiende a bajas temperaturas. Este modelo se empleó asimismo para describir la relación entre la tasa intrínseca de incremento natural (r_m) y la temperatura.

- *Modelo de Briere et al.* Con el fin de obtener un modelo simplificado de desarrollo (con el menor número de parámetros posible) para describir la relación no lineal entre la tasa de desarrollo y la temperatura, Briere et al. (1999) desarrollaron un modelo de 3 parámetros cuya expresión es como sigue

$$r(T) = \begin{cases} 0 & \text{si } T \leq T_0 \\ aT(T - T_0) \sqrt{T_L - T} & \text{si } T_0 \leq T \leq T_L \\ 0 & \text{si } T \geq T_L \end{cases}$$

donde T es la temperatura; $r(T)$ es la tasa de desarrollo a la temperatura T ; T_0 es el umbral inferior de temperatura para el desarrollo; T_L es el umbral superior de temperatura para el desarrollo; a es una constante empírica.

Para la comparación de los modelos, Logan (1988) sugiere la utilización del coeficiente de determinación ajustado de Kvalseth (1985). Dicho coeficiente permite la comparación de funciones con diferente número de grados de libertad (i. e. el número de parámetros funcionales) y su expresión es la siguiente

$$R_a^2 = 1 - (1 - R_i^2) (n - 1/n - k - 1)$$

donde n es el número de observaciones, k es el número de parámetros en la i -ésima función, R_a^2 es el coeficiente de determinación ajustado y R_i^2 se calcula como

$$R_i^2 = 1 - \frac{\sum_{j=1}^n (y_j - \hat{y}_{ji})^2}{\sum_{j=1}^n (y_j - \bar{y})^2}$$

siendo y_j la j -ésima tasa de desarrollo observada y \hat{y}_{ji} la j -ésima tasa de desarrollo predicha de la i -ésima función.

2. 3. 1. 3. Modelos polinomiales

La función polinomial que mejor se ajustó a los datos observados fue usada para modelizar el periodo de preoviposición, el periodo de oviposición, la fecundidad, la tasa de producción de huevos y la longevidad de machos y hembras. El ANOVA de la regresión y las pruebas de la t de Student para cada parámetro fueron empleados como criterio de selección de la función polinomial que mejor se ajustaba a los datos, usando un nivel de significación del 5%. El polinomio cuyo parámetro de orden superior fuera significativamente distinto de cero era seleccionado.

2. 3. 1. 4. Modelos de fecundidad

- *Función Maxima* (Richter y Söndgerath, 1990). La función Maxima fue empleada para ajustar la fecundidad diaria media por hembra a cada temperatura. La ecuación es

$$f(t) = \alpha t \exp(-\tau t)$$

donde $f(t)$ representa la fecundidad diaria media por hembra, α y τ son parámetros y t es el tiempo.

• *Función Weibull acumulada*. La fecundidad acumulada media por hembra a cada temperatura fue ajustada usando una función Weibull acumulada de 5 parámetros seleccionada del programa estadístico Tablecurve 2D. La ecuación fue seleccionada al ser la que proporcionó un mayor coeficiente de determinación (R^2) y por describir de manera apropiada los datos observados. La expresión de esta ecuación es

$$f(t) = a + b (1 - \exp(-((t + d(\ln 2)^{1/e} - c) / d)^e))$$

donde $f(t)$ representa la fecundidad acumulada media por hembra, a , b , c , d y e son parámetros y t es el tiempo.

2. 3. 1. 5. Modelo de supervivencia en adultos

• *Función Weibull* (Pinder III et al., 1978). La supervivencia de machos y hembras a cada temperatura fue ajustada a la función Weibull, cuya expresión general es

$$S(t) = \exp[-(t/b)^\beta]$$

donde $S(t)$ representa la probabilidad de sobrevivir a una edad determinada, b es el parámetro que describe la escala, β es el parámetro que describe la forma de la curva y t es el tiempo.

2. 3. 2. Análisis estadísticos

Para la comparación entre medias de los distintos parámetros considerados en los diferentes capítulos de la presente tesis se emplearon de manera preferente pruebas paramétricas. Diversos autores coinciden en indicar la robustez del análisis de la varianza (ANOVA) ante las violaciones de normalidad e igualdad de varianzas, premisas necesarias para la aplicación de estas pruebas, especialmente si se dispone de tamaños muestrales elevados y éstos son más o menos iguales (Zar, 1984; Milliken y Johnson, 1984). Sólo ante severas desviaciones de la homogeneidad de varianzas estos autores recomiendan el uso de pruebas no paramétricas.

Cuando fue necesario comparar dos muestras se empleó la prueba de la t de Student mientras que para establecer diferencias entre tres o más medias se empleó el ANOVA. Dentro de este caso, cuando sólo existía una variable independiente se empleó

el ANOVA de una vía y cuando existían dos variables independientes se empleó el ANOVA de dos vías. El análisis del efecto de inhibidores de proteasas, lectinas y plaguicidas en el desarrollo de los estados inmaduros de *T. putrescentiae* se realizó encajando el efecto "porta" dentro del efecto "tratamiento" por medio de un ANOVA encajado. Para establecer entre qué medias existían diferencias significativas se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls. En el caso de querer comparar distintos grupos de datos frente a un grupo control se utilizó la prueba de Dunnett de dos colas. El efecto de las mezclas de inhibidores de proteinasas y lectinas fue comparado con el grupo de medias de sus componentes por separado por medio de contrastes.

Cuando existían severas desviaciones de la homogeneidad de varianzas se procedió a realizar un cambio de variable por medio de la transformación $y = \ln(x+1)$. Cuando alguna de las medias muestrales presentaba varianza 0 se emplearon preferiblemente las pruebas no paramétricas de la U de Man-Whitney (para dos muestras) o de Kruskal-Wallis (para más de dos muestras). Esta situación se dio en la comparación de porcentajes de mortalidad. Para detectar qué tratamientos producían mortalidades significativamente distintas de su control correspondiente una vez aplicada la prueba de Kruskal-Wallis, se empleó la prueba de Dunn. Esta misma prueba se empleó en los ensayos de productos naturales para establecer qué estados presentaban porcentajes de mortalidad significativamente diferentes entre sí.

Por otra parte, cuando fue necesario la comparación de frecuencias ésta se llevó a cabo por medio de la prueba de la Chi-cuadrado. Si en dichas comparaciones el número de grados de libertad era igual a 1 se aplicó la corrección de Yates.

La calidad del ajuste de los modelos lineales y no lineales empleados (exceptuando los modelos de desarrollo preimaginal) se estableció a partir del coeficiente de determinación R^2 .

Los análisis se realizaron por medio de los programas estadísticos Statgraphics Plus 3.0, SPSS 6.0.1 (SPSS Inc.) y SuperAnova (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA). En todos los análisis se empleó un nivel de significación del 5%.

Los resultados de mortalidad a distintas dosis obtenidos con los productos naturales más activos se ajustaron a rectas de regresión ponderada probit, estimándose

las CL50 y CL90 para la mortalidad de las hembras y sus límites fiduciales al 95%, utilizando el programa Polo (LeOra Software, 1997) basado en Finney (1971). La mortalidad fue corregida previamente respecto a la del control por medio de la fórmula de Abbott (Abbott, 1987). A continuación se desarrolló una prueba de paralelismo según el método de estimación de las potencias relativas. Para establecer qué líneas paralelas eran diferentes entre sí se utilizó el criterio de solapamiento de los límites fiduciales de las potencias relativas con un nivel de significación del 5%.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA BIOLOGÍA DE *T. putrescentiae*

3. 1. INTRODUCCIÓN

En los ácaros, como en el resto de organismos ectotérmicos, la temperatura juega un papel fundamental en el desarrollo y la supervivencia de las poblaciones (Tauber et al., 1986). Dentro del rango favorable de temperaturas en las que un organismo ectotérmico puede subsistir, el incremento de la temperatura conlleva un aumento de la actividad metabólica y, por tanto, un incremento en el ritmo de los procesos biológicos desempeñados por este tipo de organismos. Las temperaturas extremas, sin embargo, alteran el normal funcionamiento de diferentes procesos fisiológicos (Fields, 1992), limitando la capacidad de desarrollo. Como consecuencia, la manipulación de este factor supone uno de los más simples métodos disponibles en la actualidad para el control de plagas de ácaros e insectos. En este sentido se han estudiado el desarrollo y la reproducción de *T. putrescentiae* bajo distintas condiciones de temperatura (Rivard, 1961; Barker, 1967; Cunningham, 1969 y 1976) con el fin de determinar los umbrales térmicos de este ácaro así como el efecto en la capacidad de incremento de sus poblaciones. Sin embargo, la estimación de las temperaturas límite de desarrollo se realizó de forma poco

precisa y sin ningún intento de aplicar modelos matemáticos predictivos para los diferentes parámetros biológicos considerados. Actualmente, la extensa disponibilidad de modelos que describen el efecto de diferentes factores ambientales sobre la biología supone una valiosa herramienta para predecir la evolución de las poblaciones de ácaros e insectos plaga. Esta información resulta de enorme utilidad para optimizar las estrategias de control de estos organismos.

Los objetivos específicos abordados en el presente capítulo se enumeran a continuación:

1. Establecer el efecto de una amplia gama de temperaturas en la supervivencia y el desarrollo de los estados inmaduros de *T. putrescentiae*.
2. Aplicar cuatro modelos de desarrollo respecto a la temperatura, con el fin de establecer los umbrales térmicos predichos por cada uno de ellos y seleccionar aquél o aquéllos modelos que mejor describan dicha relación.
3. Establecer modelos predictivos para los parámetros reproductores respecto a la temperatura y para la evolución de la fecundidad y la supervivencia de *T. putrescentiae* respecto al tiempo a las diferentes temperaturas consideradas.
4. Obtener las tablas de vida de *T. putrescentiae* en relación a la temperatura, con el fin de modelizar el efecto de este factor en la capacidad de incremento de las poblaciones de este ácaro y determinar el umbral de desarrollo de dichas poblaciones.

3. 2. RESULTADOS

3. 2. 1. Efecto sobre el desarrollo de los estados inmaduros

3. 2. 1. 1. Mortalidad

La Figura 3. 1. muestra los patrones de mortalidad de los diferentes estados de desarrollo de *T. putrescentiae* obtenidos para el rango de temperaturas elegidas así como el ajuste al modelo no lineal $\ln y = a + bT^2 + cT^3$ (Parajule et al., 1995). Para los estados de huevo, larva y protoninfa, así como para el periodo de desarrollo total se obtuvo un patrón de mortalidad en forma de U (Fig. 3. 1. A, B, C y E). Para las tritoninfas la mortalidad fue prácticamente nula a lo largo de las siete temperaturas estudiadas (Fig. 3. 1. D). El porcentaje de mortalidad obtenido entre 15°C y 32,5°C fue inferior al 7% para todos los estados de desarrollo. Sin embargo, la mortalidad se incrementó bruscamente a las temperaturas inferior (10°C) y superior (34°C) estudiadas para el estado larvario, con unos porcentajes de 93,6% y 53,7% respectivamente. De manera similar, un alto porcentaje (70%) de las protoninfas no consiguieron alcanzar el estado de tritoninfa a 10°C. El porcentaje de mortalidad para el estado de huevo fue similar (alrededor del 22°C) a las 2 temperaturas extremas consideradas.

Tabla 3. 1. Parámetros estimados y coeficientes de determinación (R^2) obtenidos tras la aplicación del modelo no lineal $\ln y = a + bT^2 + cT^3$ a los datos de mortalidad de los estados inmaduros de *T. putrescentiae* con relación a la temperatura

Estado	Parámetros estimados			R^2
	a	b	c	
Huevo	5,3639	-0,03101	0,0008525	0,9982
Larva	9,0084	-0,06151	0,0016811	0,9975
Protoninfa	8,8265	-0,06153	0,0015747	0,9952
Tritoninfa	-5,5299	0,01997	-0,0004774	0,2517
Huevo - Adulto	7,4504	-0,03935	0,0010734	0,9978

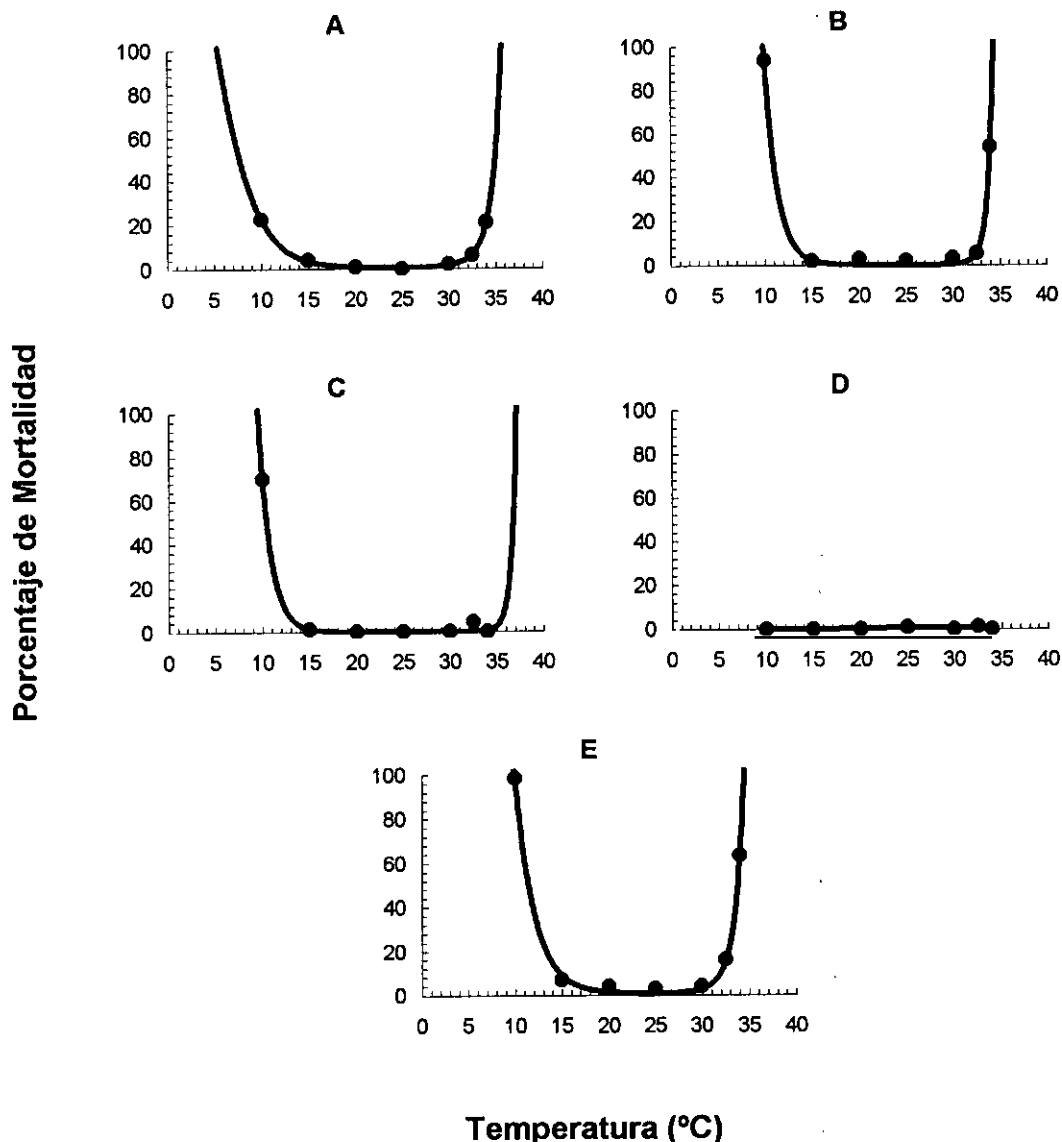


Figura 3. 1. Porcentaje de mortalidad de *T. putrescentiae* a temperaturas constantes (°C). (A) Huevo; (B) Larva; (C) Protoninfa; (D) Tritoninfa; (E) Periodo de Desarrollo Total. (●) Porcentajes de mortalidad observados; (-) línea de mejor ajuste por medio de regresión no lineal al modelo: $lny = a + bT^2 + cT^3$.

La Tabla 3. 1. muestra los parámetros y los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos tras la aplicación del modelo seleccionado a los datos de mortalidad respecto a la temperatura. Como puede apreciarse, los coeficientes de determinación obtenidos, fueron superiores a 0,99 para todos los estados excepto para el de tritoninfa, para el que el ajuste fue bastante pobre, con un coeficiente inferior a 0,26. Esto puede deberse a la ausencia de valores elevados de mortalidad a las temperaturas extremas consideradas para dicho estado de desarrollo.

3. 2. 1. 2. Duración del desarrollo

En la Tabla 3. 2. se pone de manifiesto la gran influencia de la temperatura en la duración de los distintos estados de desarrollo de *T. putrescentiae*. La duración del desarrollo sufre una brusca disminución para todos los estados al incrementarse la temperatura de 10°C a 15°C. A partir de esta temperatura, el tiempo de desarrollo disminuye gradualmente según aumenta la temperatura hasta alcanzar su valor mínimo a 30°C. Por encima de esta temperatura se produce un pequeño incremento del periodo de desarrollo en todos los casos. El periodo de desarrollo total (desde huevo hasta adulto) sigue un patrón similar a lo observado para los estados de desarrollo, sufriendo una drástica disminución desde los 106 días observados a 10°C hasta los únicamente 7,2 a 30°C, aumentando posteriormente hasta 10,5 días a 34°C.

El estado de huevo es el que precisa el mayor tiempo de desarrollo a todas las temperaturas, lo que supone entre un 30,1% y un 40,4% de la duración total. El estado larvario representa entre un 23,4% y un 27,1%; el de protoninfa entre un 15,9% y un 21%, siendo este estado el que menos tiempo precisó para completar su desarrollo; finalmente la duración del estado de tritoninfa supone entre un 19,1% y un 23,5% del total. Los valores medios y sus errores estándar correspondientes obtenidos para cada estado de desarrollo fueron: 36,2% \pm 1,6 (huevo); 24,8% \pm 0,5 (larva); 17,5% \pm 0,7 (protoninfa) y 21,4% \pm 0,7 (tritoninfa).

La influencia de la temperatura y del sexo sobre la duración del periodo de desarrollo total resultó ser significativa ($F = 5522,3$ y $F = 17,0$; $P < 0,0001$), siendo dicha duración mayor en el caso de las hembras que en el de los machos. En este análisis no se incluyeron los datos obtenidos a 10°C al no disponer de valores de desarrollo para los machos a esta temperatura. La interacción entre ambos factores también fue significativa ($F = 2,4$; $P < 0,05$), lo que implica un efecto diferencial de la temperatura en la duración del desarrollo para machos y hembras. Analizando la representación de la interacción se observó que a 34°C la diferencia de duración entre machos y hembras fue proporcionalmente mayor respecto al resto de temperaturas.

La proporción de hembras obtenida a las diferentes temperaturas consideradas fue mayor en todos los casos a la de machos (Tabla 3. 3.). Para determinar si dichas proporciones eran significativamente diferentes entre sí se determinó primero si la

Tabla 3. 2. Duración media del desarrollo (días \pm ES) de los estados inmaduros de *T. putrescentiae* a temperaturas constantes

Temperatura (°C)	Estados de desarrollo				
	Huevo	Larva	Protoninfa	Tritoninfa	Huevo - Adulto
10	32,9 \pm 0,2 (155)	27,7 \pm 1,0 (10)	23,0 \pm 1,5 (3)	25,7 \pm 0,3 (3)	106,0 \pm 2,5 (3)
15	12,3 \pm 0,2 (96)	8,2 \pm 0,1 (94)	5,4 \pm 0,1 (93)	6,3 \pm 0,1 (93)	32,2 \pm 0,2 (93)
20	6,2 \pm 0,1 (99)	4,0 \pm 0,1 (96)	2,5 \pm 0,1 (96)	3,0 \pm 0,1 (96)	15,8 \pm 0,1 (96)
25	3,8 \pm 0,1 (100)	2,2 \pm 0,1 (98)	1,5 \pm 0,1 (98)	1,9 \pm 0,1 (97)	9,4 \pm 0,1 (97)
30	2,8 \pm 0,1 (98)	1,7 \pm 0,1 (95)	1,2 \pm 0,1 (95)	1,5 \pm 0,1 (95)	7,2 \pm 0,1 (95)
32,5	3,0 \pm 0,1 (94)	2,0 \pm 0,1 (89)	1,5 \pm 0,1 (85)	2,0 \pm 0,1 (84)	8,5 \pm 0,2 (84)
34	3,3 \pm 0,1 (95)	2,9 \pm 0,2 (44)	2,0 \pm 0,1 (44)	2,5 \pm 0,1 (44)	10,5 \pm 0,2 (44)

El efecto de la temperatura fue altamente significativo para todos los estados ($P < 0,0001$ en todos los casos, ANOVA de una vía) Debajo de cada valor, entre paréntesis, se indica el tamaño muestral.

temperatura influía en el número de machos y hembras producidos. Este factor no influyó en la proporción sexual ($\chi^2 = 3,39$; $P > 0,7$), de forma que los datos de las distintas temperaturas se agruparon obteniéndose una proporción de hembras global de 54,9% frente a un 45,1% de machos. Tras el análisis de estos resultados se detectaron diferencias significativas entre el número de individuos producidos de ambos sexos ($\chi^2 = 4,69$; $P < 0,05$).

Tabla 3. 3. Proporción sexual y duración media del desarrollo (días \pm ES) para machos y hembras de *T. putrescentiae* a temperaturas constantes

Temperatura (°C)	Machos	Hembras	Proporción de Hembras (%)
10	– ⁽¹⁾	106,0 \pm 2,5 (3)	100
15	32,0 \pm 0,4 (42)	32,4 \pm 0,2 (51)	54,8
20	15,5 \pm 0,1 (47)	16,1 \pm 0,1 (49)	51,0
25	9,2 \pm 0,1 (44)	9,5 \pm 0,1 (53)	54,6
30	7,2 \pm 0,1 (42)	7,2 \pm 0,1 (53)	55,8
32,5	8,4 \pm 0,3 (38)	8,5 \pm 0,2 (46)	54,8
34	9,7 \pm 0,2 (18)	11,1 \pm 0,3 (26)	59,1

⁽¹⁾ Ningún macho completó el desarrollo a 10°C.

Debajo de cada valor, entre paréntesis, se indica el tamaño muestral

3. 2. 1. 3. Modelización del desarrollo de los estados inmaduros

Los parámetros estimados para los diferentes modelos considerados así como los coeficientes de determinación ajustados se muestran en las Tablas 3. 4. (modelo lineal), 3. 5. (modelo de Briere), 3. 6. (modelo de Logan III) y 3. 7. (modelo de Lactin). En el caso de los modelos de Logan III y Lactin también se indican los umbrales térmicos superior e inferior predichos, determinados gráficamente. Los coeficientes de determinación

ajustados fueron en general altos ($> 0,93$) en todos los modelos y para todos los estados de desarrollo. Los requerimientos térmicos necesarios para completar cada estado de desarrollo oscilaron entre los 59,9 GD para el estado de huevo y los 24,7 GD para el de protoninfa, mientras que los estados de larva y tritoninfa precisaron 34,5 y 31,3 GD respectivamente. El desarrollo desde huevo hasta la emergencia de los adultos se estimó en 149,3 GD (Tabla 3. 4.).

Por otra parte, los modelos no lineales permitieron establecer las estimaciones de las temperaturas óptimas de desarrollo de los diferentes estados de *T. putrescentiae*, así como del periodo de desarrollo total. Dichas temperaturas fueron: 31,1°C, 29,5°C, 29,3°C, 29,3°C y 29,8°C (según Briere); 30,9°C, 30,0°C, 29,5°C, 29,4°C y 30,1°C (según Lactin); y 31,2°C, 30,2°C, 29,4°C, 29,4°C y 30,2°C (según Logan III), para los estados de huevo, larva, protoninfa, tritoninfa, y para el periodo de desarrollo total, respectivamente. A dichas temperaturas las tasas de desarrollo predichas fueron 0,3376, 0,5467, 0,7744, 0,6080 y 0,1292 (según Briere); 0,3550, 0,5863, 0,8042, 0,6300 y 0,1362 (según Lactin); y 0,3522, 0,5790, 0,7999, 0,6244 y 0,1351 (según Logan III), respectivamente. Como puede apreciarse tanto las temperaturas óptimas como las tasas de desarrollo predichas por estos modelos fueron muy similares entre sí. Asimismo, los patrones mostrados por los modelos no lineales fueron también muy parecidos (Figura 3. 2. A2-E2, Figura 3. 3. A1-E1 y A2-E2), produciéndose en todos los casos un brusco descenso de la tasa de desarrollo desde la temperatura óptima predicha hasta el umbral térmico superior.

Los umbrales térmicos superiores predichos por los modelos no lineales resultaron ser muy similares entre sí para todos los estados (Tablas 3. 5., 3. 6., 3. 7.). Sin embargo, en el caso de los estados de huevo y larva y del periodo de desarrollo total, las estimaciones obtenidas para los umbrales térmicos inferiores según los modelos lineal y de Briere fueron sensiblemente mayores a las proporcionadas por los modelos de Logan III y Lactin, con una discrepancia media de alrededor de 4°C. En el caso de los estados ninfales los dos primeros modelos estimaron umbrales inferiores de entre 9 y 10°C, mientras que las estimaciones facilitadas por los otros dos oscilaron entre los 6 y los 8°C (Tablas 3. 4. a 3. 7.). En general se aprecia como el desarrollo individual de esta especie de ácaro se sitúa en el rango de temperaturas situadas entre los 5-10°C y los 35-37°C.

Tabla 3. 4. Umbrales inferiores de desarrollo y periodo de desarrollo en grados-día para los estados inmaduros de *T. putrescentiae*, estimados según el modelo lineal

Estado	Parámetros estimados		R_a^2	GD	t_b
	a	b			
Huevo	-0,1544	0,0167	0,9867	59,9	9,3
Larva	-0,2889	0,029	0,9822	34,5	10,0
Protoninfa	-0,3877	0,0405	0,9838	24,7	9,6
Tritoninfa	-0,2991	0,032	0,9947	31,3	9,4
Huevo - Adulto	-0,0642	0,0067	0,9885	149,3	9,6

t_b , umbral inferior de desarrollo; GD, grados día (°C). R_a^2 , coeficiente de determinación ajustado de la regresión lineal entre la tasa de desarrollo ($r = 1/d$) y la temperatura (°C); a y b, ordenada y pendiente de la recta de regresión.

Tabla 3. 5. Parámetros estimados según el modelo no lineal de Briere et al. (1999) para la relación entre la temperatura (°C) y la tasa de desarrollo ($r=1/d$) de los estados inmaduros de *T. putrescentiae*.

Estado	Parámetros estimados			R_a^2
	a	T_o	T_L	
Huevo	0,00019044	8,8226	37,6069	0,9746
Larva	0,00040656	10,5399	35,2798	0,9315
Protoninfa	0,00056269	9,9069	35,1665	0,9760
Tritoninfa	0,00042701	9,3546	35,2357	0,9616
Huevo - Adulto	0,00008815	9,74094	35,8076	0,9611

a, constante empírica; T_o , umbral inferior de desarrollo; T_L , umbral superior de desarrollo; R_a^2 , coeficiente de determinación ajustado.

Tabla 3. 6. Umbrales de desarrollo y parámetros estimados según el modelo no lineal de Logan III (Hilbert y Logan, 1983) para la relación entre la temperatura (°C) y la tasa de desarrollo ($r=1/d$) de los estados inmaduros de *T. putrescentiae*.

Estado	Parámetros estimados					R_a^2	UI	US
	ψ	D	ΔT	T_m	T_b			
Huevo	1,5650	44,7422	2,6047	35,2493	4,4357	0,9976	4,4	37,0
Larva	3,4461	48,0399	2,5103	32,6592	6,0496	0,9926	6,1	35,5
Protoninfa	5,5975	45,5324	4,0723	34,4246	6,5888	0,9964	7,3	36,1
Tritoninfa	2,4648	34,2779	3,4219	32,7756	6,0996	0,9849	6,3	36,1
Huevo - Adulto	1,0711	58,3899	3,0273	35,7253	4,9177	0,9950	5,0	36,1

ψ y D, constantes empíricas; ΔT , amplitud del área límite a altas temperaturas; T_m , umbral de temperatura máxima letal; T_b , temperatura base; R_a^2 , coeficiente de determinación ajustado; UI, umbral inferior de desarrollo; US, umbral superior de desarrollo.

Tabla 3. 7. Umbrales de desarrollo y parámetros estimados según el modelo no lineal de Lactin et al. (1995) para la relación entre la temperatura (°C) y la tasa de desarrollo ($r=1/d$) de los estados inmaduros de *T. putrescentiae*.

Estado	Parámetros estimados				R_a^2	UI	US
	ρ	T_{max}	Δ	λ			
Huevo	0,1489	37,6388	6,6902	-0,0425	0,9989	5,4	37,4
Larva	0,1724	35,8060	5,7794	-0,0535	0,9944	6,1	35,7
Protoninfa	0,1416	36,5136	6,9526	-0,1988	0,9925	8,4	36,0
Tritoninfa	0,1378	36,6551	7,1576	-0,1604	0,9709	8,0	36,1
Huevo - Adulto	0,1539	36,5819	6,4867	-0,0198	0,9931	6,8	36,3

ρ , aceleración de la función; T_{max} , temperatura supraóptima a la que $r(T) = \lambda$; Δ , rango de temperaturas entre T_{max} y T_{max} ; λ , parámetro que permite a la curva cortar a la abcisa a temperaturas subóptimas; R_a^2 , coeficiente de determinación ajustado; UI umbral inferior de desarrollo; US, umbral superior de desarrollo.

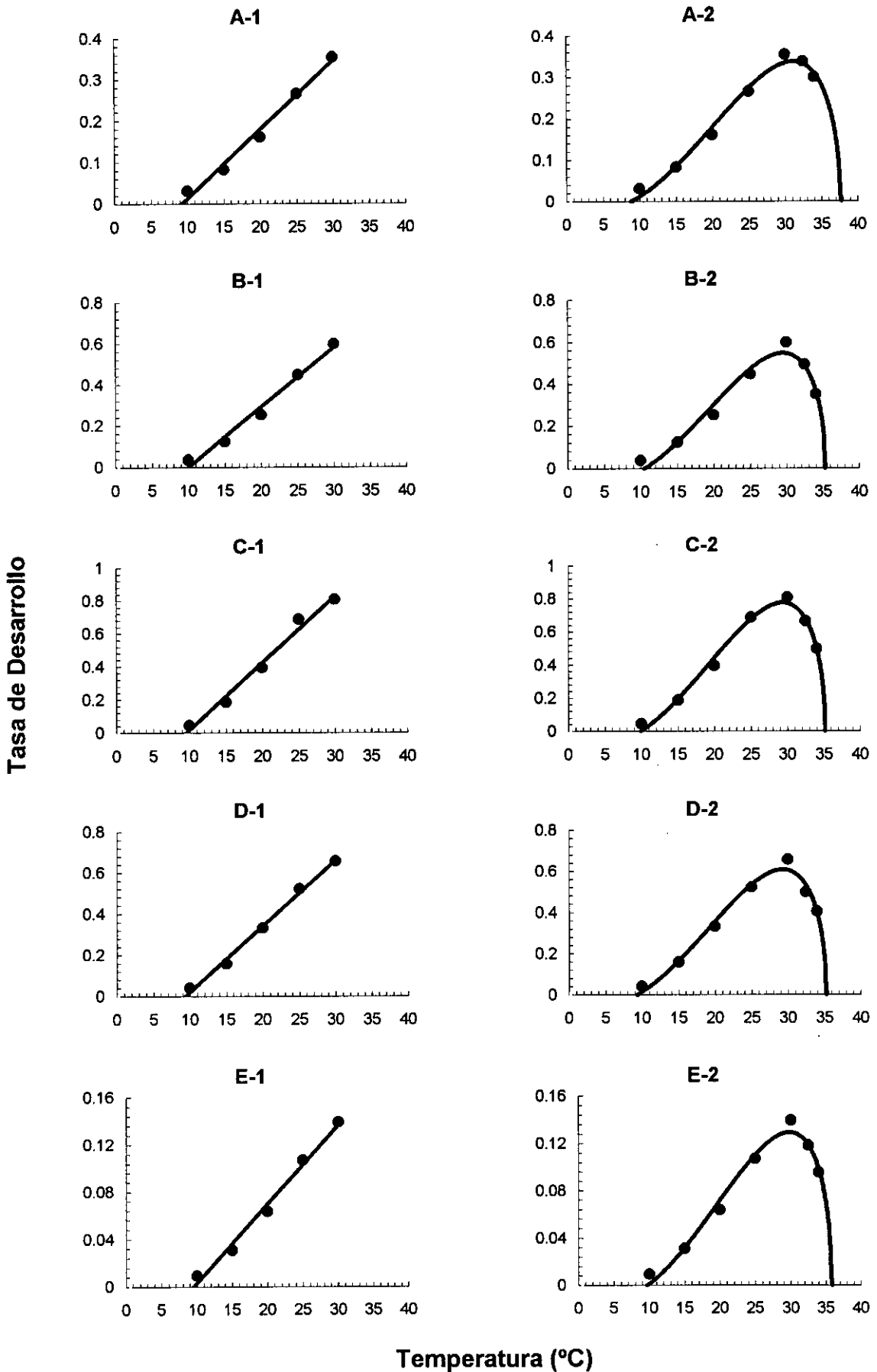


Figura 3. 2. Modelos lineal (1) y de Briere et al. (2) para los estados de Huevo (A), Larva (B), Protoninfa (C), Tritoninfa (D) y para el Periodo Preimaginal Total (E) de *Tyrophagus putrescentiae* en función de la temperatura. (•) Tasas de desarrollo observadas; (-) línea de mejor ajuste por medio de regresión lineal para el modelo (1) y no lineal para el modelo (2).

Tasa de Desarrollo

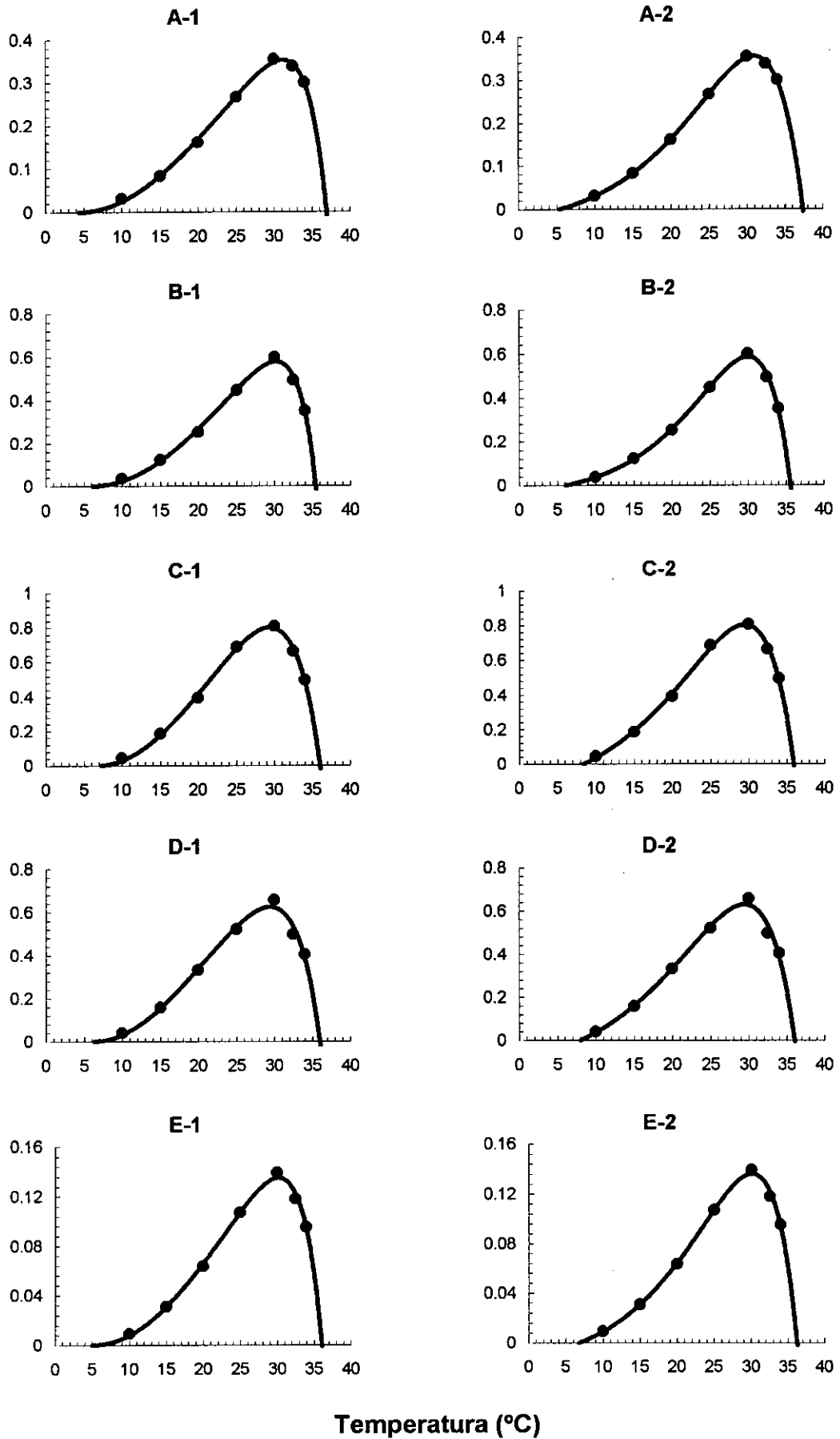


Figura 3.3. Modelos de Logan III (1) y Lactin (2) para los estados de Huevo (A), Larva (B), Protoninfa (C), Tritoninfa (D) y para el Periodo Preimaginal Total (E) de *Tyrophagus putrescentiae* en función de la temperatura. (•) Tasas de desarrollo observadas; (-) línea de mejor ajuste por medio de regresión no lineal.

3. 2. 2. Efecto sobre la reproducción y el desarrollo de los adultos

3. 2. 2. 1. Modelización de parámetros reproductores y longevidad

El efecto de la temperatura sobre los distintos parámetros reproductores y sobre la longevidad de machos y hembras se muestra en la Tabla 3. 8.

El periodo de preoviposición a 10°C fue entre 9 y 30 veces mayor que los periodos de oviposición obtenidos para el resto de temperaturas, no siendo incluido en el posterior análisis polinomial. El modelo polinomial que mejor describió la evolución del periodo de preoviposición, del número total de huevos producidos por hembra y de la longevidad de machos y hembras respecto a la temperatura fue la regresión cuadrática, mientras que el periodo de oviposición y el número de huevos producidos por hembra y por día fueron mejor ajustados por medio de regresión lineal y cúbica respectivamente (Figura 3. 4.).

La gran extensión del periodo de preoviposición a 10°C ($35,7 \pm 2,0$ días) sugiere que esta temperatura está cerca del umbral inferior de desarrollo de las poblaciones de *T. putrescentiae*. El menor periodo de preoviposición se obtuvo a 30°C, iniciándose la puesta sólo $1,2 \pm 0,1$ días después de la muda de las tritoninfas quiescentes. Por encima de esta temperatura este parámetro tiende a incrementarse ligeramente.

El periodo de oviposición se incrementó a medida que la temperatura disminuía, aunque la mayor duración se obtuvo a 15°C, con casi 54 días.

La temperatura afectó significativamente al número de parejas fértiles obtenidas a cada temperatura. En el rango entre 15°C y 34°C el porcentaje de fertilidad fue cercano al 100%, mientras que a 10°C sólo un 69% de las parejas iniciales puso huevos.

La fecundidad se vio negativamente afectada por las temperaturas extremas, obteniéndose el menor número de huevos por hembra a 10°C y 34°C. A 20°C se produjo la mayor fecundidad, con casi 555 huevos por hembra, aunque el máximo número de huevos puestos por hembra y día ocurrió a 25°C, con más de 24 huevos depositados cada día. A 10°C, el número de huevos puestos por hembra y por día fue de tan solo 0,7 huevos.

La longevidad de machos y hembras mostró patrones diferentes en relación a la temperatura. En las hembras este parámetro se incrementó a medida que la temperatura disminuía, mientras que los machos tuvieron su máxima esperanza de vida a 20°C, disminuyendo la longevidad por encima y por debajo de esta temperatura (Tabla 3. 8., Figura 3. 4.). En cualquier caso, las longevidades de los machos entre 10°C y 20°C no fueron significativamente diferentes entre sí ($P > 0,05$, prueba de Newman-Keuls). La longevidad en machos fue significativamente mayor que la registrada en hembras ($F = 291,9$; $P < 0,0001$), existiendo además un efecto de interacción estadísticamente significativo ($F = 22,3$; $P < 0,0001$) entre la temperatura y el sexo en relación a la longevidad. Se observa como la magnitud de la diferencia de longevidad en machos y hembras es mucho más pronunciada a temperaturas intermedias respecto a las extremas.

3. 2. 2. 2. Curvas de fecundidad

La función Maxima proporcionó un buen ajuste a los datos de fecundidad diaria media por hembra de la población para todas las temperaturas (Tabla 3. 9., Figura 3. 5.), con coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0,91, excepto para 10°C, temperatura que registró el peor ajuste ($R^2 = 0,73$). Los picos de fecundidad predichos por esta función tuvieron lugar a los días 27, 15, 10, 6, 4, 5 y 3, para 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 32,5°C y 34°C, respectivamente.

Las curvas de fecundidad acumulada media por hembra se muestran en la Figura 3. 6., y los parámetros estimados de la función Weibull acumulada en la Tabla 3. 10. El ajuste fue excelente con R^2 mayores de 0,999 para todas las temperaturas.

Tabla 3. 8. Parámetros reproductores y longevidad (media \pm ES) de *T. putrescentiae* a temperaturas constantes

Temperatura (°C)	Porcentaje de Fertilidad	Periodo de Preoviposición	Periodo de Oviposición	Fecundidad	Tasa de Producción de Huevos	Longevidad de Machos	Longevidad de Hembras
10	68,6%	35,7 \pm 2,0 (48)	47,0 \pm 3,2 (48)	32,2 \pm 2,9 (48)	0,7 \pm 0,1 (48)	112,7 \pm 5,3 (48)	94,5 \pm 3,8 (48)
15	100%	3,8 \pm 0,3 (70)	53,8 \pm 3,2 (69)	413,1 \pm 23,8 (69)	8,0 \pm 0,2 (69)	123,7 \pm 3,6 (69)	73,9 \pm 5,0 (69)
20	100%	2,1 \pm 0,2 (70)	34,2 \pm 1,7 (69)	554,8 \pm 30,6 (69)	16,1 \pm 0,5 (69)	125,0 \pm 6,2 (69)	48,3 \pm 3,6 (69)
25	92,9%	1,5 \pm 0,1 (65)	21,0 \pm 1,2 (64)	488,3 \pm 28,5 (64)	24,2 \pm 1,0 (64)	79,7 \pm 4,2 (64)	37,3 \pm 3,6 (64)
30	97,1%	1,2 \pm 0,1 (68)	18,6 \pm 1,0 (65)	327,6 \pm 18,5 (65)	17,4 \pm 0,6 (65)	62,6 \pm 2,7 (65)	34,7 \pm 2,3 (65)
32,5	97,1%	1,4 \pm 0,1 (67)	16,2 \pm 1,0 (64)	218,7 \pm 14,6 (64)	13,4 \pm 0,5 (64)	46,1 \pm 2,2 (64)	33,3 \pm 2,4 (64)
34	94,3%	1,5 \pm 0,1 (66)	10,9 \pm 0,8 (66)	68,3 \pm 6,3 (66)	6,0 \pm 0,3 (66)	36,8 \pm 1,6 (66)	27,4 \pm 1,9 (66)

El efecto de la temperatura fue altamente significativo para todos los parámetros ($P < 0,0001$ en todos los casos, prueba de la χ^2 para la fertilidad y ANOVA de una vía para el resto).

Debajo de cada valor, entre paréntesis, se indica el tamaño muestral.

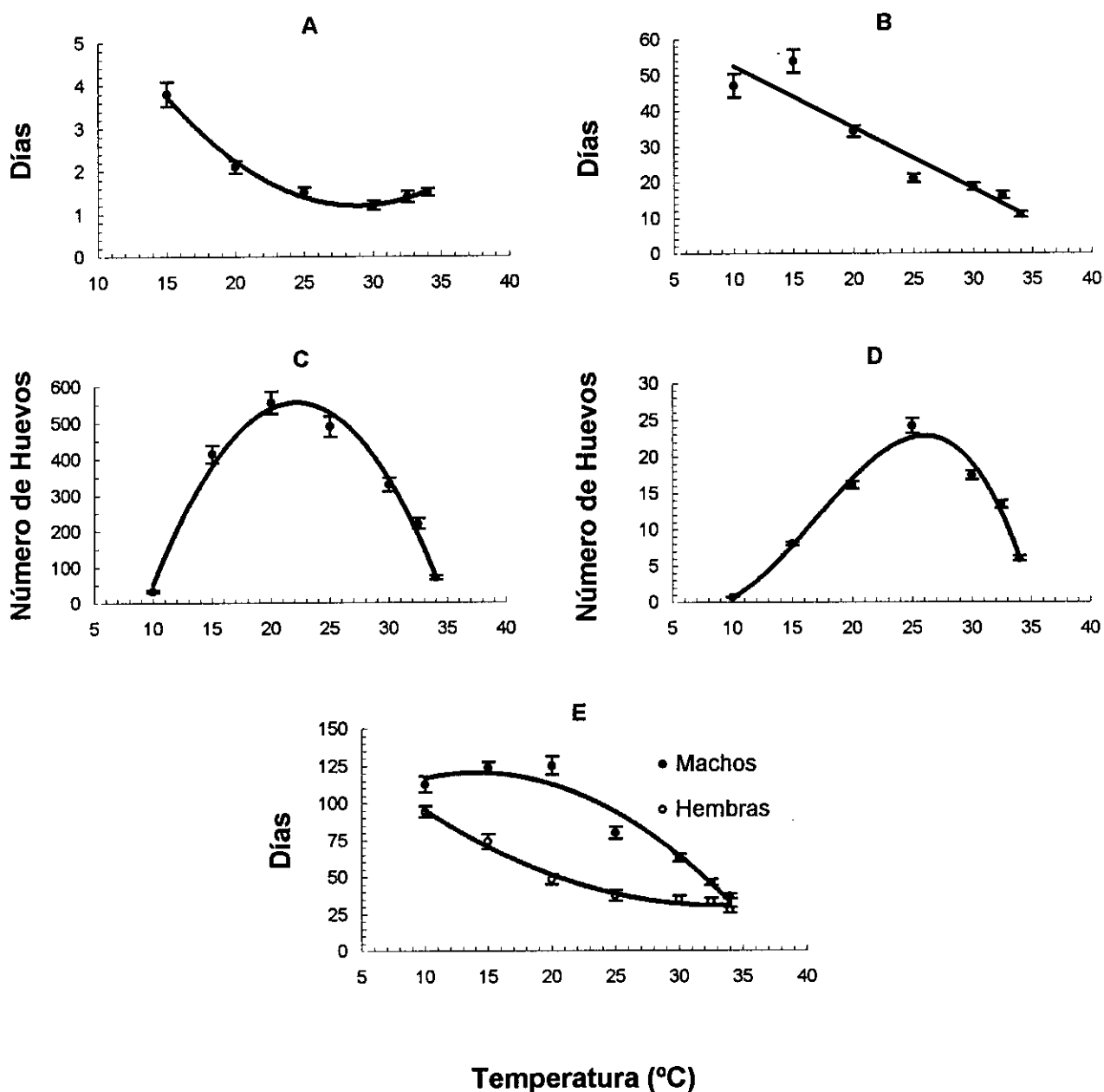


Figura 3.4. Relación entre la temperatura y periodo de preoviposición (A), periodo de oviposición (B), fecundidad (C), tasa de producción de huevos (D) y longevidad (E) de machos (●) y hembras (○) para *T. putrescentiae*. Los coeficientes de determinación (R^2) y los parámetros estimados \pm ES para las líneas de regresión polinomial son: (A): $R^2 = 0,9923$; $a_0 = 12,247 \pm 0,754$; $a_1 = -0,765 \pm 0,065$; $a_2 = 0,0132 \pm 0,0013$; (B): $R^2 = 0,8969$; $a_0 = 69,402 \pm 6,532$; $a_1 = -1,706 \pm 0,259$; (C): $R^2 = 0,9822$; $a_0 = -1116,11 \pm 105,53$; $a_1 = 150,939 \pm 10,43$; $a_2 = -3,410 \pm 0,230$; (D): $R^2 = 0,9796$; $a_0 = 14,762 \pm 15,438$; $a_1 = -4,407 \pm 2,466$; $a_2 = 0,374 \pm 0,120$; $a_3 = -0,0074 \pm 0,0018$; (E) Machos: $R^2 = 0,9505$; $a_0 = 77,419 \pm 32,169$; $a_1 = 6,151 \pm 3,179$; $a_2 = -0,2195 \pm 0,070$; (E) Hembras: $R^2 = 0,9863$; $a_0 = 163,476 \pm 11,404$; $a_1 = -8,012 \pm 1,127$; $a_2 = 0,121 \pm 0,025$.

Tabla 3. 9. Parámetros estimados según el modelo Maxima para la evolución de la fecundidad diaria media por hembra de las poblaciones de *T. putrescentiae*

Temperatura (°C)	Parámetros estimados		R ²
	α	τ	
10	0,0535	0,0375	0,7305
15	1,7628	0,0656	0,9457
20	5,8719	0,1021	0,9631
25	15,1207	0,1716	0,9782
30	17,2071	0,2289	0,9785
32,5	10,3945	0,2116	0,9697
34	7,1154	0,3193	0,9106

Tabla 3. 10. Parámetros estimados según el modelo Weibull acumulado para la evolución de la fecundidad acumulada media por hembra de las poblaciones de *T. putrescentiae*

Temperatura (°C)	Parámetros estimados					R ²
	a	b	c	d	e	
10	-0,4413	32,7895	40,1199	52,8909	2,2928	0,9998
15	-301,7493	716,2591	8,1691	84,7922	2,7499	0,9998
20	-394,5793	949,3201	5,5396	64,6184	3,4407	0,9998
25	0,2026	487,6938	9,1102	10,8629	1,4513	0,9999
30	-330,5713	658,0618	0,6051	23,1201	2,5316	0,9998
32,5	4,9301	213,2506	7,3428	8,4317	1,4883	0,9999
34	-2,2216	71,4716	4,6825	5,7565	1,1358	0,9998

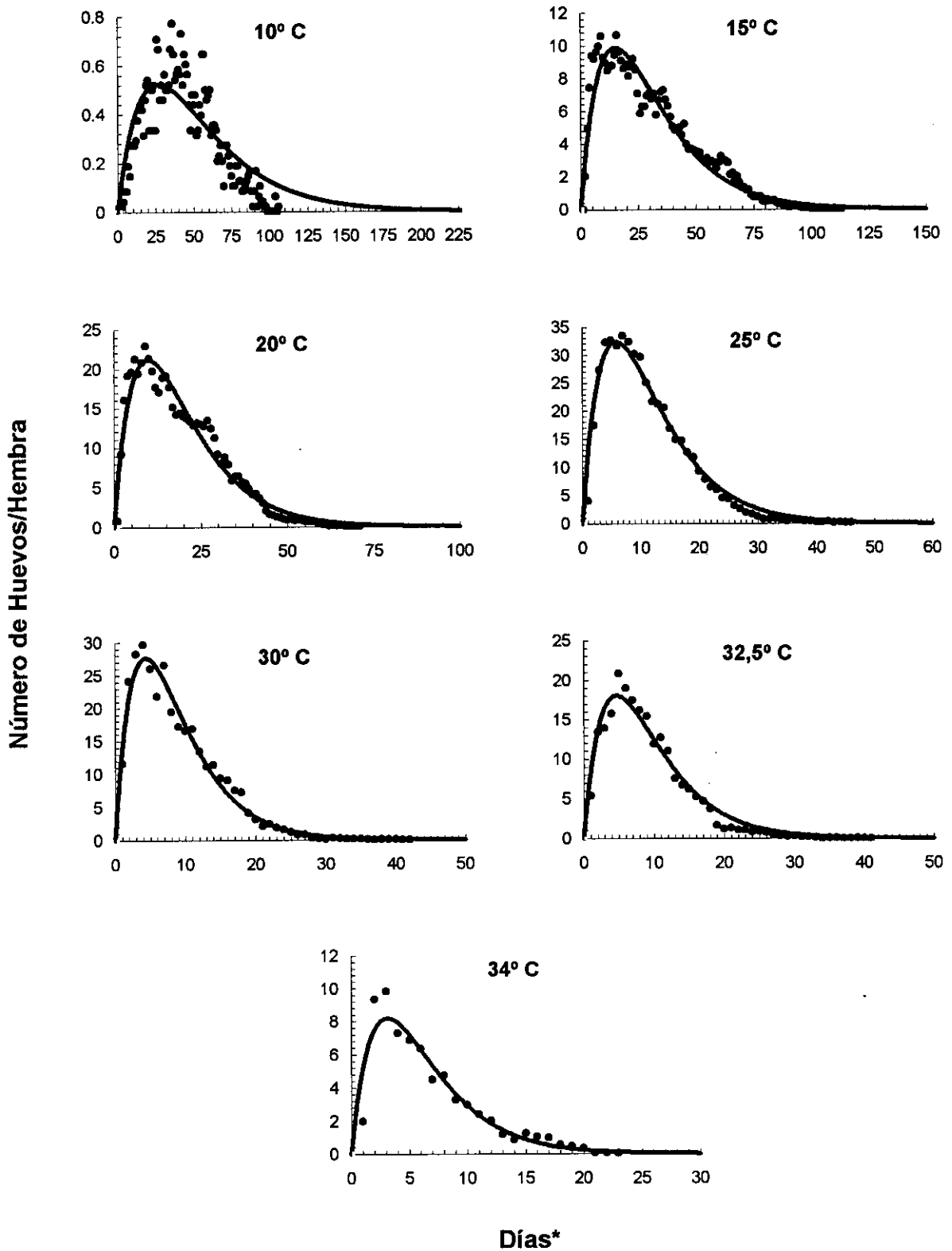


Figura 3.5. Fecundidad diaria media (●) y funciones Maxima ajustadas (-) para las poblaciones de *T. putrescentiae* a siete temperaturas constantes; (* días desde el inicio de la oviposición).

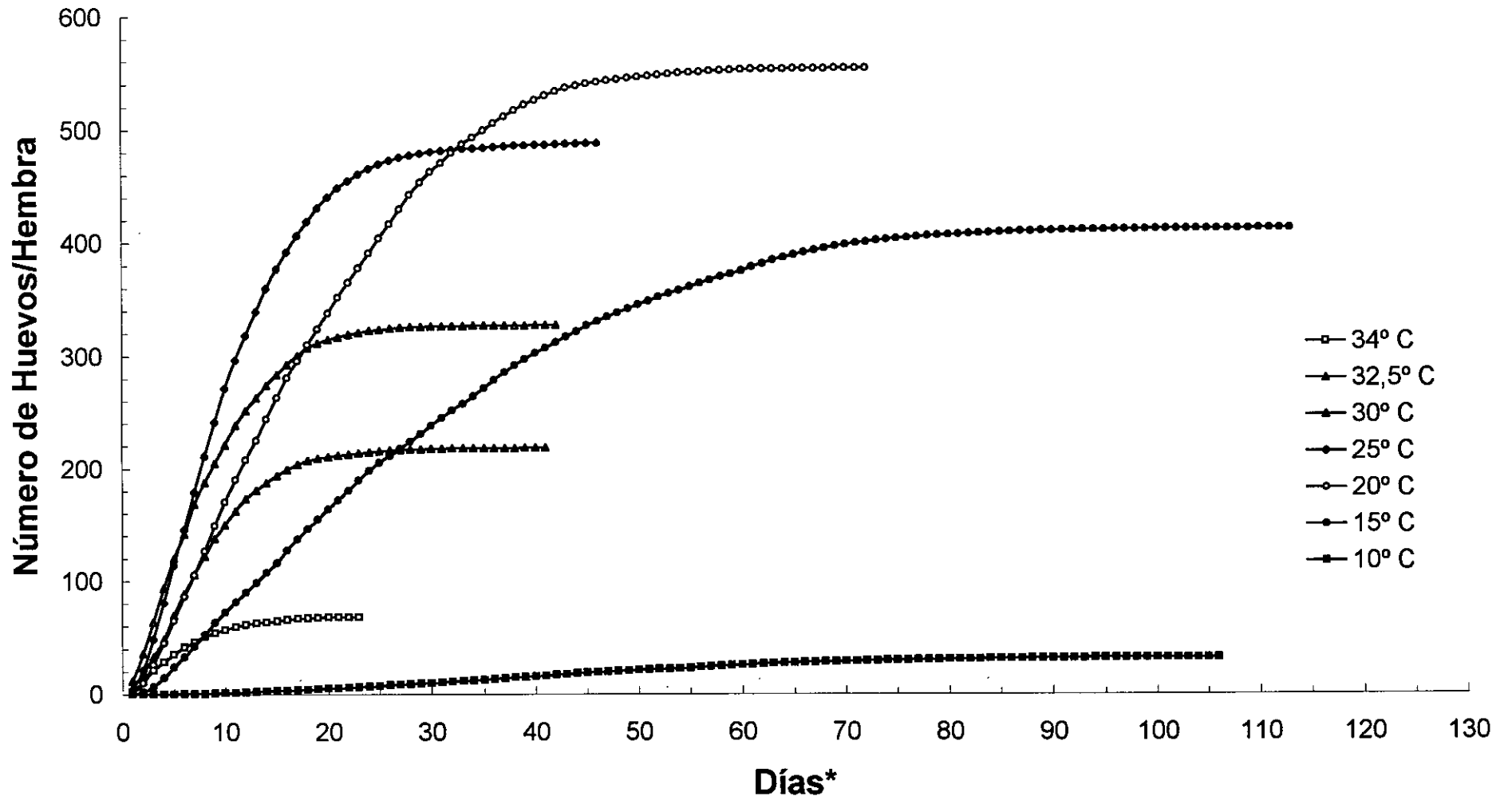


Figura 3. 6. Fecundidad acumulada media para las poblaciones de *T. putrescentiae* a siete temperaturas constantes; (* días desde el inicio de la oviposición).

3. 2. 2. 3. Curvas de supervivencia

La distribución Weibull proporcionó un excelente ajuste a los datos de supervivencia obtenidos, con coeficientes de determinación superiores a 0,96 en ambos sexos para todas las temperaturas en estudio (Tabla 3. 11., Figura 3. 7.). La comparación del parámetro que describe la forma de la función (β), entre machos y hembras mostró un patrón diferencial de mortalidad en relación al sexo a lo largo de las siete temperaturas. Este parámetro fue siempre significativamente mayor para los machos en relación a las hembras, excepto a 10°C, temperatura a la que esta situación fue inversa. Por su parte, el parámetro que define la escala de la curva (b), también fue significativamente mayor para los machos respecto a las hembras, incluido a 10°C, situación en consonancia con la mayor longevidad detectada previamente para los machos (ver apartado 3. 2. 2. 1.). La comparación de los parámetros se realizó atendiendo al solapamiento de sus intervalos de confianza al 95%.

3. 2. 2. Tablas de vida de *T. putrescentiae* en relación a la temperatura

La Tabla 3. 12. muestra los resultados obtenidos tras la aplicación del programa r_m 2.0 (Taberner et al., 1993) a las matrices de nacimientos de *T. putrescentiae* para las siete temperaturas estudiadas. Como puede observarse, a 10°C la tasa intrínseca de incremento natural (r_m) fue negativa, lo que indica que a dicha temperatura las poblaciones de este ácaro tienden a desaparecer si las condiciones se mantienen a lo largo del tiempo. El máximo valor de r_m se obtuvo a 30°C, presentando también la menor duración media de una generación (T) y el menor tiempo de duplicación de la población (TDP). El modelo de Lactin se ajustó perfectamente a los valores de r_m obtenidos a las diferentes temperaturas, con un R^2 de 0,9982 (Figura 3. 8.). Este modelo predijo un umbral térmico inferior de desarrollo para las poblaciones de *T. putrescentiae* de 10,4°C y un umbral superior de 34,8°C. La temperatura óptima de desarrollo predicha por el modelo fue 29,5°C, a la que la r_m tomaba el valor 0,3889. A esta temperatura el tiempo de duplicación de la población es de tan solo 1,8 días.

La Figura 3. 9. muestra la distribución de edades estable para las poblaciones de este ácaro a las distintas temperaturas consideradas. Un 89% a 96% de los individuos de una población está constituido por formas juveniles y sólo de un 4% a un 11% son adultos. Dentro de los estados inmaduros, un 65% a 75% corresponden a huevos y el

Tabla 3. 11. Parámetros estimados según el modelo Weibull para la evolución de la supervivencia de machos y hembras de *T. putrescentiae* a siete temperaturas constantes.

Temperatura (°C)	Machos			Hembras		
	b ± ES	β ± ES	R ²	b ± ES	β ± ES	R ²
10	124,2855 ± 0,6354	2,9851 ± 0,0639	0,9821	97,5677 ± 0,3792	5,5716 ± 0,1551	0,9895
15	134,6415 ± 0,5555	6,9685 ± 0,2535	0,9758	88,2296 ± 0,5483	1,5574 ± 0,0251	0,9875
20	143,8753 ± 0,4163	2,6223 ± 0,0286	0,9936	50,8104 ± 0,4486	2,2304 ± 0,0619	0,9826
25	92,0319 ± 0,3905	2,8845 ± 0,0486	0,9914	39,3786 ± 0,6373	1,3400 ± 0,0434	0,9669
30	71,0112 ± 0,2665	3,5641 ± 0,0641	0,9937	39,3247 ± 0,2134	1,9192 ± 0,0289	0,9957
32,5	53,6315 ± 0,4002	3,1338 ± 0,1014	0,9825	39,3892 ± 0,5239	1,6476 ± 0,0571	0,9749
34	42,1220 ± 0,2500	3,1181 ± 0,0787	0,9924	33,0184 ± 0,5073	1,6756 ± 0,0695	0,9713

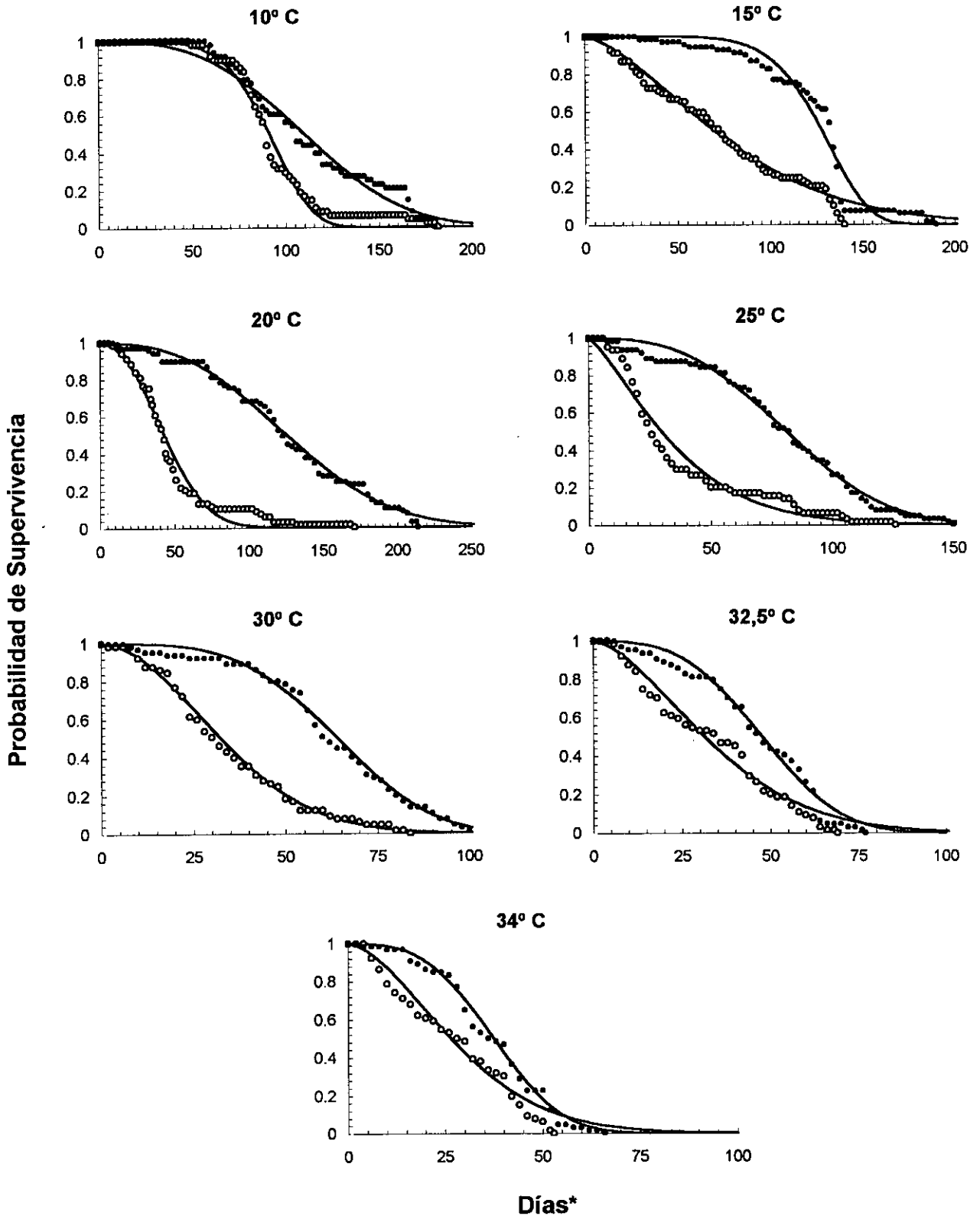


Figura 3. 7. Probabilidad de supervivencia en relación al tiempo para machos (●) y hembras (○) de *T. putrescentiae*, y función Weibull ajustada (-) a siete temperaturas constantes; (* días desde la emergencia).

Tabla 3. 12. Parámetros de la tabla de vida de *T. putrescentiae* a siete temperaturas constantes.

Parámetros	Temperatura (°C)						
	10	15	20	25	30	32,5	34
Supervivencia Pre-reproductora (%)	1,5	93	96	97	95	84	37
$r_m \pm ES$	$-0,0109 \pm 0,0007$	$0,1008 \pm 0,0007$	$0,2052 \pm 0,0017$	$0,3189 \pm 0,0038$	$0,3970 \pm 0,0044$	$0,2989 \pm 0,0042$	$0,1456 \pm 0,0048$
IC 95%	($-0,0123 - -0,0094$)	($0,0994 - 0,1023$)	($0,2019 - 0,2086$)	($0,3113 - 0,3265$)	($0,3882 - 0,4057$)	($0,2906 - 0,3073$)	($0,1361 - 0,1551$)
λ	0,9892	1,1061	1,2278	1,3756	1,4873	1,3484	1,1567
R_0	0,1703	192,1057	266,3165	219,6839	150,9649	89,0591	11,9193
TDP	-	6,88	3,38	2,17	1,75	2,32	4,76
T	162,8567	52,1528	27,2132	16,9087	12,6390	15,0189	17,0227

Supervivencia Pre-reproductora: porcentaje de individuos que alcanzan el estado adulto; r_m : tasa intrínseca de incremento natural; 95% IC: intervalo de confianza al 95% para r_m ; λ : tasa finita de incremento; R_0 : tasa de reproducción neta; TDP: tiempo de duplicación de la población (días); T: duración media de una generación.

resto a formas móviles. Dentro de éstas, un 15% a 22% del total de estados inmaduros corresponden a larvas, un 5% a 8% a protoninfas y un 3% a 6% a tritoninfas. La contribución global de formas juveniles al total de la población muestra una tendencia a disminuir a medida que la temperatura se acerca al límite superior de temperatura predicho (34,8°C).

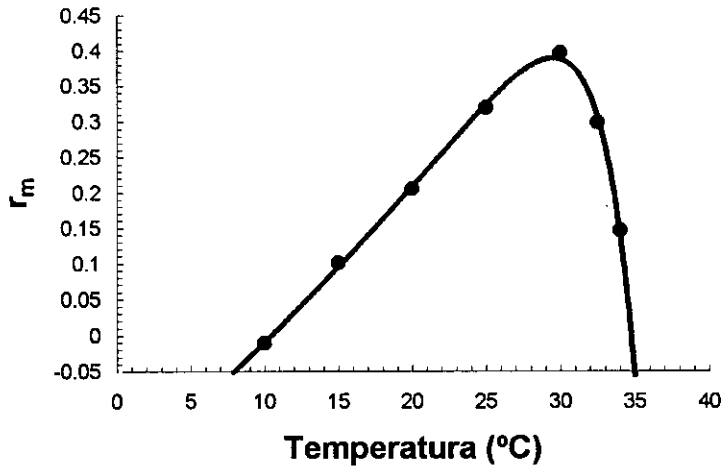


Figura 3.8. Modelo de Lactin para la tasa intrínseca de incremento natural (r_m) de *T. putrescentiae* en función de la temperatura. (●) valores de r_m observados; (-) línea de mejor ajuste por medio de regresión no lineal. $R^2 = 0,9982$. Parámetros estimados: $\rho = 0,01695$; $T_{max} = 37,4285$; $\Delta = 2,3639$; $\lambda = -1,1940$.

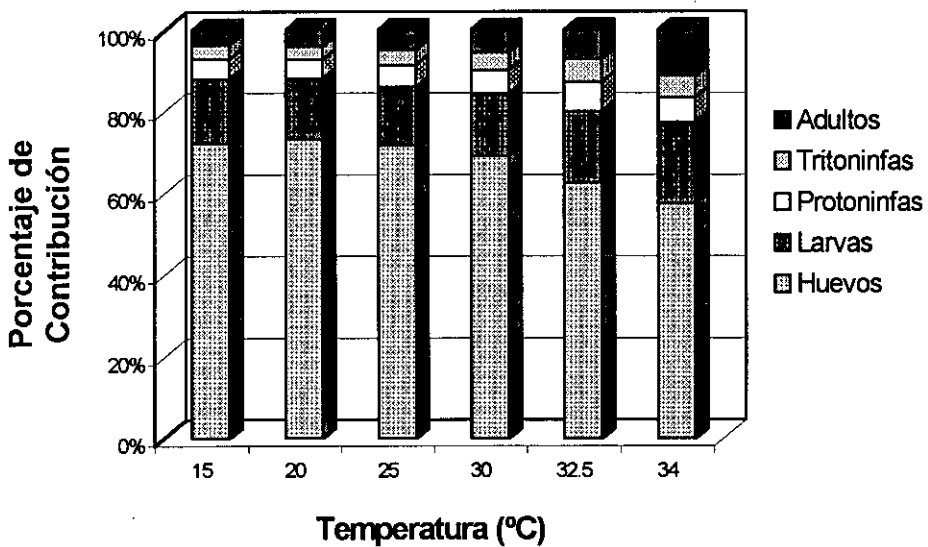


Figura 3.9. Distribución de edades estable de las poblaciones de *T. putrescentiae* a 7 temperaturas distintas.

3. 3. DISCUSIÓN

3. 3. 1. Desarrollo de los estados inmaduros

La temperatura tuvo una gran influencia tanto en la mortalidad como en el periodo de desarrollo de los estados inmaduros de *T. putrescentiae*.

El mayor porcentaje de mortalidad global de los estados inmaduros (98,5%) tuvo lugar a 10°C, concentrándose dicha mortalidad en los estados de huevo, larva y protoninfa. Dentro de éstos, el estado más susceptible fue el de larva seguido del de protoninfa. Este resultado contrasta con el obtenido por Barker (1967), el cual observó la mayor mortalidad (67%) para el estado de huevo a 11,2°C, temperatura muy similar a la inferior considerada en el presente trabajo. En *A. siro* Cunningham (1965) registró, asimismo, altos porcentajes de mortalidad a bajas temperaturas en los estados iniciales de desarrollo. Fields (1992) indica la gran variabilidad existente en cuanto a la susceptibilidad de los diversos estados de desarrollo de insectos y ácaros en relación a las bajas temperaturas. Además señala los diversos efectos que dichas condiciones producen en el desarrollo, como alteraciones en la funcionalidad de las membranas celulares, desequilibrios en reacciones bioquímicas producidos por actividades enzimáticas reducidas o modificación de la actividad iónica de moléculas. Sin embargo, los resultados aquí obtenidos no permiten explicar los mecanismos por los cuales las bajas temperaturas producen una disminución tan brusca de la supervivencia de determinados estados de desarrollo de *T. putrescentiae* sin afectar aparentemente la viabilidad de otros. Así, destaca el hecho de que las tres tritoninfas que se obtuvieron a 10°C fueron capaces de completar su desarrollo hasta el estado adulto, aunque un tamaño muestral tan pequeño implica una gran cautela a la hora de interpretar dichos resultados.

A 34°C, las larvas de *T. putrescentiae* presentaron también la mayor tasa de mortalidad, seguidas por los huevos, no registrándose prácticamente mortalidad para las protoninfas y las tritoninfas. La mortalidad global a esta temperatura fue del 63%, valor ligeramente superior al 53% encontrado por Barker (1967) a 33,9°C. La mortalidad obtenida por dicho autor a esa temperatura para el estado de huevo fue del 19%, valor muy similar al 21% registrado en el presente trabajo a 34°C. Uno de los mecanismos implicados en el incremento de mortalidad asociado a las altas temperaturas son los

procesos de desecación (Fields, 1992), lo que podría explicar la mortalidad diferencial encontrada para los diferentes estados de desarrollo de *T. putrescentiae*. Los Astigmata presentan cutículas débilmente esclerotizadas que favorecen la pérdida de fluidos corporales a través de la superficie corporal (Wharton et al., 1979; Evans, 1992). A su vez un aumento en la temperatura provoca un incremento en la permeabilidad de la cutícula debido a la ruptura de la capa de ceras (Beament, 1958). El efecto combinado daría lugar a una mayor pérdida de fluidos a medida que aumenta la temperatura, siendo este efecto mayor en aquellos estados de desarrollo de menor tamaño y por tanto con una relación superficie/volumen mayor, como es el caso de las larvas. Las altas temperaturas tendrán, por tanto, menor efecto en protoninfas y tritoninfas debido a su mayor tamaño. Por otra parte, la menor mortalidad registrada en los huevos respecto a las larvas podría deberse a que el exocorión de los huevos del género *Tyrophagus* actúa como barrera contra la desecación (Witalinski, 1993).

Dentro del rango de temperaturas intermedias, los resultados obtenidos difieren sensiblemente de los citados por otros autores sobre *T. putrescentiae*. Así, si bien Rivard (1961) no observó mortalidad para el estado de tritoninfa a 5 temperaturas constantes situadas entre 20°C y 30°C y a 90% de humedad relativa, la mortalidad global de los estados inmaduros fue muy elevada, con valores que oscilaban entre el 26% a 21,5°C y el 77,5% a 30°C. Asimismo, los porcentajes de mortalidad obtenidos por Barker (1967) en un rango de temperaturas similar fueron también elevados, oscilando entre el 43% a 24°C y el 65,5% a 20,2°C. A 32,2°C este autor registró la menor mortalidad, siendo dicho valor del 21%. En dicho rango, la mortalidad registrada en el presente estudio nunca fue superior al 4%, y ni siquiera al 16% si se incluyen las temperaturas de 15°C y 32,5°C.

En el caso del estudio de Rivard (1961), la metodología empleada pudo haber influido en los elevados porcentajes de mortalidad registrados. Dicho autor empleó como alimento cultivos de hongos del género *Aspergillus*, dieta que según Rivard (1958b) debía presentar alguna deficiencia, impidiendo la puesta de altos porcentajes de huevos viables. Además, según Cunnington (1976), el elevado crecimiento de los hongos a altas humedades relativas puede interferir en el normal desarrollo de los ácaros.

Por su parte, la metodología empleada por Barker (1967) fue la misma que la empleada en este estudio, aunque las condiciones de humedad relativa fueron del 98%-100%. Este factor puede explicar en parte las discrepancias observadas ya que Rivard

(1958b y 1961) observó, en líneas generales, un incremento de mortalidad de estados juveniles de *T. putrescentiae*, al aumentar la humedad relativa del 90% al 100%. Sin embargo, la magnitud de dicho incremento no parece justificar por sí sola las diferencias de mortalidad registradas.

El modelo no lineal seleccionado para describir la relación entre el porcentaje de mortalidad de los estados de desarrollo y la temperatura proporcionó resultados excelentes, excepto para el estado de tritoinfa. Como se mencionó en el apartado 3.2.1.1., la ausencia de valores de mortalidad elevados para dicho estado a las temperaturas de 10°C y 34°C pudo ser la causa del bajo coeficiente de determinación obtenido, al no ajustarse los datos disponibles al perfil general en forma de U de la función. Otras funciones han sido empleadas por diversos autores para describir la citada relación, como parábolas (Fornasari, 1995), polinomios de cuarto orden (Wagner, 1995) o regresiones cuadráticas (Lysyk, 1998). Los ajustes proporcionados por dichas funciones, aunque presentaron altos coeficientes de determinación, no fueron tan buenos como los mostrados por la ecuación empleada en el presente trabajo.

Respecto a la duración del periodo de desarrollo total, la temperatura óptima de desarrollo de los estados inmaduros de *T. putrescentiae*, se situó alrededor de los 30°C, valor ligeramente inferior a los 32,2°C y a los 32°C indicados por Barker (1967) y Cunningham (1969) respectivamente. Por su parte, los periodos de desarrollo registrados fueron inferiores a los obtenidos por Barker (1967) y Rivard (1961) a las distintas temperaturas consideradas. Nuevamente, las diferencias metodológicas pueden ser responsables de parte de las discrepancias encontradas. Por ejemplo, a diferencia de Barker (1967), la población de ácaros empleada en el presente trabajo fue mantenida en laboratorio durante menos de dos años y fue aclimatada antes de ser expuesta a cada temperatura, tal y como Fields (1992) recomienda, ya que estos factores juegan un papel importante en la supervivencia y desarrollo de las poblaciones de ácaros.

La mayor velocidad de desarrollo registrada en los machos respecto a las hembras concuerda con los resultados obtenidos por Rivard (1958b y 1961). Este efecto podría estar relacionado con la influencia del tamaño sobre la duración del periodo de desarrollo. Cuando los machos son más pequeños usualmente se desarrollan más rápidamente que las hembras (Hilbert, 1995), circunstancia que se produce en *T. putrescentiae*, donde el macho presenta una longitud del idiosoma de 280 a 350 μm

mientras que en la hembra dicha longitud oscila entre 320 y 415 μm (Hughes, 1976). La magnitud de la diferencia en el periodo de desarrollo entre machos y hembras fue significativamente mayor a 34°C respecto al resto de temperaturas incluidas en el análisis. Esto podría indicar un efecto diferencial de las temperaturas extremas respecto al resto de temperaturas sobre dicho factor, aunque la ausencia de machos que completaran el desarrollo a 10°C no permite confirmar esta idea.

Debido al carácter diploide de esta especie (Grondziel, 1976), la proporción sexual esperada en los experimentos de desarrollo realizados debería ser 1:1. Sin embargo, una vez determinada la ausencia de efecto de la temperatura sobre la proporción sexual obtenida y tras agrupar el número de individuos de cada sexo a lo largo de las distintas temperaturas estudiadas, se detectó un número significativamente mayor de hembras respecto al de machos. Esta situación podría estar asociada con una mayor mortalidad de los estados inmaduros para los machos respecto a las hembras. Este resultado no coincide con los obtenidos por Rivard (1961) e Ignatowicz (1986), los cuales registraron proporciones de hembras de alrededor de 52% y 54% respectivamente, valores que según estos autores no se desviaban de la proporción esperada. Llama la atención, en cualquier caso, el dato aportado por Ignatowicz (1986), obtenido como la media de la proporción de hembras producidas en la progenie de 28 parejas parentales. En dicho trabajo no queda explícitamente indicado el análisis estadístico empleado, pero se indica que el valor obtenido de 53,81% \pm 4,43 (expresado como media \pm desviación estándar) no se desvía significativamente de la proporción esperada de 1:1. El intervalo de confianza al 99% para dicho resultado es de 51,49%-56,13%. Atendiendo a la metodología del experimento, la proporción de machos debería ser de 100 menos el valor registrado para las hembras y con la misma desviación estándar, esto es 46,19% \pm 4,43. En tal caso, el intervalo de confianza al 99% para los machos sería de 43,87%-48,51%. Como se observa, ambos intervalos de confianza no solapan de forma que con un nivel de significación del 0,01 se concluiría que realmente las proporciones obtenidas por Ignatowicz (1986) para *T. putrescentiae* sí se desvían significativamente de la esperada de 1:1, tal y como sucede en el presente trabajo.

3. 3. 2. Modelización del desarrollo de los estados inmaduros

Los modelos lineales de grados-día han sido ampliamente usados a nivel práctico debido a la facilidad de estimación de sus parámetros y a que a menudo proporcionan la precisión deseada (Fan et al., 1992). Sin embargo, su aplicación se limita a la parte lineal de la relación existente entre la tasa de desarrollo y la temperatura, existiendo modelos no lineales que proporcionan mejores predicciones para el conjunto de dicha relación (Wagner et al., 1984a). Uno de los problemas asociados al modelo de grados-día es la ausencia de predicción del umbral superior de desarrollo así como la sobreestimación del umbral mínimo, aunque para la mayoría de las especies esta aproximación lineal es aceptable siempre y cuando las temperaturas a las que estén sometidas en condiciones naturales no sean extremas (Higley et al., 1986).

En el caso de *T. putrescentiae*, el modelo de grados-día proporcionó coeficientes de determinación superiores a 0,98 para todos los estados dentro del rango de temperaturas empleadas para ajustar la regresión lineal, constituyendo, por tanto, una buena predicción de la evolución de la tasa de desarrollo respecto a la temperatura. Los requerimientos termales desde huevo hasta adulto se estimaron en 149,3 GD, valor muy similar a los 150,4 GD obtenidos tras sumar los grados-día necesarios para completar el desarrollo de los estados de huevo, larva, protoninfa y tritoinfa. Esta similitud es atribuible a que los umbrales inferiores de desarrollo predichos por el modelo de grados-día fueron asimismo muy parecidos entre sí (Marco et al., 1997).

A pesar de los buenos resultados obtenidos tras la aplicación del modelo de grados-día y debido a sus limitaciones para estimar los umbrales de desarrollo, resulta necesaria la utilización de modelos más complejos que permitan la estimación precisa de estos parámetros con el fin de poder ser empleados en programas de control integrado. Como se ha comentado, los umbrales inferiores predichos por el modelo lineal de grados-día sobreestiman los umbrales verdaderos y esto es debido a que esta función no considera la parte inicial no lineal de la curva que relaciona la tasa de desarrollo con la temperatura (Wagner et al., 1984a). Entre los modernos modelos desarrollados, las ecuaciones no lineales de Logan III (Hibert y Logan, 1983), de Lactin (Lactin et al. 1995) y de Briere et al. (1999), no sólo subsanan, en teoría, este problema sino que además permiten estimar tanto los umbrales superiores como las temperaturas óptimas de desarrollo.

El comportamiento de dichos modelos tras ser aplicados al desarrollo de *T. putrescentiae* fue muy similar para la parte final de la curva que relaciona la tasa de desarrollo y la temperatura. Debido a ello, las estimaciones de los parámetros citados fueron, asimismo, muy similares entre los tres modelos a lo largo de los diferentes estados de desarrollo de este ácaro. El umbral superior se estableció alrededor de 35°C a 37°C para todos los estados, valores muy parecidos a los indicados por Cunningham (1969) para esta especie. Por su parte, el óptimo de desarrollo de los diferentes estados se estimó entre los 29°C y los 31°C, situándose alrededor de los 30°C el óptimo para completar la totalidad del periodo de desarrollo.

Sin embargo, los umbrales inferiores de desarrollo establecidos por los modelos no lineales presentaron mayor variación debido al comportamiento diferencial de las tres ecuaciones a bajas temperaturas. Las temperaturas predichas fueron mayores en todos los estados para el modelo de Briere respecto a los otros dos, y para el de Lactin respecto al de Logan III, excepto para el estado de larva, para el que ambos modelos proporcionaron el mismo valor (6,1°C). A temperaturas cercanas al límite inferior, la tasa de desarrollo se aproxima asintóticamente al punto de desarrollo cero debido a que los insectos y ácaros a menudo sobreviven durante largos periodos de tiempo a bajas temperaturas con el desarrollo ralentizado o detenido (Wagner et al., 1984a). El modelo de Logan III fue el que mejor describió esta situación, seguido del de Lactin, lo que concuerda con las diferencias existentes entre los umbrales inferiores de desarrollo predichos. Esto origina, a su vez, que los umbrales inferiores predichos por Cunningham (1969) para este ácaro (entre 7°C y 10°C) sean ligeramente superiores a los obtenidos con los modelos de Logan III y Lactin, presentando mayor similitud con los del modelo de Briere et al. (1999).

Briere y Pracros (1998) indicaron que el modelo de Lactin se comportaba de manera lineal dentro del rango de temperaturas inferiores, aludiendo a la ausencia de datos a estas temperaturas como una de las posibles causas de dicho comportamiento. Esta situación también ha sido observada por otros autores (Tsai y Liu, 1998; Lactin y Johnson, 1995) aunque el ajuste obtenido en el presente trabajo no coincide con dichas observaciones. En este caso, la existencia de datos de desarrollo correspondientes a 10°C permitió que el modelo de Lactin fuera capaz de describir perfectamente la respuesta de la tasa de desarrollo de los distintos estados de *T. putrescentiae* en relación a las bajas temperaturas. En consecuencia, y debido a la elevada mortalidad que se

suele registrar cerca de las temperaturas límites de desarrollo, tanto inferiores como superiores, resulta necesario el empleo de mayores tamaños muestrales con el fin de obtener estimaciones más precisas de los umbrales de desarrollo (Arias-Reverón y Browning, 1995). Como se observa, esta situación es más importante a bajas temperaturas debido a la mayor dificultad inherente a la determinación de la temperatura a la que el desarrollo ocurre por primera vez (Wagner et al., 1984a).

Atendiendo a los coeficientes de determinación ajustados obtenidos tras la aplicación de los modelos no lineales se observa como los modelos de Logan III y Lactin produjeron mejores ajustes que el modelo de Briere et al. (1999). Basándose en esto, los umbrales predichos por estos dos modelos parecen ser más fiables que los proporcionados por el tercero. Briere et al. (1999) desarrollaron su modelo con el fin de reducir el número de parámetros a estimar en las ecuaciones que relacionan la tasa de desarrollo con la temperatura. La aplicación de su modelo a datos de desarrollo de 7 insectos produjeron resultados satisfactorios, aunque no compararon la calidad del ajuste con la de otros modelos como los aquí empleados. Sin embargo, el hecho de poder disponer de de diversas funciones constituye una gran ventaja a la hora de intentar precedir el desarrollo de plagas de insectos y ácaros, ya que permite seleccionar aquél o aquéllos que mejor se ajusten a cada caso particular.

Para la posterior selección de los modelos obtenidos, Lamb et al. (1984) y Wagner et al. (1984a) establecieron diversos criterios, entre los que se encuentra el citado coeficiente de determinación ajustado. Sin embargo, este valor es en muchas ocasiones es muy próximo a 1 para distintos modelos, no permitiendo definir de forma concluyente cuál es la mejor ecuación (Briere y Pracros, 1998). Esta situación se produjo en los modelos de Logan III y Lactin aquí presentados. Otro criterio alude a la simplicidad del modelo, el cual debería contener el menor número de parámetros posibles (Lamb et al, 1984) (como se ha citado, la aplicación de este criterio fue lo que motivó a Briere et al. (1999) a desarrollar su modelo). En este caso, y una vez rechazado el modelo de Briere et al. (1999) por sus menores $R^2_{aj.}$, el modelo de Lactin fue el que mejor se ajustó a esta premisa, al presentar 4 parámetros a estimar en lugar de los 5 de la ecuación Logan III. Esta circunstancia es importante ya que la mayor complejidad de un modelo puede producir dificultades computacionales que imposibiliten la estimación precisa de sus parámetros, tal y como Lamb et al. (1984) indican en el último de sus criterios. Sin embargo, ninguno de los modelos de *T. putrescentiae* obtenidos presentó este problema.

En definitiva, y atendiendo a los diferentes criterios indicados, tanto el modelo de Lactin como el de Logan III presentaron excelentes propiedades para ser empleados como modelos que relacionan la tasa de desarrollo de *T. putrescentiae* respecto a la temperatura.

Finalmente, la escasa variación térmica de los ambientes donde *T. putrescentiae* se desarrolla ha favorecido, probablemente, que los umbrales térmicos de los diferentes estados de desarrollo sean muy similares. Esta situación es diferente a lo que sucede en especies que presentan una única generación al año bajo condiciones de campo. Para estas especies, los diferentes estados de desarrollo se han adaptado a las condiciones existentes en las diferentes estaciones en las que viven, mostrando por ello una mayor variabilidad en los umbrales de desarrollo de cada estado inmaduro, tal y como se ha citado en el caso de un curculiónido de la remolacha azucarera (Marco et al., 1997).

3. 3. 3. Reproducción y desarrollo de los adultos

Los distintos parámetros reproductores analizados presentaron una gran variación a lo largo del rango de temperaturas seleccionadas, demostrando la gran influencia de este factor en la reproducción de *T. putrescentiae*. Por su parte, los altos coeficientes de determinación obtenidos para los modelos polinomiales ($> 0,89$) indican la gran capacidad predictiva de los mismos para la relación existente entre dichos parámetros y la temperatura. Estos modelos han sido utilizados por numerosos autores para describir el efecto de la temperatura en todo tipo de parámetros de insectos y ácaros (Parajulee et al., 1995; Wagner, 1995; Lysyk, 1998; Tsai y Wang, 1999)

Por encima de los 22°C, los nuevos adultos emergidos inician su proceso reproductor a partir del segundo día desde la muda de las tritoninfas quiescentes, lo que resulta indicativo de la gran capacidad de incremento de las poblaciones de este ácaro. Los datos acerca de los periodos de preoviposición en otros ácaros astigmátidos no son muy abundantes. Arlian et al. (1990) obtuvieron periodos de preoviposición de menos de 3 días para *D. pteronyssinus* a 23°C, valor que disminuía a menos de 2 días a 35°C. Por su parte, Cunnington (1985) observó el inicio de la oviposición en *A. siro* dentro de las primeras 24 horas de vida adulta en el rango de temperaturas entre 20°C y 25°C y en condiciones favorables de humedad relativa (80%-90%); el menor intervalo entre emergencia y primera puesta fue de, aproximadamente, 6 horas a 25°C y 90% HR. Para

T. putrescentiae, el modelo polinomial predice en 29°C el menor periodo de preoviposición, siendo éste de menos de 28 horas.

La duración del periodo de oviposición fue inversamente proporcional al incremento de la temperatura, situación similar a la obtenida por otros autores en diversas especies de ácaros astigmátidos (Barker, 1967; Cunnington, 1985; Arlian et al., 1990). Los valores predichos por el modelo lineal a las temperaturas estudiadas por Barker (1967) se ajustaron razonablemente a los encontrados por este autor. Por otra parte, el porcentaje de parejas fértiles sólo se vio significativamente reducido a la temperatura extrema inferior seleccionada. Dicho porcentaje fue mayor del 94% a 34°C, temperatura ésta muy cercana al umbral superior de desarrollo estimado previamente.

El modelo de regresión cuadrática aplicado al número total de huevos puestos por hembra estimó en 22,1°C la temperatura de máxima fecundidad, con 554 huevos. A esta temperatura Barker (1967) sólo registró 327,3 huevos, partiendo de un tamaño muestral de tan solo 8 parejas. Este autor observó la mayor producción (383,6 huevos) a 30°C. Por otra parte, la máxima tasa de producción de huevos (nº de huevos por hembra y por día de oviposición) fue estimada a 26,1°C, con casi 23 huevos por hembra y día. Cunnington (1985) observó un resultado similar en *A. siro* sugiriendo que, aunque los procesos fisiológicos implicados en la oviposición se desarrollan mejor a determinadas temperaturas (en el caso de *T. putrescentiae* cercanas a los 22°C), las condiciones más favorables para el incremento de las poblaciones de los ácaros son a su vez más dependientes de las mejores condiciones para la tasa de oviposición (26°C para *T. putrescentiae*). Esto no implica que otros factores como la longitud del periodo de desarrollo total o la supervivencia pre-reproductora no intervengan también en dicha capacidad de incremento, como se puede apreciar en el apartado 3. 3. 4.

La temperatura también afecto en gran medida los patrones de fecundidad diaria media de *T. putrescentiae*. Dichos patrones fueron similares a los mostrados por otros ácaros astigmátidos tales como *A. siro* (Cunnington, 1985), *D. pteronyssinus* (Arlian et al., 1990), *Rhizoglyphus robini* Claparède, 1869 (Fashing y Hefele, 1991) o *D. farinae* (Arlian y Dippold, 1996). Bajo condiciones favorables, la producción media diaria de huevos se incrementa rápidamente desde un valor inicialmente reducido hasta un máximo alcanzado en un estado temprano del periodo de oviposición de la población. Esta alta tasa de producción se mantiene sólo durante un pequeño intervalo de tiempo en relación

a la extensión total del periodo de puesta. Una vez se alcanza ese valor, la producción de huevos disminuye más o menos rápidamente, dependiendo de las condiciones, hasta que la oviposición cesa. Bajo condiciones menos favorables, tales como bajas temperaturas, la cantidad diaria de huevos producida se reduce considerablemente y la oviposición continúa a una tasa menor y más constante a lo largo del periodo de puesta. Las tasas de oviposición máximas encontradas para *T. putrescentiae* fueron similares a las encontradas por Cunningham (1985) en *A. siro*, situándose entre los 25 y 30 huevos por día dentro de sus respectivos rangos favorables de temperatura. Dichos rangos son sensiblemente inferiores para *A. siro* (20°C - 25°C) respecto a *T. putrescentiae* (25°C - 30°C).

Por otra parte, los altos coeficientes de determinación obtenidos por la función Maxima (Richter y Söndgerath, 1990) y por la función Weibull acumulada (Jandel Scientific, 1994) para la fecundidad diaria media y para la fecundidad acumulada media, respectivamente, indican la gran capacidad predictiva de estas ecuaciones. La aplicación de funciones para predecir la evolución de estos parámetros en diferentes especies de ácaros e insectos ha sido realizada por diversos autores (McClymont Peace, 1983; Smith, 1986; Carpenter, 1995; Nowierski et al., 1995; Tsai y Wang, 1999). En el caso de *T. putrescentiae*, la escasa duración de los periodos de desarrollo hacen que las generaciones solapen dentro de una población, manteniéndose una tasa constante de producción de huevos a menos que las altas densidades aumenten la competencia intraespecífica (Santos, 1989). Sin embargo, en especies en las que las generaciones no se solapan, la aplicación del modelo Maxima puede predecir el momento medio de máxima producción de descendientes por parte de la población, con el consiguiente interés desde el punto de vista práctico. Por su parte, el modelo Weibull acumulado aplicado a *T. putrescentiae* mostró cómo hacia la mitad del periodo de oviposición de la población se justificaba entre el 90% y el 95% de la producción de descendencia a las diferentes temperaturas consideradas.

El efecto de la temperatura sobre la longevidad de machos y hembras de *T. putrescentiae* fue similar al registrado por Cunningham (1985) en *A. siro* bajo las mismas condiciones de humedad relativa. En ambos casos la longevidad de los machos fue superior a la de las hembras, incrementándose la diferencia desde las temperaturas extremas hasta las intermedias. Otros autores también han indicado una mayor esperanza de vida en machos respecto a las hembras de diferentes especies de ácaros

astigmátidos con gran potencial reproductor tales como *T. putrescentiae* (Rivard, 1959), *R. robini* (Fashing y Hefele, 1991) o *A. siro* (Parkinson et al, 1991a). Las hembras sufren un gran desgaste debido a la continua producción de huevos, lo que podría explicar este fenómeno. Parkinson et al. (1991a), estudiando el efecto de la alimentación de *A. siro* sobre diferentes hongos en la fecundidad y longevidad de este ácaro, indicaron que el coste reproductor asociado a la mayor producción de huevos en la dieta control (germen de trigo y levadura de cerveza) podría causar en las hembras una mortalidad más temprana respecto a la dieta fúngica. A su vez, la muerte de las hembras permitiría a los machos vivir más debido a la reducción del coste metabólico asociado a la gametogénesis (Parkinson, 1991a). Otras observaciones también apoyan estas ideas. Boczek (1974) observó un incremento en la longevidad de hembras no emparejadas de *T. putrescentiae* respecto a hembras emparejadas y Arlian et al. (1990) observaron un resultado similar en *D. pteronyssinus*, para el que las hembras no emparejadas vivieron alrededor de un 50% más. Por su parte, Cunnington (1985) comprobó que hembras de *A. siro* aisladas tras la primera cópula duplicaban prácticamente su longevidad respecto a hembras que permanecían toda su vida junto a un macho. Asimismo, el hecho de que a temperaturas cercanas al límite de desarrollo de los ácaros los procesos reproductores se vean afectados implica a su vez un menor desgaste para las hembras respecto a las temperaturas favorables, lo que podría ser la causa de la mayor similitud en la longevidad de los dos sexos a temperaturas extremas. En ácaros con un menor potencial reproductor como *D. pteronyssinus*, cuya tasa de producción de huevos es de tan sólo 2,5 y 3,3 huevos por hembra y día a 23°C y 35°C respectivamente (Arlian et al., 1990), se ha observado una longevidad mayor en las hembras respecto a los machos (Dobson, 1979).

La función Weibull ha sido considerada como un modelo adecuado para describir los patrones de supervivencia de las poblaciones animales respecto al tiempo (Pinder III et al., 1978), habiendo sido aplicada sobre insectos por diferentes autores con resultados satisfactorios (Smith, 1986; Nowierski et al., 1995; Krafur et al., 1995). Esta función presenta cuatro tipos básicos de curva (Slobodkin, 1962; Southwood, 1976); en el tipo I la mortalidad se concentra mayoritariamente en los animales de mayor edad; en el tipo II se produce un número constante de muertes por unidad de tiempo; en el tipo III la tasa de mortalidad es constante respecto al tiempo; y en el tipo IV la mortalidad se concentra principalmente en los estados juveniles. Las poblaciones naturales no se rigen en general por ninguno de esos patrones ideales sino que muestran curvas de supervivencia que

son mezclas de las diferentes curvas ideales posibles (Slobodkin, 1962). En la función Weibull, el parámetro β determina la forma de la curva, de forma que valores altos de este parámetro originan funciones de tipo I y valores bajos funciones de tipo IV (Pinder III et al., 1978).

En el caso de *T. putrescentiae*, el patrón de mortalidad obtenido en el estado adulto no sólo fue diferente entre las distintas temperaturas consideradas, sino que también lo fue para cada sexo dentro de cada temperatura. Entre los 15°C y los 34°C el parámetro que describe la forma de la función (β) fue mayor para los machos que para las hembras. Atendiendo a los patrones ideales de las curvas de supervivencia y a su correspondencia con el citado parámetro de la función Weibull, esta situación implica que la tasa de mortalidad en el caso de los machos se incrementa a medida que éstos envejecen, presentando un curva cercana al tipo I. Por su parte, la forma de la curva en el caso de las hembras se asemeja más al tipo III, de forma que la tasa de mortalidad se mantendría más o menos constante a lo largo del tiempo. El mismo factor indicado como posible causante de las diferencias de longevidad registradas entre machos y hembras puede ser responsable de esta situación, esto es el mayor desgaste reproductor en el caso de las hembras. La situación obtenida a 10°C fue contraria al resto de temperaturas, lo que puede deberse al prolongado periodo de preoviposición (más de 35 días) registrado a esta temperatura, que retardó el inicio de la actividad reproductora de las hembras, así como a la escasa producción de huevos (0,7 huevos por día) por parte de las mismas.

3. 3. 4. Desarrollo de las poblaciones de *T. putrescentiae*

La tasa intrínseca de incremento natural (r_m) constituye un gran indicador de la capacidad potencial de incremento de las poblaciones animales en ambientes ilimitados, en ausencia de competencia interespecífica e intraespecífica y una vez alcanzada una distribución de edades estable en la población (Andrewartha y Birch, 1954). Por ello, el uso de este parámetro para estimar el efecto de diferentes factores ambientales sobre el desarrollo de las poblaciones animales resulta de enorme utilidad.

Los resultados obtenidos para *T. putrescentiae* fueron sensiblemente diferentes de los citados por otros autores. Barker (1967) encontró la máxima tasa intrínseca de crecimiento para este ácaro a 32,2°C, con un valor de 0,32782. En el presente trabajo, el

óptimo fue establecido a 30°C, con un valor de 0,39695, mientras que a esa temperatura, Barker (1967) obtuvo un valor de 0,2654. Las condiciones experimentales en los dos casos fueron similares, por lo que las diferencias encontradas son atribuibles principalmente a la mayor mortalidad registrada por Barker (1967) para los estados juveniles y en menor grado a la menor capacidad reproductora citada por este autor.

Por su parte, Rivard (1959) estableció un valor para r_m de 0,2077 en condiciones de 25°C y 90% HR, valor muy inferior al aquí obtenido bajo las mismas condiciones (0,3189). En este caso las discrepancias son atribuibles a las diferencias metodológicas empleadas, ya que este autor empleó cultivos de hongos del género *Aspergillus* como alimento, lo que podría influir en la capacidad multiplicativa de la población. Como se indicó previamente, Rivard (1958b) señaló que la dieta empleada en sus ensayos debía presentar alguna deficiencia que impedía la puesta de altos porcentajes de huevos viables. En la misma línea, Parkinson et al. (1991a y 1991b) observaron una gran reducción de la fecundidad de *A. siro* en poblaciones alimentadas con hongos frente a poblaciones controles alimentadas con levadura de cerveza y germen de trigo.

Una situación similar explicaría los resultados obtenidos por Czajkowska y Kropczynska (1991), los cuales estudiaron el potencial reproductor de *T. putrescentiae* al actuar como plaga de diferentes plantas ornamentales bajo condiciones de 25°C y 85% HR. Estos autores registraron la mayor tasa intrínseca de incremento sobre bulbos de *Crocus* (Iridaceae), con un valor de 0,20586. La menor humedad relativa empleada también podría explicar parte de las diferencias encontradas (ver capítulo siguiente).

Finalmente, Cunnington (1976) indicó que *T. putrescentiae* es capaz de incrementar su población 10 veces por semana a 25°C y 90 HR, cifra muy similar a la correspondiente a la r_m calculada en el presente trabajo bajo las mismas condiciones, aunque concluía que esa temperatura era la óptima para el desarrollo de *T. putrescentiae*.

La condición de plaga de *T. putrescentiae* queda de manifiesto al observar los resultados obtenidos. A pesar de haberse obtenido a 20°C la mayor tasa de multiplicación por generación ($R_0 = 266,31652$), la máxima r_m fue registrada a 30°C, ya que, aunque su R_0 fue igual a 150,96493, la duración media de una generación se redujo más de la mitad. Esta temperatura es similar a la óptima predicha por el modelo de Lactin (Lactin et

al., 1995), esto es, 29,5°C, y bajo esas condiciones una población de este ácaro es capaz de duplicarse en menos de dos días, y sólo en poco más de 48 horas en el rango entre 25°C y 32°C. Sin embargo, hay que tener siempre en cuenta que los valores de r_m obtenidos para *T. putrescentiae* proporcionan cifras potenciales de incremento de sus poblaciones. Los procesos de competencia intraespecífica aumentan la tasa de mortalidad de los individuos y disminuyen su capacidad reproductora (Santos, 1989), disminuyendo a su vez la tasa intrínseca de incremento. Por otra parte, los resultados obtenidos a 10°C, donde la r_m fue negativa, se debieron a la gran duración del periodo de desarrollo, a la alta mortalidad de los estados inmaduros y a la reducida fecundidad registrada a esta temperatura. El gran ajuste proporcionado por el modelo de Lactin (Lactin et al., 1995) permitió establecer con precisión los umbrales térmicos de desarrollo de las poblaciones de *T. putrescentiae*. Estos umbrales fueron ligeramente diferentes de los establecidos para el desarrollo individual debido a que la tasa intrínseca de incremento no sólo considera la capacidad de desarrollo de los estados inmaduros, sino la mortalidad de los estados inmaduros y de los adultos y la capacidad reproductora de éstos. Los umbrales obtenidos son de enorme interés para el control de las poblaciones de este ácaro sobre productos almacenados ya que una de las estrategias de control de este tipo de plagas generalmente empleada es la modificación de la temperatura (Fields, 1992).

Por último indicar que la estructura poblacional obtenida a las diferentes temperaturas consideradas fue ligeramente distinta a la indicada por Barker (1967). Este autor estimó un porcentaje de adultos del 11%-13%, con un 33%-34% de formas juveniles móviles y un 53%-56% de huevos. Los resultados aquí presentados mostraron un mayor número de huevos en detrimento de larvas, ninfas y adultos en relación a los datos aportados por el citado autor. Los mayores periodos de desarrollo de los estados inmaduros (especialmente en los estados móviles) y la menor capacidad reproductora registrada por Barker (1967) para *T. putrescentiae* fueron responsables de las diferencias existentes entre ambos trabajos. En cualquier caso es de destacar el alto porcentaje de huevos existentes en las poblaciones de este ácaro lo que sugiere la necesidad de desarrollar técnicas de muestreo y control que tengan en consideración la dominancia de las formas inmóviles de esta especie (Barker, 1967).

INFLUENCIA DE LA HUMEDAD RELATIVA EN LA BIOLOGÍA DE *T. putrescentiae*

4. 1. INTRODUCCIÓN

La influencia de la humedad relativa en la ecología de los invertebrados terrestres ha sido generalmente considerada de importancia secundaria en comparación con otros factores ambientales (Tauber et al., 1998). Dichos autores apuntan, no obstante, que la humedad relativa constituye realmente un factor determinante en la biología de insectos y ácaros, pudiendo influir en el desarrollo y la actividad, acelerando o retardando la tasa de desarrollo, de maduración o de oviposición, y determinando aspectos del comportamiento de estos organismos.

En el caso de los ácaros astigmátidos, dicho factor ha recibido la necesaria atención por parte de los investigadores, existiendo numerosas publicaciones acerca de su efecto y de sus implicaciones fisiológicas (Rivard, 1961; Wharton y Arlian, 1972; Cutcher, 1973; Arlian y Wharton, 1974; Wharton y Furumizo, 1977; Wharton et al., 1979; Arlian, 1992). Esto es debido, como se anticipó en la introducción general de la presente tesis, a las particulares características de la cutícula de estos ácaros, que resulta

inusualmente permeable al flujo de fluidos al exterior (Wharton y Furumizo, 1977; Evans, 1992). La capacidad de estos organismos de absorber vapor de agua del ambiente para contrarrestar estas pérdidas (Wharton y Furumizo, 1977; Wharton et al., 1979) sólo se produce por encima de un determinado valor de humedad relativa, característico de cada especie.

En el caso de *T. putrescentiae*, diferentes estudios han tratado de establecer la influencia de la humedad relativa sobre su biología, intentando determinar ese valor mínimo por debajo del cuál el desarrollo no se produce (Cutcher, 1973; Rivard, 1958b, 1959 y 1961). Las diversas metodologías empleadas han dado lugar a resultados contradictorios, enmascarándose en ocasiones el efecto real de la humedad relativa ambiental por otros factores no considerados.

Por consiguiente, los objetivos abordados en el presente capítulo tienen por objeto:

1. Establecer el efecto de 3 humedades relativas ambientales en la supervivencia, desarrollo y reproducción de *T. putrescentiae*.
2. Establecer modelos predictivos para los patrones de fecundidad y supervivencia de *T. putrescentiae*, en relación a dicho factor.
3. Obtener las tablas de vida de *T. putrescentiae*, y determinar la capacidad de incremento de las poblaciones de este ácaro en función de la humedad relativa.

4. 2. RESULTADOS

4. 2. 1. Efecto sobre el desarrollo de los estados inmaduros

4. 2. 1. 1. Mortalidad

La Figura 4. 1. muestra los porcentajes de mortalidad obtenidos a las 3 humedades relativas consideradas para los estados de huevo y larva y para el periodo de desarrollo total. En los tres casos el efecto de la humedad resultó ser altamente significativo ($P < 0,0001$), debido a la elevada mortalidad registrada a 70%. Los porcentajes obtenidos a 80% y 90% de humedad relativa no fueron significativamente diferentes entre sí, y sí lo fueron respecto a 70% ($P < 0,0001$). A esta humedad el desarrollo se detuvo en el estado de larva, donde el 100% de los individuos fueron incapaces de alcanzar el estado siguiente. La mortalidad registrada para los estados de protoninfa y tritoinfa fue prácticamente nula a 80% y 90%.

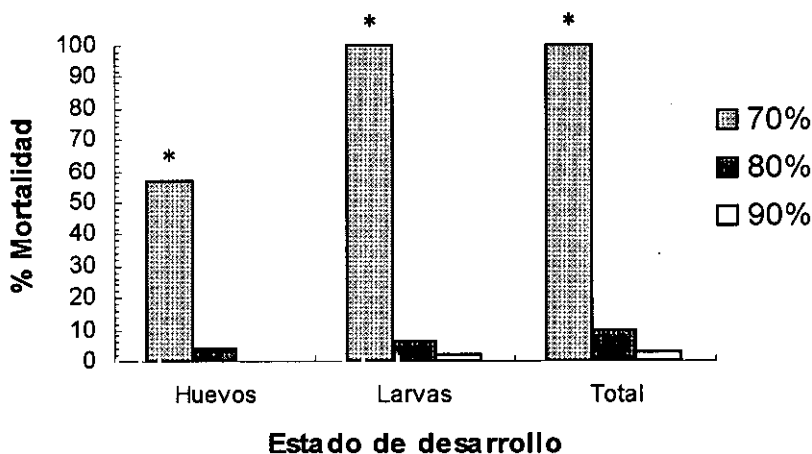


Figura 4. 1. Porcentajes de mortalidad obtenidos a tres humedades relativas para los estados de huevo y larva y para el periodo de desarrollo total; (* indica diferencias significativas; $P < 0,0001$; prueba de la χ^2).

4. 2. 1. 2. Duración del desarrollo

El periodo de desarrollo de los estados inmaduros de *T. putrescentiae* a las 3 humedades relativas estudiadas se resume en la Tabla 4. 1. La duración del estado de huevo fue significativamente distinta en los 3 casos. Asimismo el efecto de la humedad

también resultó significativo para los estados de larva, protoninfa y tritoninfa y para el periodo de desarrollo total. La extensión de la duración del desarrollo desde huevo hasta adulto al pasar de 90% a 80% de humedad se debe principalmente al efecto sobre las formas móviles, ya que el tiempo necesario para completar dichos estados prácticamente se duplica, mientras que el estado de huevo sólo se ve ligeramente afectado. Esto implica que el porcentaje de contribución del estado de huevo pase del 40,4% a 90% de humedad a sólo un 27,5% a 80%, aumentando el del resto de los estados. Este incremento es más notable en el estado de larva (de 23,4% a 30,9%).

Tabla 4.1. Duración media del desarrollo (días \pm ES) de los estados inmaduros de *T. putrescentiae* a tres humedades relativas

Estados	Humedad relativa (%)		
	70	80	90
Huevo	5,1 \pm 0,1 a (43)	4,1 \pm 0,1 b (96)	3,8 \pm 0,1 c (100)
Larva	– ⁽¹⁾	4,6 \pm 0,1 a (90)	2,2 \pm 0,1 b (98)
Protoninfa	–	3,0 \pm 0,1 a (90)	1,5 \pm 0,1 b (98)
Tritoninfa	–	3,2 \pm 0,1 a (90)	1,9 \pm 0,1 b (97)
Huevo - Adulto	–	14,9 \pm 0,1 a (90)	9,4 \pm 0,1 b (97)
Machos ⁽²⁾	–	14,6 \pm 0,2 a (37)	9,2 \pm 0,1 b (44)
Hembras ⁽²⁾	–	15,1 \pm 0,2 a (53)	9,5 \pm 0,1 b (53)

⁽¹⁾ Ningún individuo completó el estado de larva.

⁽²⁾ Machos y Hembras son los considerados conjuntamente en la columna Huevo – Adulto.

Los valores seguidos por letras distintas dentro de una misma fila presentan diferencias significativas ($P < 0,05$; ANOVA de una vía seguida de prueba de Newman-Keuls en el caso del estado de huevo y prueba de la t de Student para el resto).

Debajo de cada valor, entre paréntesis, se indica el tamaño muestral.

La humedad relativa y el sexo también influyeron significativamente en la duración del periodo de desarrollo total ($F = 1063,4$; $P < 0,0001$ y $F = 5,4$; $P < 0,05$

respectivamente), siendo esta duración mayor para las hembras en relación a los machos, aunque no se produjo efecto de interacción entre ambas variables ($F = 1,0$; $P > 0,3$). La proporción sexual obtenida fue de un 58,9% de hembras a 80% HR y de un 54,6% a 90% HR, no existiendo influencia de la humedad relativa en dicho factor ($\chi^2 = 0,19$; $P > 0,6$). Asimismo, tras agrupar el número de machos y hembras obtenidos a 80% y 90% de humedad relativa tampoco se detectaron diferencias entre el número de individuos producidos de ambos sexos ($\chi^2 = 3,08$; $P > 0,05$).

4. 2. 2. Efecto sobre la reproducción y el desarrollo de los adultos

4. 2. 2. 1. Parámetros reproductores y longevidad

La Tabla 4.2. muestra los resultados obtenidos para las 3 humedades consideradas. Ninguna de las parejas establecidas a 70% de humedad relativa fue capaz de poner huevos. Los valores obtenidos para los parámetros reproductores fueron significativamente distintos a las dos humedades restantes, excepto para el porcentaje de fertilidad. El efecto de la humedad relativa fue enormemente acentuado. Una disminución de un 10% en el porcentaje de saturación del aire supuso, en líneas generales, duplicar el periodo de oviposición, reducir a la mitad el número total de huevos puestos por cada hembra, y dividir por 4 el número de huevos puestos por hembra y día. Estos datos indican la enorme dependencia de *T. putrescentiae* de valores altos de humedad relativa ambiental. La longevidad también se vio significativamente afectada por el efecto de la humedad relativa, tanto en machos como en hembras. La longevidad de los machos resultó ser significativamente mayor a la de las hembras a 90% ($t = 7,75$; $P < 0,0001$), mientras que a 70% la situación fue inversa ($t = 2,27$; $P < 0,05$). A 80% no se encontraron diferencias significativas en la longevidad de ambos sexos ($t = 0,08$; $P > 0,9$). Las mayores diferencias se observaron a 90% de humedad, donde los machos vivieron más del doble que las hembras. Otro aspecto llamativo es el patrón diferencial obtenido en machos y hembras a las dos humedades más altas. Mientras en machos un aumento en las condiciones de humedad relativa produjo a su vez un aumento en la longevidad, la situación en las hembras fue la inversa, disminuyendo su esperanza de vida a medida que se incrementó este factor. Por otra parte destaca la escasa longevidad registrada a 70%, donde la media no superó los 4 días y tan sólo un individuo fue capaz de sobrevivir durante al menos una semana.

Tabla 4. 2. Parámetros reproductores y longevidad (media \pm ES) de *T. putrescentiae* a tres humedades relativas

Parámetros	Humedad relativa (%)		
	70	80	90
Porcentaje de Fertilidad	–	95,7% a	92,3% a
Periodo de Preoviposición	–	2,1 \pm 0,1 a (67)	1,5 \pm 0,1 b (65)
Periodo de Oviposición	–	44,3 \pm 2,3 a (67)	21,0 \pm 1,2 b (64)
Fecundidad	–	259,5 \pm 14,5 a (67)	488,3 \pm 28,5 b (64)
Tasa de Producción de Huevos	–	5,7 \pm 0,2 a (67)	24,2 \pm 1,0 b (64)
Longevidad de Machos	2,8 \pm 0,2 a (70)	53,3 \pm 2,0 b (67)	79,7 \pm 4,2 c (64)
Longevidad de Hembras	3,3 \pm 0,1 a (70)	53,0 \pm 1,6 b (67)	37,3 \pm 3,6 c (64)

Los valores seguidos por letras distintas dentro de una misma fila presentan diferencias significativas ($P < 0,05$; prueba de la χ^2 en el caso del porcentaje de fertilidad; ANOVA de una vía seguida de prueba de Newman-Keuls en el caso de la longevidad y prueba de la t de Student para el resto). Debajo de cada valor, entre paréntesis, se indica el tamaño muestral.

4. 2. 2. 2. Curvas de fecundidad

La Figura 4. 2. muestra la evolución de la fecundidad diaria media por hembra de las poblaciones de *T. putrescentiae* en condiciones de 80% y 90% así como el ajuste de la función Maxima y sus parámetros correspondientes. Los coeficientes de determinación fueron 0,9349 y 0,9782 respectivamente. La función Maxima predijo a los 12 y 6 días los momentos de mayor fecundidad para 80% y 90% respectivamente. Las curvas de fecundidad acumulada media por hembras se representan en la Figura 4. 3. El ajuste de la función Weibull acumulada fue excelente con coeficientes de determinación de 0,9999 en ambos casos. Los parámetros estimados fueron: a = -109,1498; b = 369, 8475; c = 12,2909; d = 58,2448; e = 2,8591, para 80% y a = 0,2026; b = 487,6938; c = 9,1102; d = 10,8629; e = 1,4513, para 90%.

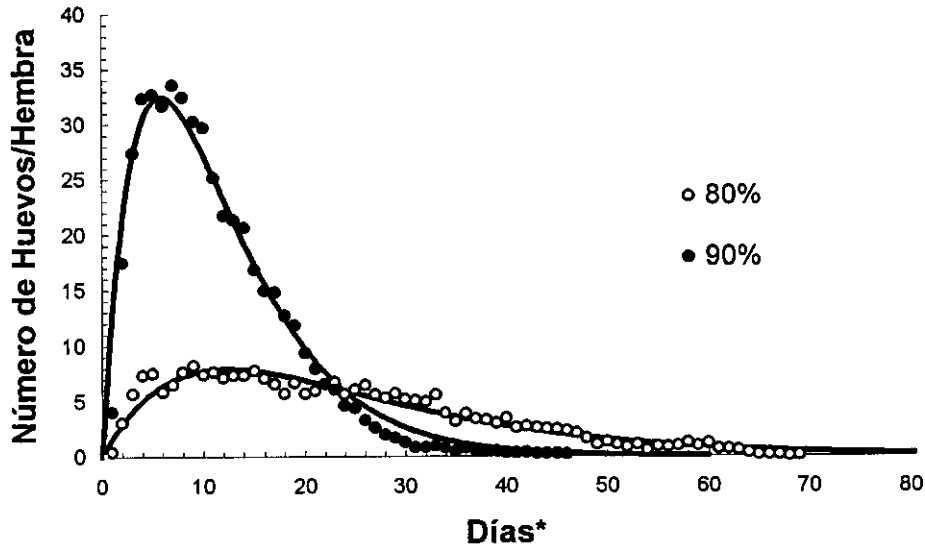


Figura 4.2. Fecundidad diaria media y funciones Maxima ajustadas para las poblaciones de *T. putrescentiae* a dos humedades relativas; (* días desde el inicio de la oviposición). Parámetros estimados: $\alpha = 1,7342$; $\tau = 0,0807$, para 80% y $\alpha = 15,1207$; $\tau = 0,1716$, para 90%.

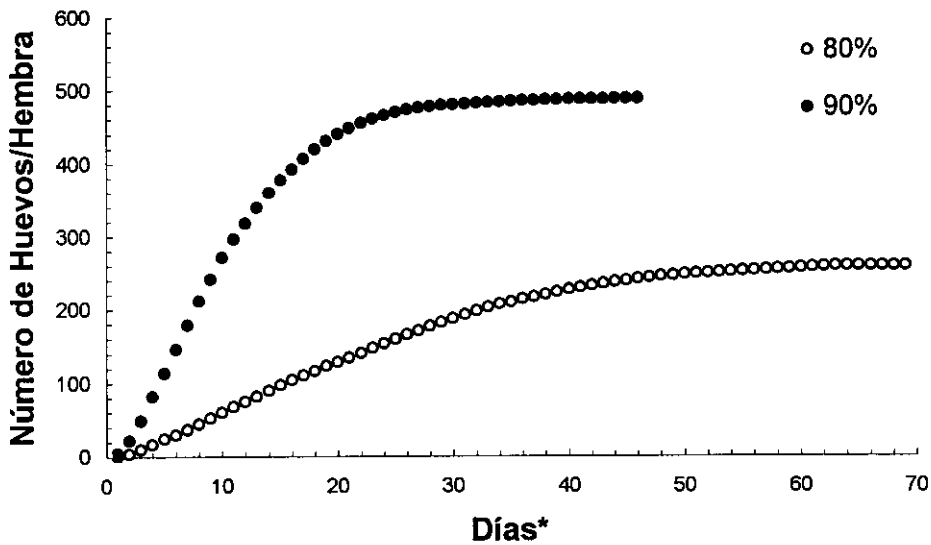


Figura 4.3. Fecundidad acumulada media para las poblaciones de *T. putrescentiae* a dos humedades relativas; (* días desde el inicio de la oviposición).

4. 2. 2. 3. Curvas de supervivencia

La función Weibull proporcionó un buen ajuste a los datos de supervivencia obtenidos a las 3 humedades consideradas tanto para los machos como para las hembras, con coeficientes de determinación superiores a 0,96 en todos los casos (Tablas 4. 3 y 4. 4; Figura 4. 4.). El patrón de mortalidad determinado a través de la comparación del parámetro β fue similar para machos y hembras a 70%. Para las otras dos humedades se observaron patrones diferentes, siendo dicho parámetro mayor para las hembras respecto a los machos a 80%, dándose la situación inversa a 90%. Por su parte el parámetro b fue significativamente mayor para los machos a 80% y 90% y para las hembras a 70%. La comparación de los parámetros se realizó atendiendo al solapamiento de sus intervalos de confianza al 95%.

Tabla 4. 3. Parámetros estimados según el modelo Weibull para la evolución de la supervivencia de los machos de *T. putrescentiae* a tres humedades relativas

Humedad Relativa (%)	$b \pm ES$	$\beta \pm ES$	R^2
70	$3,5997 \pm 0,0710$	$2,9095 \pm 0,2282$	0,9949
80	$60,5818 \pm 0,2855$	$3,6170 \pm 0,0844$	0,9908
90	$92,0319 \pm 0,3905$	$2,8845 \pm 0,0486$	0,9914

Tabla 4. 4. Parámetros estimados según el modelo Weibull para la evolución de la supervivencia de las hembras de *T. putrescentiae* a tres humedades relativas

Humedad Relativa (%)	$b \pm ES$	$\beta \pm ES$	R^2
70	$4,1765 \pm 0,0739$	$3,5851 \pm 0,3045$	0,9950
80	$58,8011 \pm 0,2297$	$4,3797 \pm 0,0988$	0,9934
90	$39,3786 \pm 0,6373$	$1,3400 \pm 0,0434$	0,9669

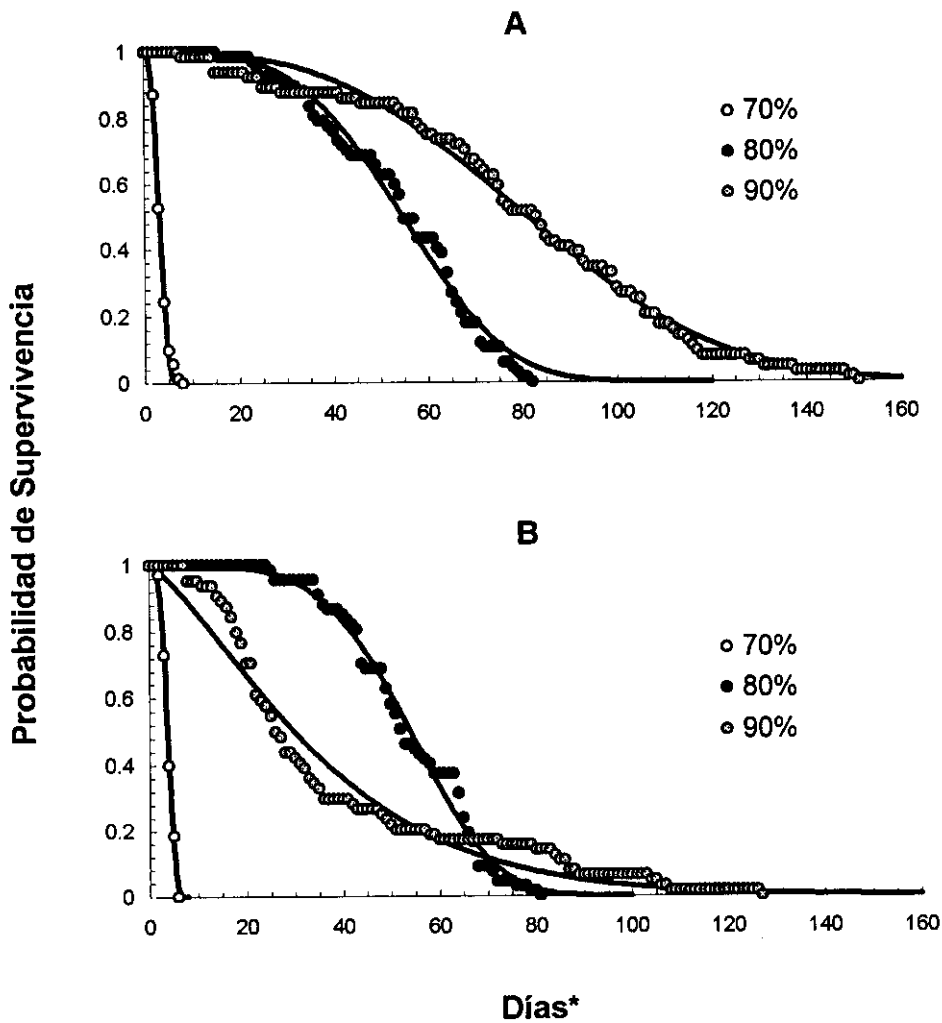


Figura 4. 4. Probabilidad de supervivencia en relación al tiempo para machos (A) y hembras (B) de *T. putrescentiae* y función Weibull ajustada a tres humedades relativas; (* días desde la emergencia).

4. 2. 3. Tablas de vida de *T. putrescentiae* en relación a la humedad relativa

Los resultados obtenidos tras aplicar el programa r_m 2.0 (Taberner et al., 1993) a las matrices de nacimientos de *T. putrescentiae* para las condiciones de 80% y 90% de humedad relativa se muestran en la Tabla 4. 5. La tasa intrínseca de incremento natural a 90% fue prácticamente el doble respecto a 80%, lo que hace que a su vez se duplique el número de veces que una población es capaz de multiplicarse por generación (R_0). Esto implica, por tanto, una reducción a la mitad del tiempo de duplicación de la población a 90% respecto a la otra humedad considerada.

La contribución de individuos inmaduros al total de la población fue muy similar para ambas humedades, con un 92% a 80% de humedad relativa y un 95% a 90% de humedad. Sin embargo, dentro de los estados inmaduros, un 75,2% correspondieron a huevos en el caso de la humedad más alta y únicamente un 56,1% en el caso de la inferior, lo que muestra la menor capacidad multiplicativa de este ácaro en dichas condiciones. La contribución de larvas, protoninfas y tritoninfas fue del 15,0%, 5,7% y 4,1% para 90% y del 28,1%, 9,7% y 6,2% para 80%.

Tabla 4. 5. Parámetros de la tabla de vida de *T. putrescentiae* a 3 humedades relativas

Parámetros	Humedad relativa (%)		
	70	80	90
Supervivencia Pre-reproductora (%)	0%	90	97
$r_m \pm ES^*$	–	$0,1645 \pm 0,0020$ a	$0,3189 \pm 0,0038$ b
IC 95%	–	(0,1605 – 0,1685)	(0,3113 – 0,3265)
λ	–	1,1788	1,3756
R_0	–	111,7607	219,6839
TDP	–	4,21	2,17
T	–	28,6709	16.9087

Supervivencia pre-reproductora: porcentaje de individuos que alcanzan el estado adulto; r_m : tasa intrínseca de incremento natural; 95% IC: intervalo de confianza al 95% para r_m ; λ : tasa finita de incremento; R_0 : tasa de reproducción neta; TDP: tiempo de duplicación de la población (días); T: duración media de una generación.

* Los valores de r_m seguidos por letras distintas presentan diferencias significativas ($P < 0,05$, según solapamiento de intervalos de confianza).

4. 3. DISCUSIÓN

4. 3. 1. Desarrollo de los estados inmaduros

La humedad relativa presentó una gran influencia tanto en la mortalidad como en los periodos de desarrollo de los estados juveniles de *T. putrescentiae*. A diferencia de los resultados obtenidos por Rivard (1958b y 1961), se precisó un 70% HR para eliminar la totalidad de los estados inmaduros de este ácaro. Dicho autor empleó cultivos de hongos del género *Aspergillus* como alimento y estableció en 60% HR el porcentaje de humedad para el que el desarrollo de *T. putrescentiae* dejaba de producirse, registrando un 100% de mortalidad en el estado de huevo. Sin embargo, en los resultados aquí obtenidos el 43% de los huevos establecidos a 70% HR fue capaz de eclosionar, aunque ninguna de las larvas completó su desarrollo hasta el estado de protoninfa. Por encima de esa humedad, no se detectó ningún efecto en los porcentajes de mortalidad de los estados juveniles, siendo estos porcentajes inferiores al 10%. Rivard (1958b y 1961), sin embargo, obtuvo valores de alrededor del 50% bajo esas condiciones, produciéndose la mayor parte de esa mortalidad en el estado de huevo. Como se indicó en el capítulo anterior, la fuerte mortalidad registrada durante el periodo de incubación sugería que, aunque los ácaros eran capaces de desarrollarse y reproducirse alimentándose sobre los hongos, la dieta empleada debía ser deficiente en algún aspecto de forma que prevenía la puesta de altos porcentajes de huevos viables (Rivard, 1958b). Por otra parte, el elevado crecimiento de los hongos a altas humedades relativas puede afectar al desarrollo de los ácaros (Cunnington, 1976).

Respecto a los periodos de desarrollo de los estados inmaduros, los resultados obtenidos contrastan nuevamente con los aportados por Rivard (1958b y 1961). Este autor observó desarrollo hasta el estado adulto entre 70% y 100% de humedad relativa, no encontrando diferencias significativas en los periodos de desarrollo de los distintos estados (excepto el de tritoninfa) así como en el periodo de desarrollo total para las humedades de 90% y 100%. Por debajo de 90%, todas las duraciones se incrementaron significativamente, excepto para el estado de huevo, para el que la duración a 90% y 80% no fue significativamente diferente. La magnitud del incremento al disminuir la humedad de 90% a 80% fue de menos de 48 horas para completar el desarrollo hasta adulto (12,2 días frente a 13,9 días, respectivamente). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron diferencias significativas para la duración del estado de huevo

a las 3 humedades consideradas, así como un alargamiento generalizado del periodo de desarrollo para los estados móviles al pasar de 90% a 80%, que fue especialmente pronunciado para las larvas. El resultado global fue un incremento de 5,5 días en el tiempo necesario para cubrir el desarrollo desde huevo hasta adulto.

Las discrepancias observadas entre ambos estudios respecto a la magnitud del efecto de la humedad relativa sobre el desarrollo de este ácaro se explican por el diferente sustrato alimenticio empleado. Cutcher (1973) estableció entre 0,75 y 0,84 el valor de la actividad crítica de equilibrio de *T. putrescentiae* en condiciones de ayuno. Esto significa que a humedades relativas inferiores a 75%-84% esta especie es incapaz de absorber vapor de agua del ambiente y, por tanto, contrarrestar las pérdidas que sufre a través de la superficie corporal (Wharton y Furumizo, 1977; Evans, 1992). A este respecto conviene indicar que la actividad hídrica (a_w) en el interior del cuerpo de la mayoría de los animales es superior a 0,99 (Arlian, 1992), de forma que en los ácaros astigmátidos se produce una pérdida constante de agua a través de la cutícula. Sin embargo, los datos aportados por Rivard (1958b y 1961) muestran la capacidad de *T. putrescentiae* para desarrollarse bajo condiciones de 70% HR. Cutcher (1973) establece dos explicaciones para este fenómeno. Por un lado, el comportamiento de los ácaros en condiciones de estrés hídrico les hace buscar refugios que actúen como barrera a la transpiración de agua hacia el ambiente. En este sentido el propio Rivard (1958b y 1961) indicaba la necesidad de retirar parte del micelio del hongo de las celdas de cría cuando el crecimiento del mismo era demasiado abundante. Por otra parte, y quizá más importante, los ácaros ingieren el contenido de agua libre existente en el alimento. El contenido hídrico de los hongos empleados por Rivard (1958b y 1961) es mucho más elevado que el presente en los copos de levadura de cerveza, al tratarse de organismos vivos. Además, el sustrato empleado a su vez para cultivar los hongos estaba formado por una pasta compuesta de polvo de germen de trigo y agua (Rivard, 1958a), lo que también proporcionaba parte de humedad. Por tanto, las condiciones de humedad relativa establecidas por este autor en sus ensayos estaban sesgadas debido a un aporte extra de agua a causa de la metodología empleada. Los resultados aquí presentados parecen más fiables respecto al efecto de la humedad relativa como único factor sobre el desarrollo de los estados inmaduros de *T. putrescentiae*.

En cualquier caso los trabajos de Rivard (1958b y 1961) son interesantes desde otro punto de vista, ya que las condiciones microclimáticas en los alimentos almacenados

susceptibles de ser atacados por los ácaros no tienen por que coincidir con las ambientales. Así, Hilsenhoff y Dicke (1963) observaron individuos de *T. putrescentiae* que sobrevivían a 61% HR en el interior de grietas de quesos, mientras que aquéllos que no penetraban en dichos refugios morían. En el caso de productos como el jamón ibérico esta situación también tiene lugar, existiendo multitud de posibles refugios que permiten a los ácaros sobrevivir cuando las condiciones de humedad relativa les son desfavorables.

Por otra parte, los resultados aquí obtenidos sugieren que la actividad crítica de equilibrio de *T. putrescentiae* se aproxima más al valor de 0,75 del rango indicado por Cutcher (1973). Arlian y Wharton (1974) señalaron que a humedades relativas por debajo de la actividad crítica de equilibrio de *D. farinae* la pérdida de agua se producía de forma muy rápida dentro de las primeras 14 horas desde la exposición a esas condiciones. Esto contrasta con los resultados aportados por Cutcher (1973), el cuál observó que en *T. putrescentiae* el equilibrio hídrico se mantenía durante 18 días a 84% HR, lo que indica que esta humedad está por encima de la actividad crítica de equilibrio para este ácaro.

Respecto a la diferente susceptibilidad observada por los estados juveniles en relación a la humedad relativa, dos posibles explicaciones pueden formularse. Por una parte, el menor tamaño de las larvas hace que su relación superficie/volumen sea mayor, presentando una mayor tendencia a perder agua que el resto de estados móviles. Colloff (1991) indica el mismo argumento para explicar las diferencias en la actividad crítica de equilibrio encontradas para *Euroglyphus maynei* (Cooreman, 1950) (Astigmata: Pyroglyphidae) y *D. pteronyssinus*. Por otra parte, la menor mortalidad y el menor efecto sobre los periodos de desarrollo registrados en los huevos respecto a las larvas está relacionado con la función de barrera contra la desecación que desempeña el exocorión de los huevos del género *Tyrophagus* (Witalinski, 1993).

Finalmente, la duración del periodo de desarrollo fue mayor en el caso de las hembras respecto a los machos, situación idéntica a la indicada en el capítulo anterior (ver apartado 3.3.1.). Sin embargo, la proporción sexual global encontrada (56,7% de hembras) no fue estadísticamente diferente de la teórica de 1:1 (Grondziel, 1976), a pesar de estar aún más sesgada que la encontrada en los ensayos a diferentes temperaturas (54,9% de hembras). Este resultado se explica por el menor tamaño muestral disponible en los ensayos del efecto de la humedad relativa, lo que hizo que la

prueba estadística aplicada fuera más exigente a la hora de detectar diferencias significativas.

4. 3. 2. Reproducción y desarrollo de los adultos

Como en el caso del desarrollo de los estados inmaduros, el efecto observado de la humedad relativa sobre la reproducción de *T. putrescentiae* fue más acentuado que el citado por Rivard (1959). Según este autor, el periodo de preoviposición y la fecundidad sólo se vieron afectados a 70% HR respecto a las humedades relativas de 80%, 90% y 100%, para las que dichos parámetros no fueron estadísticamente diferentes. Analizando las cifras, la fecundidad obtenida por este autor en el rango de humedades entre 80% y 100% fue similar a la obtenida en el presente trabajo a 80% HR y muy inferior a la correspondiente a 90%, lo que se explica por la peor calidad de la dieta fúngica respecto a la levadura de cerveza (Parkinson et al., 1991a). Por su parte el periodo de oviposición obtenido fue similar a 70% y 80% HR, prolongándose alrededor de un 50% más respecto a los periodos observados a 90% y 100% HR. La metodología empleada por Rivard (1959) fue la misma que en los estudios anteriormente citados de este autor, de forma que el efecto del mayor contenido hídrico del alimento apuntado por Cutcher (1973) explicaría igualmente las diferencias detectadas entre ambos estudios. La magnitud del efecto de la humedad relativa sobre los parámetros reproductores de *A. siro* alimentado sobre copos de germen de trigo fue muy similar a la aquí indicada para *T. putrescentiae* (Cunnington, 1985). Así, la fecundidad, tasa de oviposición y fertilidad para el citado ácaro se redujeron drásticamente al disminuir la humedad relativa desde 90% hasta 62,5% HR (Cunnington, 1985).

Por otra parte, los modelos de fecundidad empleados describieron con precisión los datos obtenidos, tal y como había sucedido respecto a los datos de temperatura. La fecundidad diaria media a 80% HR fue mucho menor en relación a 90% HR, prolongándose más en el tiempo y a una tasa más constante. Esta situación es similar a la mostrada por Cunnington (1985) en *A. siro*.

Respecto a la longevidad, el efecto de la humedad relativa podría explicarse bajo los mismos criterios empleados en el caso de la temperatura. Como se indicó en el capítulo anterior (ver apartado 3. 3. 3.), el mayor desgaste que sufren las hembras durante el proceso reproductor podría ser la causa de su menor longevidad respecto a los

machos, situación ésta observada por diversos autores en diferentes ácaros astigmátidos (Rivard, 1959; Cunnington, 1985; Fashing y Hefele, 1991; Parkinson et al., 1991a). Por ello, las condiciones que atenúen el potencial reproductor de las hembras sin afectar la viabilidad de los procesos fisiológicos vitales tenderán a aumentar la longevidad. Así lo comprobaron Parkinson et al. (1991a) en hembras de *A. siro* alimentadas sobre hongos, las cuales presentaron menor fecundidad pero mayor longevidad que hembras alimentadas en germen de trigo y levadura de cerveza. Sin embargo, el efecto de la diferencia de tamaño existente entre sexos también debe ser considerado. Como en el caso de las larvas, el menor tamaño de los machos respecto a las hembras hace que su relación superficie/volumen sea mayor, presentando, por tanto, mayor susceptibilidad para perder agua a través de la superficie corporal (Colloff, 1991). Este efecto será más acusado a medida que la humedad relativa ambiental disminuya. Así, estos dos factores explicarían, por una parte, el aumento de longevidad de las hembras al pasar de 90% a 80% HR, y por otra, el efecto contrario registrado para los machos. En consecuencia, la esperanza de vida de cada sexo tendrá tendencia a igualarse a medida que la humedad relativa disminuya manteniéndose dentro de unos límites tolerables, conclusión que concuerda razonablemente con los datos aportados por Cunnington (1985) para *A. siro*. Esta situación se produjo a 80% HR para *T. putrescentiae*, humedad a la que la longevidad de machos y hembras no fue estadísticamente diferente. Por debajo de este valor, la drástica reducción de longevidad observada se debe a que la humedad de 70% se encuentra muy por debajo de la actividad crítica de equilibrio establecida por Cutcher (1973). Las diferencias de tamaño entre machos y hembras explican de nuevo las ligeras diferencias de longevidad encontradas a esta humedad.

Tras la aplicación de la función Weibull a los datos de supervivencia, se observó el mismo patrón de mortalidad para machos y hembras a 70% HR. A las otras dos humedades consideradas, se produjo un cambio en los patrones de mortalidad de Slobodkin (1962) y Southwood (1976) mostrados por los dos sexos, de manera similar al cambio de tendencia sufrido por la longevidad. Así, mientras a 90% HR los machos presentaban un patrón más cercano al tipo I y las hembras al tipo III, a 80% HR ambos sexos presentaron un patrón tipo I, más pronunciado en el caso de las hembras. Este efecto fue parecido al descrito en el capítulo 3 para la temperatura inferior, pudiendo explicarse con los mismos argumentos indicados en el párrafo anterior para los cambios de longevidad respecto a la humedad relativa.

4. 3. 3. Desarrollo de las poblaciones de *T. putrescentiae*

Como consecuencia del efecto registrado de la humedad sobre el desarrollo y reproducción de *T. putrescentiae*, las tasas intrínsecas de incremento obtenidas fueron muy diferentes a 80% y 90% HR. Asimismo, el efecto observado por Rivard (1959) fue más atenuado debido al mayor aporte hídrico de la dieta anteriormente citado. Esto se pone de manifiesto al comparar las r_m obtenidas en ambos trabajos. A 90% HR, este autor obtuvo una r_m de 0,2077 y a 80% su valor fue de 0,1727. En el presente estudio la r_m a 90% HR (0,3189) duplicó el valor obtenido a 80% (0,1645). Los resultados obtenidos a 90% HR señalan la diferente calidad del alimento empleado. Sin embargo, la esperable reducción a 80% no solo no se produjo, si no que la r_m obtenida por Rivard (1959) fue más alta que la del presente trabajo, lo que, sin duda, pone de manifiesto el efecto del contenido de agua del alimento señalado por Cutcher (1973).

En resumen, los datos aportados por Rivard (1959) muestran la capacidad de *T. putrescentiae* de tolerar condiciones ambientales de humedad moderadamente desfavorables a través del alimento ingerido, aunque las tasas de incremento obtenidas por este autor pueden no ser un buen reflejo de la situación real existente en poblaciones salvajes que tengan una mayor gama de alimentos a su disposición. En este sentido, los datos aquí aportados, obtenidos sobre una dieta ideal (Parkinson et al., 1991b), muestran el gran potencial de incremento de este ácaro en condiciones favorables y ayudan a comprender su condición de plaga.

ACTIVIDAD ACARICIDA DE MONOTERPENOS SOBRE *T. putrescentiae*

5. 1. INTRODUCCIÓN

El uso de productos naturales de origen vegetal para el control de plagas agrícolas ha recobrado un gran interés en los últimos años debido a los riesgos ambientales derivados del abuso y empleo poco juicioso de los plaguicidas sintéticos tradicionales. Más de 2.400 especies vegetales han sido descritas presentando propiedades para el control de plagas (Grainge y Ahmed, 1987), incluyendo especias y hierbas aromáticas que contienen aceites esenciales cuya alta volatilidad hace posible su extracción por medio de distintos procesos de destilación. La mayoría de los constituyentes de los aceites esenciales son monoterpenos, productos químicos secundarios de las plantas considerados de escasa importancia metabólica pero con demostrada actividad plaguicida tanto por contacto como por fumigación (Shaaya y Kostjukovsky, 1998). Asimismo, muchos de estos compuestos son utilizados como fragancias o saborizantes en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos, presentando, salvo excepciones, una toxicidad aguda mínima para los vertebrados (Coats, 1994).

Diversas investigaciones han constatado la actividad fumigante y por contacto a bajas concentraciones de monoterpenos y aceites esenciales extraídos de plantas frente a insectos plaga de productos almacenados como coleópteros y dictiópteros (Don-Pedro, 1989; Risha et al., 1990; Coats et al., 1991; Stamopoulos, 1991; Shaaya et al 1991). Sin embargo, la información concerniente al posible empleo de este tipo de sustancias para el control de ácaros de productos almacenados no es tan abundante. Gulati y Mathur (1995) observaron resultados satisfactorios respecto al control de poblaciones de *T. putrescentiae* en trigo almacenado a través de la aplicación por contacto de polvo de hojas de *Eucalyptus* (Myrtaceae) y *Mentha* (Labiatae) y de rizomas de *Curcuma* (Zingiberaceae). Asimismo, Perrucci (1995) estudió el efecto acaricida de aceites esenciales y sus constituyentes procedentes de *Lavandula angustifolia* Miller, *Lavandula stoechas* L., *Mentha x piperita* L. (Labiatae) y *Eucalyptus globulus* Labill (Myrtaceae), sobre *T. longior*. Sus resultados mostraron una gran actividad acaricida de varios monoterpenos como el linalool, la fenchona, la mentona, el mentol y el eucaliptol sobre esta especie. Estos antecedentes motivaron el estudio de la actividad fumigante de varios monoterpenos sobre *T. putrescentiae* como posible método de control, abordándose los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la actividad acaricida de diversos monoterpenos y obtener las de rectas de regresión probit de mortalidad vs dosis de aquéllos que resulten más activos.
2. Determinar el efecto diferencial de los compuestos activos en relación al sexo y el estado de desarrollo de *T. putrescentiae*.
3. Estudiar los posibles mecanismos de acción de estas sustancias.

5. 2. RESULTADOS

5. 2. 1. Selección de compuestos activos

Los porcentajes de mortalidad obtenidos tras la aplicación de los monoterpenos considerados a la dosis de 66,7 μ l/l de aire sobre hembras de *T. putrescentiae* se muestran en la tabla 5. 1. Siete de los compuestos ensayados (eucaliptol, fenchona, linalol, mentona, pulegona, α -terpineno y γ -terpineno) produjeron porcentajes de mortalidad superiores al umbral establecido de 90%. El pineno y el terpineol, que produjeron mortalidades del 56% y 38% respectivamente, y el resto de compuestos en los que no se observó actividad acaricida fueron descartados para estudios posteriores.

Tabla 5. 1. Porcentaje de mortalidad (media \pm ES) de hembras de *T. putrescentiae* tratadas por fumigación con diversos monoterpenos

Producto	Mortalidad (%)
Cariofileno	0 \pm 0,0
Eucaliptol	98 \pm 2,0
Fenchona	100 \pm 0,0
Linalil acetato	0 \pm 0,0
Linalol	100 \pm 0,0
Mentona	100 \pm 0,0
Mirtanol	0 \pm 0,0
Pineno	56 \pm 13,6
Pulegona	100 \pm 0,0
α -Terpineno	100 \pm 0,0
γ -Terpineno	100 \pm 0,0
Terpineol	38 \pm 8,6
Valenceno	4 \pm 2,5
Control (Metanol)*	0 \pm 0,0

* Excepto para el γ -Terpineno, con el que se usó como control el ciclohexano; (n = 100 para cada producto).

5. 2. 2. Rectas probit de mortalidad vs dosis

Los valores de CL50 y CL90 obtenidos para las hembras de *T. putrescentiae* expuestas a cada monoterpeno activo se muestran en la tabla 5. 2. Atendiendo a la prueba de paralelismo de las rectas de regresión probit se establecieron dos grupos de productos. Los compuestos pulegona, mentona, linalol y fenchona presentaron la mejor actividad acaricida, con una CL90 $\leq 14 \mu\text{l/l}$, mientras que las CL90 obtenidas para el eucaliptol, α -terpineno y γ -terpineno estuvieron en el rango de 21 a 44 $\mu\text{l/l}$. En cualquier caso, las tasas de mortalidad obtenidas demostraron que los siete compuestos seleccionados poseen una elevada actividad acaricida por fumigación.

Tabla 5.2. Concentraciones letales y pendiente de la recta de regresión probit de monoterpenos de origen vegetal sobre hembras de *T. putrescentiae*

Producto	CL50 (IC 95%) ⁽²⁾	CL90 (IC 95%) ⁽²⁾	Pendiente \pm ES	PR ⁽¹⁾ (IC 95%) ⁽²⁾
Grupo 1				
Eucaliptol	14,9 (14,1-15,6)	21,5 (20-23,7)	8,0 \pm 0,8 a	1 a
Fenchona	9 (7,9-10,5)	13,5 (11,3-19,8)	7,4 \pm 0,7 a	1,64 c (1,48-1,80)
Linalol	7 (6,3-7,7)	11,2 (9,6-14,8)	6,3 \pm 0,7 a	2,12 b (1,96-2,29)
Grupo 2				
α -Terpineno	32,3 (30,3-33,9)	43,4 (40,6-48,6)	10,0 \pm 1,6 a	1 a
γ -Terpineno	33,2 (30,7-36,7)	42,6 (38,0-55,7)	11,8 \pm 1,2 a	0,98 a (0,90-1,05)
Mentona	4,7 (4,5-5)	6,2 (5,8-7,2)	10,8 \pm 1,7 a	6,83 b (6,27-7,43)
Pulegona	3,7 (3,2-4,2)	4,7 (4,2-7,1)	12,0 \pm 1,3 a	8,83 c (8,14-9,48)

Dentro de cada grupo, los valores seguidos de la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$); (n = 300 hembras por producto).

⁽¹⁾ PR = Potencia relativa.

⁽²⁾ Intervalo de confianza al 95%.

En la Figura 5. 1. se representan las 7 rectas de regresión probit obtenidas. La prueba de paralelismo mostró diferencias significativas entre ellas, pudiéndose establecer dos grupos distintos de rectas de acuerdo con sus pendientes (Tabla 5. 2.). El primer grupo estaba formado por eucaliptol, fenchona y linalol, con una pendiente común de $7,1 \pm 0,4$, siendo el linalol el compuesto más potente, con una potencia relativa 2,1 veces mayor que la del eucaliptol. El segundo grupo estaba formado por pulegona, mentona, α -terpineno y γ -terpineno, con una pendiente común de $10,9 \pm 0,8$. Dentro de este grupo las rectas correspondientes a α -terpineno y γ -terpineno resultaron ser significativamente iguales y distintas a las otras dos. La pulegona y la mentona fueron los productos más efectivos, presentando los menores valores de CL50 (3,7 y 4,7 μ l/l, respectivamente) y la mayor potencia relativa (8,8 y 6,8, respectivamente).

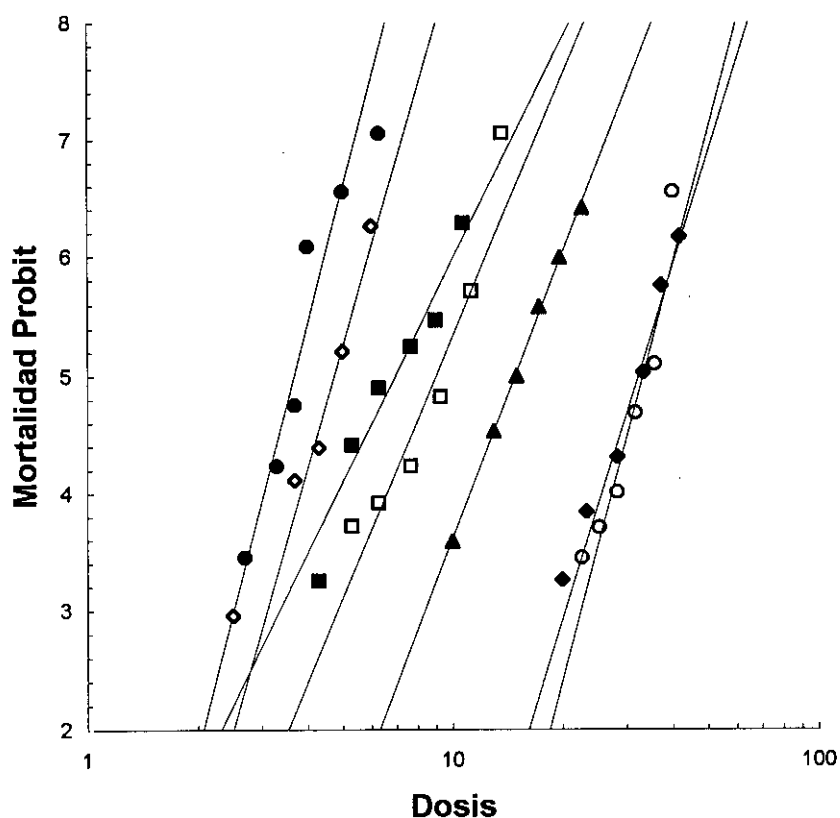


Figura 5. 1. Rectas de regresión ponderada probit ajustadas para la mortalidad de hembras adultas de *T. putrescentiae*, tras 24 horas de tratamiento por fumigación con los monoterpenos seleccionados. Las rectas corresponden a la pulegona (●), mentona (◇), linalol (■), fenchona (□), eucaliptol (▲), α -terpineno (◆) y γ -terpineno (○).

5. 2. 3. Efecto del sexo y el estado de desarrollo en la mortalidad

La actividad de cada compuesto sobre larvas, machos y hembras fue determinada a una dosis correspondiente a la CL50 obtenida previamente para las hembras. Para cada compuesto, el porcentaje de mortalidad de larvas y machos fue similar y significativamente mayor que el de las hembras (Tabla 5. 3).

Tabla 5.3. Porcentaje de mortalidad (media \pm ES) de larvas, machos y hembras de *T. putrescentiae* expuestos por fumigación a las CL50, calculadas para las hembras, de los monoterpenos activos

Producto	Dosis (μ /l)	Larvas	Machos	Hembras
Mentona	4,7	98 \pm 2,0 a	95 \pm 4,0 a	48 \pm 7,7 b
Pulegona	3,7	100 \pm 0,0 a	97 \pm 3,0 a	58 \pm 12,2 b
Linalol	7	100 \pm 0,0 a	100 \pm 0,0 a	63 \pm 7,5 b
Fenchona	9	100 \pm 0,0 a	95 \pm 5,0 a	55 \pm 9,9 b
Eucaliptol	14,9	88 \pm 5,5 a	90 \pm 5,2 a	48 \pm 8,3 b
α -Terpineno	32,3	100 \pm 0,0 a	99 \pm 1,0 a	46 \pm 6,9 b
γ -Terpineno	33,2	100 \pm 0,0 a	77 \pm 6,5 a	54 \pm 6,1 b

Los valores seguidos de letras distintas dentro de cada fila son significativamente diferentes ($P < 0,05$; prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn); ($n = 100$ individuos por estado y producto).

5. 2. 4. Efecto ovicida

El porcentaje de mortalidad observado en huevos expuestos por fumigación a la CL90 de los monoterpenos activos calculada para las hembras osciló entre 0 y 4%, valores que no fueron significativamente distintos a los de los controles correspondientes ($K = 6,5$; $P > 0,5$). De manera similar, el periodo de desarrollo de los huevos en las muestras tratadas, que osciló entre $3,8 \pm 0,1$ y $3,9 \pm 0,1$ días, no fue significativamente distinto del observado en los controles ($3,9 \pm 0,1$ días) ($F = 0,7$; $P > 0,7$). Asimismo, el

posterior desarrollo de los huevos hasta el estado adulto se produjo con total normalidad, no registrándose ningún efecto sobre la mortalidad total de los estados inmaduros ni sobre el periodo de desarrollo total ($K = 6,8$; $P > 0,5$ y $F = 0,5$; $P > 0,8$, respectivamente).

5. 2. 5. Evaluación de la inhibición de la acetilcolinesterasa

El porcentaje de actividad acetilcolinesterasa respecto al control (100%) en extractos de *T. putrescentiae* para los distintos monoterpenos considerados se muestra en la Figura 5. 2. Como se observa, los compuestos con mayor capacidad inhibitoria fueron la pulegona y el linalol, aunque sólo fueron capaces de reducir la actividad por debajo del 70% ($68,2 \pm 6,0$ y $69,0 \pm 4,5$, respectivamente). Para el resto de compuestos se obtuvieron actividades comprendidas entre el 81% y el 99%. Estos resultados contrastan con la CI_{50} estimada para el clorpirifos que fue de tan sólo $65,3 \mu\text{M}$, de forma que los monoterpenos con mayor actividad de inhibición de la acetilcolinesterasa en *T. putrescentiae* sólo fueron capaces de reducir alrededor de un 30% su actividad a la dosis de 10 mM, valor más de 150 veces mayor que la necesaria para reducir el 50% de la actividad con el insecticida organofosforado clorpirifos.

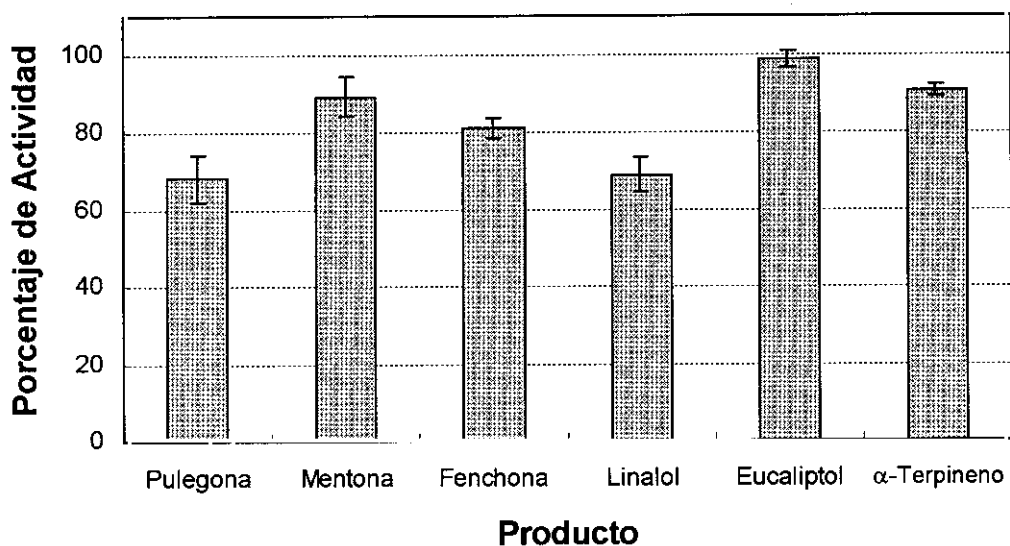


Figura 5. 2. Porcentaje de actividad acetilcolinesterasa (media \pm ES) respecto al control en extractos de *T. putrescentiae* para seis monoterpenos a una dosis de 10 mM.

5. 3. DISCUSIÓN

De los 13 productos naturales ensayados, siete de ellos mostraron una elevada actividad acaricida por fumigación contra los estados móviles de *T. putrescentiae*. Dentro de estos, la pulegona, la mentona, el linalol y la fenchona fueron los que presentaron la mayor actividad acaricida, con un valor de CL90 menor de 14 μ l/l de aire. Estos compuestos son similares a los citados como activos para adultos de *T. longior* tratados por contacto y por fumigación (Perrucci, 1995), aunque para este ácaro se requerían dosis más de 3 veces mayores de mentona, linalol y fenchona para obtener valores de CL50 dentro del rango de los obtenidos en el presente trabajo.

La diferencia en susceptibilidad entre ambas especies podría estar relacionada con la especificidad del compuesto. Sin embargo, resulta interesante el hecho de que las larvas y los machos de *T. putrescentiae* presentaran una tasa de mortalidad alrededor de dos veces mayor que la registrada para las hembras cuando se expusieron por fumigación a la misma dosis (CL50) de los monoterpenos activos. Este dato, junto con el mayor efecto detectado en esta especie respecto a *T. longior*, hace pensar en una influencia del tamaño en la eficacia de los diferentes productos considerados. En este sentido, hay que indicar que *T. longior* es sensiblemente más grande que *T. putrescentiae* (Hughes, 1976).

Los individuos muertos de *T. putrescentiae* debido al tratamiento con los monoterpenos presentaban sus cuerpos arrugados, las patas dobladas bajo el cuerpo, y mostraban unas depresiones características en la superficie dorsal del idiosoma, síntomas usualmente considerados como asociados con procesos de desecación (Ignatowicz, 1981; Evans, 1992). Aunque es posible que ese efecto se produjera posteriormente a la muerte de los ácaros y no fuera la causa de la misma, no obstante, los síntomas también fueron observados en determinados ácaros que transcurrida la exposición a los productos ensayados habían logrado sobrevivir. Al ponerlos posteriormente en condiciones favorables fueron capaces de recuperarse y de retomar su aspecto normal, sugiriéndose así un proceso de rehidratación. Si el mecanismo de acción está relacionado con un efecto de deshidratación, sería lógico esperar una mayor susceptibilidad en los individuos de menor tamaño y, por tanto, con una relación superficie/volumen mayor, estando esto de acuerdo con lo indicado en el capítulo 4.

Por su parte, la ausencia de actividad ovicida de los monoterpenos naturales ensayados parece estar en consonancia con el hecho ya citado de que el exocorion de los huevos del género *Tyrophagus* actúa como una barrera en contra de la desecación (Witalinski, 1993). Esto apoyaría la idea de que la mayor actividad acaricida observada en los estados inmaduros y en los adultos podría estar principalmente relacionada con procesos de deshidratación. En cualquier caso, la tasa metabólica y el consumo de oxígeno es menor en los huevos que en los adultos, como Szlendak y Kraszpuski (1991) han demostrado para *Acarus siro*. Este hecho podría reducir la tasa de mortalidad de los huevos en caso de que el mecanismo de acción de los monoterpenos estuviera basado en interferencias con los procesos respiratorios, tal y como ha sido sugerido para aceites esenciales de plantas (Schoonhoven, 1978). Sin embargo, este autor indicó a partir de sus resultados que otros mecanismos debían jugar un papel importante en el modo de acción de estas sustancias, ya que insectos privados de oxígeno eran capaces de sobrevivir más tiempo que los tratados con aceites. Una situación similar ha sido registrada en ácaros astigmátidos. Guerrero y Amau (1995) observaron efectos que iban de ligeros a moderados en el control de *T. putrescentiae*, tras tratamientos de 24 horas con atmósferas modificadas compuestas de un 100% de N₂ o de CO₂. Por su parte, Paganí y Ciampitti (1990) observaron mortalidades del 50% en poblaciones de *A. siro* y *T. longior* tratadas durante 3 y 4 días con atmósferas modificadas del 100% de N₂. Estas observaciones muestran la tolerancia de estos ácaros a bajas concentraciones de oxígeno, lo que excluye el posible efecto sobre los procesos respiratorios de los monoterpenos como principal mecanismo de acción de estas sustancias.

Determinados autores han indicado efectos neurotóxicos en insectos debido a la acción de monoterpenos (Ryan y Byrne, 1988; Coats et al., 1991). Así, Coats et al. (1991) observaron síntomas de envenenamiento agudo en *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae) y en *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) debido al efecto de varios monoterpenos. Estos síntomas eran similares a los producidos por compuestos neurotóxicos e incluían hiperactividad, pérdida de coordinación y temblores. Sin embargo, los datos obtenidos no les permitieron determinar el lugar exacto de actuación de los compuestos empleados. Por su parte, Ryan y Byrne (1988), determinaron procesos de inhibición de la acetilcolinesterasa por efecto de 5 monoterpenos sobre *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). Entre los monoterpenos que emplearon se encontraban el eucaliptol, la pulegona y el linalol, los cuales presentaron capacidad inhibitoria a concentraciones del producto dentro de los rangos 0,01-0,1 mM, 0,1-1 mM y

0,1-10 mM, respectivamente. Esta capacidad ha sido posteriormente demostrada para monoterpenos y aceites esenciales de plantas en acetilcolinesterasa de vertebrados por Miyazawa et al. (1997 y 1998). Estos autores observaron valores de CI50 para α -terpineno, pulegona y mentona menores de 2 mM. Sin embargo, en el caso de *T. putrescentiae*, los porcentajes de inhibición obtenidos a dosis de 10 mM fueron menores del 20% para eucaliptol, α -terpineno, mentona y fenchona, y sólo ligeramente superiores al 30% para pulegona y linalol. Esto hace pensar que, si bien el mecanismo de inhibición de la acetilcolinesterasa no debe ser descartado como posible modo de acción de este tipo de compuestos, al menos en *T. putrescentiae* no constituye el principal efecto causante de los altos porcentajes de mortalidad registrados en el presente trabajo. Shaaya y Kostjukovsky (1998) se expresaron en este mismo sentido al indicar que la incapacidad de los monoterpenos biológicamente activos de producir fuertes inhibiciones tanto *in vivo* como *in vitro* les llevaba a postular que la enzima acetilcolinesterasa no es el principal centro de acción de estos compuestos.

Habiendo analizado los mecanismos propuestos acerca del modo de acción de los monoterpenos, la idea planteada del efecto desecante de estas sustancias sobre *T. putrescentiae*, parece cobrar mayor verosimilitud. El siguiente paso sería preguntarse acerca de cuál es el proceso físico responsable de la deshidratación de los ácaros por acción de los monoterpenos. El efecto deshidratante de aceites en contacto con la cutícula de los insectos es bien conocido desde hace tiempo. Wigglesworth (1942) observó la formación de pequeñas gotas de agua en la superficie de la cutícula de insectos de pequeño tamaño sumergidos en aceite de petróleo refinado o en aceite de oliva. Este efecto se producía dentro de la primera media hora del tratamiento y transcurridas dos horas las gotas se volvían conspicuas por toda la superficie del insecto. Si se empleaba un aceite más ligero, como queroseno o xilol, las gotas aparecían en tan solo cinco minutos. Beament (1945) demostró que aceites y sustancias solubles en aceites alteraban la orientación de las moléculas lipídicas de la cutícula de los insectos que constituyen la barrera frente a la desecación, dando lugar a cambios en la permeabilidad de la misma. Sugería, además, que los solventes más efectivos a la hora de causar la difusión de agua desde el insecto eran aquéllos con el mejor equilibrio en sus características hidrofílicas y lipofílicas. Esto se debe a la reducción de la tensión entre las dos fases formadas por el agua y el solvente, lo que provoca un incremento de las pérdidas de agua del animal (Ebeling y Wagner, 1959; Shaaya y Kostjukovsky, 1998).

La naturaleza lipídica de los monoterpenos permite pensar que puedan dar lugar a mecanismos similares a los observados para los aceites. A este respecto, conviene recordar que estos productos son constituyentes fundamentales de aceites esenciales de plantas, aceites que han demostrado tener efecto acaricida por fumigación sobre otros ácaros astigmátidos como *T. longior* (Perrucci, 1995). Los pesos moleculares de los monoterpenos son relativamente bajos, lo que aumentaría la tasa de difusión del agua hacia el exterior, tal y como Ebeling (1976) indica. Además, algunos de ellos presentan radicales polares como grupos hidroxilo o cetónicos, aspecto que concuerda con las características indicadas por Beament (1945) para una mayor efectividad. Sin embargo, analizando las características de los compuestos que resultaron ser activos frente a *T. putrescentiae* y comparándolas con las de aquéllos que no lo fueron, no se observa ninguna correlación entre las mismas y la actividad acaricida observada. Shaaya y Kostjukovsky (1998) indican que otras características físicoquímicas de los aceites, tales como viscosidad y volatilidad, podrían determinar la actividad biológica de estos compuestos, lo cual sería atribuible también a los monoterpenos. Considerando, por tanto, como viable este mecanismo de acción para estas sustancias, sería de esperar un efecto como el observado sobre organismos tan susceptibles a procesos de deshidratación como los ácaros astigmátidos. El aumento de la permeabilidad en la ya de por sí permeable cutícula de estos ácaros produciría fatales consecuencias que aumentarían su actividad crítica de equilibrio (ver capítulo 4) aumentando a su vez su susceptibilidad a la deshidratación.

En definitiva, de todos los monoterpenos ensayados, pulegona, mentona, linalol y fenchona fueron los más prometedores para su posible uso contra *T. putrescentiae* debido a las bajas dosis requeridas para producir una alta mortalidad en los estados inmaduros móviles y en los adultos. Adicionalmente diversos autores han indicado ausencia de residuos peligrosos para la salud humana derivados del tratamiento con estos productos (Coats et al., 1991; Coats, 1994; Perrucci, 1995), así como ausencia de modificación del color, sabor, olor y textura de los alimentos tratados (Perrucci, 1995). Sin embargo, la falta de actividad ovicida limita su posible uso dentro de los sistemas de almacenamiento. La realización de experimentos *in situ* que confirmen la alta actividad observada así como la no alteración de las características organolépticas de los productos almacenados es particularmente importante para el posible uso práctico de estos productos.

EVALUACIÓN DEL EMPLEO DE PLAGUICIDAS PARA EL CONTROL DE *T. putrescentiae*

6. 1. INTRODUCCIÓN

La alta eficacia, selectividad y baja toxicidad mostrada por los plaguicidas de última generación para el control de plagas agrícolas (refs) ha motivado la investigación de su posible aplicación para el control de insectos de productos almacenados, habiéndose obtenido resultados altamente satisfactorios (Oberlander et al., 1997). Sin embargo, la información disponible acerca del efecto de este tipo de sustancias sobre el desarrollo de los ácaros de productos almacenados es muy limitada, debido en gran medida a los escasos conocimientos existentes sobre la regulación hormonal de los procesos implicados en el crecimiento de estos organismos (Evans, 1992; Sakagami et al, 1992). Aun así, algunos estudios han puesto de manifiesto la actividad acaricida de distintos reguladores del crecimiento sobre determinadas especies de ácaros astigmátidos como *T. putrescentiae* y *D. farinae* (Czaja-Topinska et al., 1979; Downing et al., 1990).

Por otra parte, existe actualmente en el mercado un nuevo tipo de plaguicidas de origen biológico denominados Naturalitos, los cuales están basados en metabolitos naturales derivados de organismos vivos. Entre ellos destaca el Spinosad, al que se ha atribuido una gran eficacia para el control de diversas plagas así como una elevada seguridad ambiental (Thompson et al., 1997).

En este contexto, se planteó investigar el efecto de productos con distintos modos de acción sobre el desarrollo y la reproducción de *T. putrescentiae*. La forma de tratamiento empleada fue la ingestión ya que, de acuerdo a las especificaciones técnicas de estos plaguicidas, su actividad presenta una mayor eficacia cuando son administrados por este método frente a otras formas de tratamiento.

Por otra parte también se ensayó un plaguicida organofosforado convencional, el clorpirifos, empleado para el control de plagas de ácaros de productos almacenados (Zdarkova, 1994), con el fin de establecer referencias comparativas.

6. 2. RESULTADOS

6. 2. 1. Efecto sobre la mortalidad y el desarrollo de los estados inmaduros

6. 2. 1. 1. Mortalidad

Los porcentajes de mortalidad obtenidos para los estados inmaduros de *T. putrescentiae* ante dosis crecientes de los distintos productos ensayados se muestran en la Tabla 6. 1. El ensayo para el hexaflumurón a 10.000 ppm no fue viable debido a que las condiciones de textura que presentaba la dieta tratada no fueron las adecuadas para el desarrollo de los estados juveniles de este ácaro.

Como se observa, sólo el halofenocida produjo mortalidad significativamente mayor a la del control a la dosis de 1.000 ppm, con un 46% de estados juveniles muertos. Dentro de ese porcentaje, el 9% de las muertes ocurrieron en el estado de protoninfa y el 91% en el de tritoninfa, no registrándose mortalidad en el estado de larva. A la dosis de 10.000 ppm, el piriproxifén y el clorpirifos también se mostraron efectivos, junto con el halofenocida, con cerca de un 100% de mortalidad para los tres productos. Dicha mortalidad se concentró completamente en el estado de larva para el clorpirifos y para el

piriproxifén, y sólo un 2% de los individuos muertos por efecto del halofenocida a esa dosis lo hicieron en otro estado, concretamente el de tritoninfa.

Tabla 6.1. Porcentaje de mortalidad (media \pm ES) de los estados inmaduros de *T. putrescentiae* alimentados sobre dieta tratada con diferentes plaguicidas

Dosis (ppm)	Azadiractina	Piriproxifén	Halofenocida	Hexaflumurón	Spinosad	Clorpirifos
0 ⁽¹⁾	2 \pm 2,0	0 \pm 0,0	4 \pm 4,0	0 \pm 0,0	2 \pm 2,0	4 \pm 4,0
10	0 \pm 0,0	6 \pm 3,1	10 \pm 5,4	0 \pm 0,0	4 \pm 2,7	2 \pm 0,1
100	10 \pm 3,3	2 \pm 2,0	2 \pm 2,0	4 \pm 4,0	11,1 \pm 6,8	4 \pm 2,7
1.000	4,4 \pm 2,9	4 \pm 2,7	46 \pm 11,9 *	15,6 \pm 10,4	2 \pm 2,0	4 \pm 2,7
10.000	2 \pm 2,0	96 \pm 2,7 *	100 \pm 0,0 *	s/d	8,9 \pm 6,8	100 \pm 0 *

* Dentro de cada columna indica diferencias significativas respecto al control ($P < 0,05$; prueba de Kruskal Wallis seguida de prueba de Dunn); ($n = 50$ individuos por producto y dosis).

⁽¹⁾ Como controles se emplearon el metanol (para el halofenocida y la azadiractina) y el agua destilada (para el resto).

s/d: sin datos.

6. 2. 1. 2. Duración del desarrollo

El periodo de desarrollo de los estados inmaduros móviles de *T. putrescentiae* tras los tratamientos por ingestión con los plaguicidas seleccionados se muestra en la Tabla 6. 2. No se produjo ningún efecto para ninguno de los productos a las dosis de 10 ppm y 100 ppm. Sin embargo, para la dosis de 1.000 ppm en todos los productos y para la de 10.000 ppm en aquéllos que no habían causado un 100% de mortalidad, tuvo lugar un incremento significativo en el tiempo necesario para completar el desarrollo hasta el estado adulto.

A la dosis de 1.000 ppm, los incrementos más pronunciados en orden descendente se produjeron con el hexaflumurón, el halofenocida y el piriproxifén, para los que el periodo de desarrollo desde larva hasta adulto se prolongó un 37%, un 22% y un 12%, respectivamente, respecto al tiempo empleado por los organismos control. Para los otros tres productos dicho incremento no superó el 7%. A 10.000 ppm destaca el valor

obtenido para el piriproxifén, ya que el periodo de desarrollo prácticamente se duplicó con respecto al control. Para la azadiractina y el spinosad a esta dosis el periodo de desarrollo se alargó alrededor de un 15% respecto al observado en los controles.

Tabla 6. 2. Duración (media \pm ES) desde larva hasta adulto para *T. putrescentiae* alimentado sobre dieta tratada con diferentes plaguicidas

Dosis (ppm)	Azadiractina	Piriproxifén	Halofenocida	Hexaflumurón	Spinosad	Clorpirifos
0	5,7 \pm 0,1 a (49)	5,8 \pm 0,1 a (50)	5,8 \pm 0,1 a (48)	5,7 \pm 0,1 a (50)	5,8 \pm 0,1 a (49)	5,8 \pm 0,1 a (48)
10	5,6 \pm 0,1 a (50)	5,8 \pm 0,1 a (47)	5,6 \pm 0,1 a (45)	5,8 \pm 0,1 a (50)	5,8 \pm 0,1 a (48)	5,7 \pm 0,1 a (49)
100	5,9 \pm 0,1 a (45)	5,6 \pm 0,1 a (49)	5,6 \pm 0,1 a (49)	5,9 \pm 0,1 a (48)	5,8 \pm 0,1 a (40)	5,8 \pm 0,1 a (48)
1.000	6,0 \pm 0,1 b (43)	6,5 \pm 0,1 b (48)	7,1 \pm 0,3 b (27)	7,8 \pm 0,1 b (38)	6,1 \pm 0,1 b (49)	6,2 \pm 0,1 b (48)
10.000	6,5 \pm 0,1 c (49)	11,0 \pm 1,0 c (2)	-	-	6,7 \pm 0,1 c (41)	-

Los valores seguidos de letras distintas dentro de una misma columna presentan diferencias significativas ($P < 0,05$; ANOVA encajado seguido de prueba de Newman-Keuls). Debajo de cada valor, entre paréntesis, se indica el tamaño muestral.

6. 2. 2. Efecto sobre la fecundidad y la fertilidad

Tras la aplicación de la función Weibull acumulada a los datos de fecundidad acumulada obtenidos a 25°C y 90% de humedad relativa (ver apartado 3. 2. 2. 2.) se comprobó que transcurridos aproximadamente 25 días desde el comienzo de la oviposición quedaba justificada el 95% de la fecundidad total de una población fértil de *T. putrescentiae*. Por ello este periodo fue el elegido para estudiar el efecto de los distintos productos seleccionados sobre la fecundidad de este ácaro. Dichos productos fueron los que habían mostrado un mayor efecto sobre la supervivencia y el desarrollo de los estados juveniles de *T. putrescentiae*, esto es, el halofenocida, el piriproxifén y el clorpirifos.

La Figura 6. 1. muestra la fecundidad acumulada media por hembra obtenida con los distintos productos considerados y la Tabla 6. 3. el número total de huevos puestos

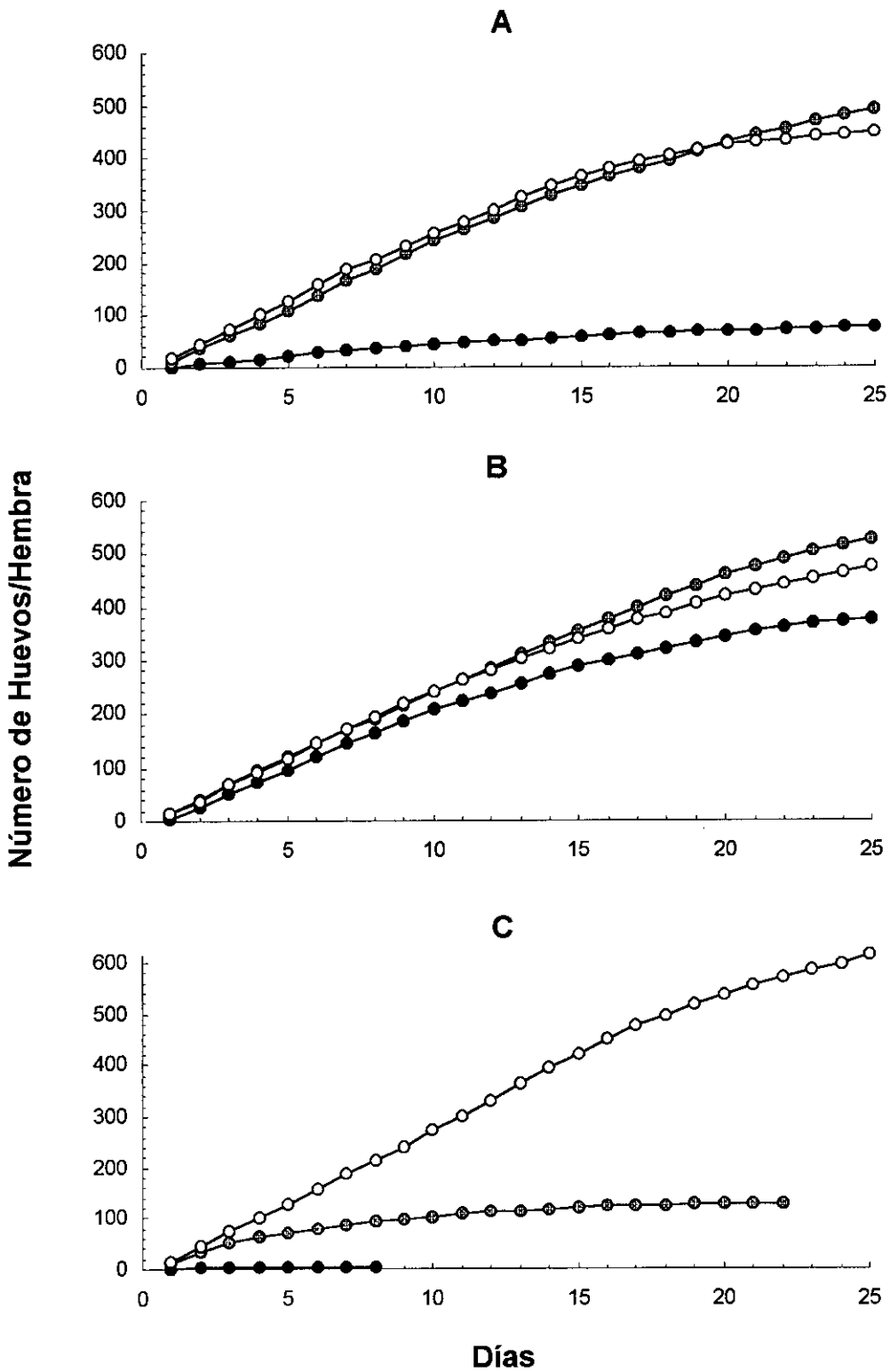


Figura 6. 1. Fecundidad acumulada media para *T. putrescentiae* tratado por ingestión con tres plaguicidas: Clorpirifos (A); Piriproxifén (B); Halofenocida (C); a las dosis de 0 ppm (○); 1.000 ppm (●) y 10.000 ppm(■).

por hembra transcurridos los 25 días del ensayo. El piriproxifén no afectó significativamente la fecundidad de *T. putrescentiae* a ninguna de las dosis establecidas, mientras que para el clorpirifos sólo la dosis de 10.000 ppm redujo significativamente la fecundidad respecto al control, con un número de huevos casi 6 veces menor. Sin embargo, el halofenocida tuvo un efecto considerable en la fecundidad, ya que se produjo una reducción en el número de huevos puestos de más de 100 veces para 10.000 ppm y de 5 veces para 1.000 ppm con respecto al control. Destaca el valor obtenido a 10.000 ppm con este producto, con el que se obtuvieron menos de 5 huevos por hembra a lo largo del periodo establecido para el ensayo. No hubo diferencias significativas en la fecundidad encontrada para los 3 controles ($F = 1,6$; $P > 0,2$).

Tabla 6. 3. Fecundidad (media \pm ES) de *T. putrescentiae* alimentado sobre dieta tratada con diferentes plaguicidas

Dosis (ppm)	Halofenocida	Piriproxifén	Clorpirifos
0	613,3 \pm 71,1 a	475,7 \pm 78,9 a	447,2 \pm 60,9 a
1.000	128,3 \pm 23,9 b	528,0 \pm 45,2 a	492,8 \pm 51,4 a
10.000	4,7 \pm 1,7 c	377,0 \pm 51,8 a	76,0 \pm 38,4 b

Los valores seguidos de letras distintas dentro de una misma columna presentan diferencias significativas ($P < 0,05$; ANOVA de una vía seguido de prueba de Newman-Keuls); ($n = 10$ parejas por producto y dosis).

Tabla 6. 4. Fecundidad diaria (media \pm ES) de *T. putrescentiae* alimentado sobre dieta tratada con diferentes plaguicidas

Dosis (ppm)	Halofenocida	Piriproxifén	Clorpirifos
0	28,3 \pm 1,3 a	26,1 \pm 1,1 a	25,1 \pm 1,3 a
1.000	7,7 \pm 1,0 b	22,5 \pm 0,8 b	20,5 \pm 1,7 a
10.000	1,1 \pm 0,3 c	20,8 \pm 1,2 b	6,0 \pm 1,9 b

Los valores seguidos de letras distintas dentro de una misma columna presentan diferencias significativas ($P < 0,05$; ANOVA de una vía seguido de prueba de Newman-Keuls); ($n = 10$ parejas por producto y dosis).

La Tabla 6. 4. muestra los valores obtenidos respecto al número de huevos puestos por hembra y por día de oviposición. A diferencia de los resultados de la Tabla 6. 3. para la fecundidad total, la fecundidad diaria por hembra obtenida con el piriproxifen presentó diferencias significativas a las dos dosis empleadas respecto al control correspondiente. Esto es debido a que no todas las hembras en los diferentes tratamientos pusieron huevos durante los 25 días establecidos para el ensayo y a la menor variabilidad registrada para la fecundidad diaria respecto a la total. Para los otros dos productos el patrón fue el mismo que para la fecundidad total, siendo los dos tratamientos significativamente diferentes entre sí y respecto al control para el halofenocida, y sólo el de 10.000 ppm para el clorpirifos. Como en el caso de la fecundidad total, es de resaltar el valor obtenido a la dosis de 10.000 ppm para el halofenocida, con el que cada hembra sólo fue capaz de poner 1 huevo al día durante el periodo de oviposición. Destaca asimismo el hecho de que dicho periodo de oviposición para el total de la población tratada con halofenocida a 10.000 ppm fuera únicamente de 8 días y a la dosis de 1.000 ppm, de 22 días (Figura 6. 1.). Para el resto de tratamientos todas las poblaciones pusieron huevos durante la totalidad del periodo previamente establecido.

Tabla 6. 5. Porcentaje de mortalidad de adultos de *T. putrescentiae* alimentados sobre dieta tratada con diferentes plaguicidas

Dosis (ppm)	Halofenocida	Piriproxifén	Clorpirifos
0	10 a	20 a	20 a
1.000	70 b	10 a	5 a
10.000	85 b	30 a	75 b

Los valores seguidos de letras distintas dentro de una misma columna presentan diferencias significativas ($P < 0,05$; prueba de la χ^2); ($n = 20$ individuos por producto y dosis).

Respecto al efecto de los distintos tratamientos sobre la supervivencia de los adultos de *T. putrescentiae*, la Tabla 6. 5. muestra los porcentajes de mortalidad obtenidos para cada producto y dosis transcurridos los 25 días del ensayo. Ningún efecto fue detectado para el piriproxifén a las dos dosis consideradas, mientras que la situación inversa se dio para el halofenocida, con el que tanto para 1.000 ppm como para 10.000

ppm se produjo una mortalidad significativamente mayor que la registrada para el control, con un 70% y un 85% de los individuos iniciales muertos respectivamente. Con el clorpirifos sólo a la dosis más alta tuvo lugar una mortalidad significativamente mayor a la del control, con un 75% de los individuos iniciales muertos. En la Figura 6.2. se representa la evolución de la probabilidad de supervivencia de los individuos adultos de *T. putrescentiae* durante el periodo de duración del ensayo para los distintos productos y dosis empleados.

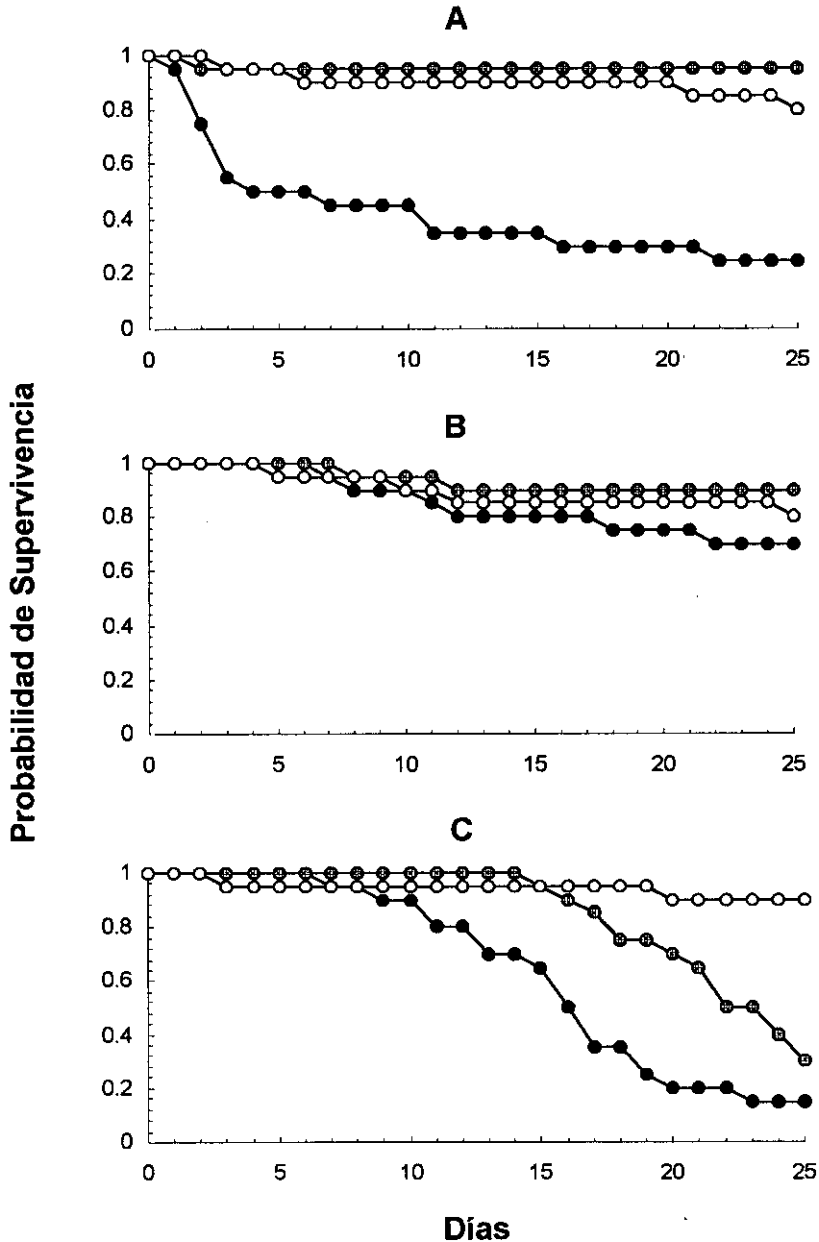


Figura 6.2. Probabilidad de supervivencia en relación al tiempo para adultos de *T. putrescentiae* tratados por ingestión con Clorpirifos (A); Piriproxifén (B); Halofenocida (C); a las dosis de 0 ppm (○); 1.000 ppm (●) y 10.000 ppm (◐).

Finalmente, la fertilidad obtenida para *T. putrescentiae* no se vio afectada por los distintos tratamientos realizados ($K = 6,8$; $P > 0,5$), siendo la mortalidad del estado de huevo inferior al 2% en todos los casos. Asimismo, el desarrollo de la progenie tampoco estuvo influenciado por el tratamiento de los adultos con los plaguicidas seleccionados. La duración del estado de huevo en las muestras tratadas, que osciló entre $3,5 \pm 0,1$ y $3,8 \pm 0,1$, no fue significativamente distinta de la obtenida para los controles (entre $3,7 \pm 0,1$ y $3,8 \pm 0,1$) ($F = 1,1$; $P > 0,3$). De igual forma, la duración del periodo de desarrollo desde huevo hasta adulto y la mortalidad de dicho periodo tampoco fueron diferentes para la progenie procedente de la población sometida a los tratamientos respecto a la de los controles ($F = 1,6$; $P > 0,1$ y $K = 4,0$; $P > 0,8$, respectivamente).

6. 3. DISCUSIÓN

La ingestión de azadiractina, hexaflumurón y spinosad no afectó a la supervivencia de los estados de desarrollo de *T. putrescentiae* a ninguna de las dosis aplicadas, aunque sí se produjo un retraso en el periodo de desarrollo de los estados inmaduros para las dosis de 1.000 y 10.000 ppm (a excepción del hexaflumurón a 10.000, para el que el ensayo no fue viable). Por su parte, el halofenocida y el piriproxifén mostraron mayor efectividad, afectando tanto al desarrollo como a la supervivencia, aunque mostraron diferente comportamiento respecto a su efecto sobre la reproducción de este ácaro.

6. 3. 1. Azadiractina

La disponibilidad de estudios que hayan abordado el efecto de la azadiractina sobre ácaros es muy limitada (Mansour y Ascher, 1995). Según Sanguanpong y Schmutterer (1992), la actividad de la azadiractina no parece ser muy marcada sobre estos organismos, lo que estaría en consonancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre *T. putrescentiae* y con los obtenidos por otros autores sobre otras especies de ácaros. Spollen e Isman (1996) evaluaron el efecto de un insecticida que contenía azadiractina como ingrediente activo sobre dos especies de ácaros depredadores, *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot y *Amblyseius cucumeris* (Oudemans) (Mesostigmata: Phytoseiidae), empleados comercialmente como elementos para control biológico. La aplicación tópica sobre huevos de menos de 24 horas de edad a las dosis de 30 y 60 ppm no produjo ningún efecto sobre el porcentaje de eclosión de

los huevos ni sobre el posterior desarrollo de larvas y ninfas. Asimismo, no se detectó ningún efecto en la supervivencia de adultos tratados tópicamente ni en su fecundidad. La evaluación del efecto residual de la azadiractina tampoco mostró efectos negativos en *P. persimilis*, aunque sí se produjo una reducción significativa en el número de huevos puestos por hembra para *A. cucumeris* a la dosis de 60 ppm. Por su parte, Stark (1992) evaluó el efecto de la aplicación de azadiractina sobre la fauna de invertebrados habitantes de césped, obteniéndose una reducción de 1,5 veces en el número de ácaros oribátidos respecto a las parcelas control, mientras que no se detectó ningún efecto sobre la fauna de ácaros no oribátidos. Sin embargo, Sundaram et al. (1995) observaron control de poblaciones de *Tetranychus urticae* Koch (Prostigmata: Tetranychidae) en *Populus tremuloides* Michx. (Salicaceae) durante 30 días por aplicación en el suelo alrededor del sistema radicular de una formulación comercial que contenía azadiractina. El compuesto se absorbía a través de las raíces en las 3 horas siguientes a la aplicación y era traslocado hacia el tallo y el follaje durante 3 días, alcanzando las concentraciones más altas a los 10 días. Este resultado concuerda con el efecto repelente de los extractos hidrofílicos de semillas y frutos del árbol de Neem indicado por Schauer y Schmutterer (1981) sobre *T. urticae*. Estos autores encontraron además altas mortalidades y retardo en el desarrollo postembrionario tras la aplicación tópica de dichos extractos sobre huevos de 24 horas de edad, aunque precisaron dosis de 100.000 ppm para conseguir este efecto. El efecto de retraso en el desarrollo en *T. urticae* es similar al obtenido en el presente trabajo para *T. putrescentiae* a las dosis de 1.000 y 10.000 ppm y es posible que un aumento en la dosis hubiera influido asimismo en la supervivencia de los estados juveniles de este ácaro. Sin embargo, no se ensayaron dosis mayores por ser excesivamente altas para su uso práctico.

6. 3. 2. Hexaflumurón

El efecto del hexaflumurón sólo pudo ser evaluado en el rango de dosis entre 10 y 1.000 ppm. A 10.000 ppm, la dieta aparentemente captaba humedad de la cámara de cría, tomando una textura esponjosa que imposibilitaba el desarrollo de las larvas. Éstas morían en 24 horas posiblemente debido a la pérdida masiva de fluidos corporales. A 1.000 ppm se obtuvo una mortalidad para los estados inmaduros de cerca del 16%, cifra superior a la encontrada para el resto de tratamientos, aunque dicho valor no fue significativamente diferente debido a la alta variabilidad encontrada entre réplicas. Esta dosis produjo además un retraso considerable en el desarrollo, sugiriendo efectos más

drásticos sobre la supervivencia y el desarrollo de haber sido posible el uso de dosis más altas.

Muy pocos estudios han evaluado el efecto de inhibidores de la síntesis de quitina en ácaros, no habiéndose encontrado ninguno que empleara entre ellos al hexaflumurón. Meazza et al. (1992) estudiaron el efecto de numerosas benzoil fenilureas que presentaban una sustitución en el grupo fenil consistente en un grupo alquil o alquencil con un radical trifluorometilo sobre *T. urticae*. Los tratamientos se realizaron tópicamente sobre huevos de menos de 24 horas de edad, obteniéndose para únicamente 5 de los productos ensayados una mortalidad superior al 95% a la dosis de 100 ppm. Por su parte, Abo-Taka (1990) evaluó el efecto por contacto residual de 5 plaguicidas sobre adultos de *Dermanyssus gallinae* (De Geer) (Mesostigmata: Dermanyssidae). Entre los productos empleados se encontraba una benzoilfenilurea, el clorfluazurón, que fue el que proporcionó mejores resultados al presentar CL50 de tan sólo 2,69 ppm. Este resultado es difícil de explicar, ya que el modo de acción de este tipo de compuestos sólo debería afectar en teoría a individuos inmaduros (Ishaaya, 1990). Respecto a ácaros astigmátidos, Downing et al. (1990) estudiaron el efecto residual de diflubenzurón y triflumurón sobre *D. farinae*. Los tratamientos se realizaron sobre larvas, ninfas y adultos, evaluando la evolución de una población inicial de 15 individuos en periodos de 30 y 90 días. A pesar de las altas dosis empleadas (entre 1.000 y 50.000 ppm), no se detectó menor número de individuos en las poblaciones tratadas respecto a la población control, e incluso en determinados tratamientos el número de ácaros final fue significativamente mayor. Estos resultados concuerdan razonablemente con la escasa actividad observada con el hexaflumurón sobre *T. putrescentiae*.

6. 3. 3. Spinosad

El efecto del spinosad ha sido demostrado en numerosos insectos plaga (Bret et al., 1997), pero su efectividad sobre ácaros aún no ha sido ampliamente evaluada. Se ha citado un gran efecto sobre diferentes estados de *T. urticae* aplicado tópicamente, habiéndose obtenido CL50 de tan solo 2,1 ppm (DowElanco, 1994). Por su parte, el efecto sobre el ácaro depredador *P. persimilis* fue considerado como "prácticamente no tóxico" al presentar una CL50 mayor de 200 ppm en tratamientos tópicos (Bret et al., 1997). Los resultados obtenidos sobre *T. putrescentiae* indicaron una actividad

prácticamente nula de este producto al haberse obtenido tan sólo ligeros retrasos en el desarrollo a la dosis más alta empleada en tratamientos por ingestión.

6. 3. 4. Piriproxifén

La ingestión de piriproxifén por parte de *T. putrescentiae* produjo resultados similares a los obtenidos por Czaja-Topinska et al. (1979) tras aplicar tópicamente diferentes análogos de la hormona juvenil sobre este ácaro. Estos autores emplearon dosis entre 1 y 100.000 ppm sobre huevos de distintas edades, sobre larvas, protoninfas y tritroninfas activas recién emergidas y sobre adultos recién emergidos. Entre los productos empleados se encontraban el kinopreno, metopreno e hidropreno, sustancias que se encuentran entre las primeras comercializadas de este tipo de productos y que fueron de las menos efectivas sobre *T. putrescentiae*. El efecto sobre los huevos estuvo relacionado con la edad de los mismos. Sólo los huevos de menos de 24 h de edad se vieron afectados, mientras que el resto sufrieron leves efectos y sólo a las dosis más altas. Las larvas emergentes de los huevos afectados no ingerían alimento y morían poco después. Los análogos de la hormona juvenil aplicados tópicamente sobre los estados inmaduros móviles no mostraron ningún efecto. Sólomente dos de ellos aplicados sobre tritroninfas a las dosis de 10.000 y 100.000 ppm produjeron un sensible alargamiento de este estado, observándose un efecto similar con otros análogos aplicados a huevos de menos de 24 horas de edad. Este hecho concuerda con los efectos aquí obtenidos para el piriproxifén aplicado por ingestión a las dosis de 1.000 y 10.000 ppm, aunque a esta última dosis la mortalidad sí se incrementó en gran medida respecto a la población control.

Algunos de los compuestos seleccionados por Czaja-Topinska et al. (1979) en los experimentos con estados juveniles también demostraron actividad sobre los adultos a dosis de 10.000 ppm, observándose un incremento en la mortalidad de ambos sexos, una disminución en la fecundidad de las hembras tratadas y una tasa de supervivencia reducida durante el desarrollo postembrional de la descendencia. Sin embargo, ninguno de estos efectos fue observado en el presente trabajo con el piriproxifén, aunque sí se apreció un efecto en el número medio de huevos puestos por hembra y día debido a un acortamiento del periodo de oviposición. Por otra parte, la mortalidad registrada por estos autores sobre los adultos de *T. putrescentiae* hace pensar que el mecanismo de acción de los productos empleados no está relacionado con su actividad como análogos de la

hormona juvenil y sí con algún otro tipo de efecto tóxico. Muy pocos estudios acerca de la acción de este tipo de sustancias sobre insectos han registrado mortalidad en el estado adulto (Cogburn, 1988; Letellier et al., 1995).

La baja actividad de los análogos de la hormona juvenil sobre ácaros astigmátidos ha sido también observada por otros autores. Downing et al. (1990) evaluaron el efecto residual del metopreno, hidropreno y fenoxycarb sobre *D. farinae* empleando la misma metodología descrita para el diflubenzurón y el triflumurón (ver apartado 6.3.2.). Estos autores sólo observaron reducción de las poblaciones tratadas respecto a las controles por encima de las 5.000 ppm para el metopreno en los ensayos a 30 días y partiendo de estados juveniles. Para los otros dos compuestos las dosis necesarias para obtener efectos significativos fueron incluso mayores. Cuando el experimento se prolongó a 90 días la dosis necesaria para que el metopreno fuera efectivo se incrementó a las 50.000 ppm, no observándose efecto para hidropreno y fenoxycarb.

Los resultados del efecto de análogos de la hormona juvenil sobre ácaros astigmátidos contrastan con los encontrados sobre diferentes ácaros de la familia Ixodidae (orden Ixodida). Concretamente el piriproxifén ha demostrado ser muy efectivo sobre diferentes especies de garrapatas tales como *Amblyomma americanum* (L.) (Teel et al., 1996; Donahue et al., 1997) o *Ixodes scapularis* (Say) y *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Ross et al., 1997), produciendo inhibición de la eclosión de los huevos, reduciendo la supervivencia de larvas y ninfas y disminuyendo la capacidad reproductora de los adultos.

6.3.5. Halofenocida

Como se ha comentado previamente, poco se conoce acerca de los factores que regulan los procesos de metamorfosis en los ácaros, habiéndose descubierto recientemente y por primera vez la presencia de un ecdisteroide endógeno, la 2-deoxiecdisona, en *T. putrescentiae* (Sakagami et al, 1992). La 2-deoxiecdisona es un precursor de la ecdisona y ésta a su vez de la 20-hidroxiectdisona, de forma que estos ecdisteroides podrían encontrarse en pequeñas cantidades en este ácaro. Estas sustancias actúan como hormonas controlando la muda en insectos y se cree que en ácaros también están implicadas en el inicio y control de dicho proceso (Evans, 1992). Además, los ecdisteroides no sólo regulan el crecimiento y desarrollo en insectos sino

que también intervienen en diversos procesos reproductores de estos organismos tales como el control de la vitelogénesis (Hagedorn, 1985) o la regulación de la maduración de los órganos reproductores (Dhadialla et al., 1998). En este sentido, los resultados encontrados tras la aplicación del halofenocida sobre *T. putrescentiae* concuerdan con los conocimientos existentes acerca de la función de los ecdisteroides en insectos, aunque algunos de los efectos obtenidos en este ácaro plantean dudas acerca de si realmente los mecanismos propuestos para insectos tienen lugar también en *T. putrescentiae*.

Los análogos de la hormona de la muda como el halofenocida provocan en insectos la muerte de los estados larvarios debido a la inducción de mudas precoces letales (Dhadialla et al., 1998). En diversos insectos en los que no se obtuvo un 100% de mortalidad en la población tratada, los individuos supervivientes se desarrollaron de manera similar a los organismos control (Farinós et al., 1999) o incluso experimentaron aceleraciones del desarrollo (Monthéan y Potter, 1992; Cowles y Villani, 1996). Sin embargo, en el caso de *T. putrescentiae*, los individuos supervivientes al tratamiento a 1.000 ppm sufrieron retrasos en el desarrollo antes de alcanzar el estado adulto, hecho éste que se produjo tras de haber cubierto con éxito tres mudas. Este resultado es difícil de explicar atendiendo al modo de acción de este tipo de compuestos. Una posible explicación se basaría en uno de los efectos asociados producidos por estas sustancias. En insectos tratados con análogos de la hormona de la muda, previamente a la inducción de este proceso, las larvas afectadas dejan de comer muriendo posteriormente al ser la muda anormal (Wing et al., 1988; Oberlander et al., 1995; Dhadialla et al., 1998). El cese de la actividad alimentaria es un proceso normal de preparación para la muda (Oberlander et al., 1995) habiéndose observado reducción de peso en larvas de lepidópteros tratadas con este tipo de compuestos (Silhacek et al., 1990; Monthéan y Potter, 1992; Smaghe y Degheele, 1992). En el caso de *T. putrescentiae*, síntomas similares pudieron observarse en los estados de desarrollo alimentados sobre dieta tratada con halofenocida. Obviamente los individuos no pudieron ser pesados, pero presentaban un aspecto general arrugado y un menor volumen del cuerpo en relación a los ácaros control, lo que era indicativo de una reducción considerable de peso. Además, la evolución de la mortalidad respecto al tiempo para las larvas tratadas a 10.000 ppm fue muy similar al mostrado por las larvas de este ácaro cuando se disponen en condiciones de ayuno continuo, sugiriendo que la causa de la muerte a esta dosis estuvo más relacionada con interferencias con la alimentación que con efectos sobre la muda. El

efecto observado a 1.000 ppm pudo estar, por tanto, relacionado, asimismo, con este hecho, prolongándose el periodo de desarrollo debido a la reducción en la actividad alimentaria. Sin embargo, resulta difícil comprender que se produzca este efecto a causa de la actuación del halofenocida sin que se observen efectos sobre la muda de los organismos tratados.

Por otra parte, entre los efectos descritos de los análogos de la hormona de la muda sobre los procesos reproductores en insectos se encuentra la disminución de la fecundidad de los adultos tratados (Wing et al., 1988; Monthean y Potter, 1992; Smaghe y Degheele, 1994). Este fenómeno también fue observado en *T. putrescentiae*, sufriendo una drástica reducción de su capacidad reproductora a medida que se incrementó la dosis aplicada de halofenocida. Sin embargo, este efecto se vio acompañado a su vez de un incremento en la mortalidad de los adultos de este ácaro, fenómeno que no parece corresponder con el modo de acción de este tipo de compuestos. Aunque los síntomas mostrados por los adultos de *T. putrescentiae* fueron similares a los observados en los estados juveniles, no existen pruebas en la literatura científica de que el efecto inhibitor de la alimentación que se produce en insectos en desarrollo al aplicar análogos de la hormona de la muda se produzca a su vez en los adultos. Por ello, el efecto observado del halofenocida sobre los adultos podría ser indicativo de algún tipo de efecto tóxico diferente del mecanismo de acción establecido para este tipo de sustancias sobre insectos.

En cualquier caso, el halofenocida fue el compuesto que presentó una mayor efectividad de cara al control de las poblaciones de *T. putrescentiae*, por encima incluso del clorpirifos, insecticida organofosforado que ha demostrado su efectividad para el control de ácaros de productos almacenados (Wilkin y Hope, 1973; Zdarkova, 1994). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los plaguicidas organofosforados son más efectivos en tratamientos por contacto respecto a los tratamientos por ingestión, habiéndose mostrado muy eficaces sobre ácaros astigmátidos por medio de ese tipo de aplicaciones (Zdarkova y Horak, 1973; Wilkin y Hope, 1973; Wilkin, 1979; Stables, 1984; Zdarkova, 1994).

EFFECTO DE LA INGESTIÓN DE INHIBIDORES DE PROTEASAS Y LECTINAS SOBRE *T. putrescentiae*

7. 1. INTRODUCCIÓN

La alteración de los procesos digestivos de las especies de insectos plaga a través de la creación de plantas transgénicas supone una nueva e interesante metodología para el control de estos organismos. Entre las alternativas planteadas se encuentra la transferencia de genes que expresan inhibidores de proteasas digestivas (ver revisión de Reeck et al., 1997) y la de genes que expresan lectinas (Czapla, 1997). Previamente a la aplicación de esta técnica resulta necesario seleccionar aquellos inhibidores y lectinas que demuestren tener un efecto negativo sobre el desarrollo de los organismos a combatir. Los inhibidores presentan una alta especificidad respecto al tipo de enzimas sobre las que son capaces de actuar (Reesck et al., 1997), existiendo además una amplia variabilidad de proteasas digestivas en insectos (Wolfson y Murdock, 1990). Por ello es necesario conocer *a priori* las proteasas presentes en el tubo digestivo de cada especie con el fin de seleccionar los inhibidores apropiados, determinando

posteriormente el efecto de la interacción entre ambos tipos de moléculas sobre la especie objeto del control. Esta circunstancia es igualmente aplicable para el caso de las lectinas.

En general, el conocimiento acerca de los componentes bioquímicos implicados en los procesos digestivos en ácaros es bastante más limitado que el existente para los insectos, no habiéndose realizado ningún intento por determinar la posible aplicación de estas técnicas para el control de este tipo de organismos. Por ello se planteó estudiar el efecto *in vivo* de diferentes inhibidores de proteasas y lectinas sobre el desarrollo y supervivencia de los estados inmaduros de *T. putrescentiae*.

Para ello se partió de un estudio realizado por Ortego et al. (2000), acerca de la caracterización de las actividades proteolíticas de esta especie de ácaro y la evaluación *in vitro* del efecto de distintos inhibidores de proteasas sobre la actividad de las enzimas caracterizadas. En dicho trabajo se detectó la presencia de actividad proteolítica basada en enzimas del tipo tripsina y quimotripsina (serín proteinasas), catepsina D (aspartil proteinasas), catepsina B (cisteín proteinasas), leucina aminopeptidasa (aminopeptidasas) y carboxipeptidasas A y B (carboxipeptidasas).

En los Astigmata, la digestión es tanto extracelular como intracelular, ocurriendo esta última en células epiteliales derivadas de la pared del tubo digestivo que flotan libremente en el lumen del mismo (Evans, 1992). Estas células ingieren las partículas alimenticias para posteriormente digerirlas. Según progresa el alimento procesado junto con dichas células hacia la parte posterior del tubo digestivo medio, todo el conjunto queda envuelto en una membrana peritrófica para ser finalmente compactado en el tubo digestivo posterior antes de ser excretado en forma de "bolitas" fecales (Brody et al., 1972). Por tanto, las proteasas digestivas son endoperitróficas, esto es, envueltas por una membrana peritrófica o adheridas a ella, de forma que durante la digestión son concentradas dentro de las bolitas fecales dando lugar a una actividad proteolítica mayor en las heces respecto a la encontrada en el cuerpo completo (Stewart et al., 1992 y 1994).

Ortego et al. (2000) detectaron mayor actividad proteolítica (> 50 veces) del tipo tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa A y carboxipeptidasa B en las heces de este ácaro respecto a los extractos de cuerpos completos, considerando que este complejo

enzimático era el principal responsable de la degradación enzimática de las proteínas durante el proceso digestivo. Asimismo detectaron actividad del tipo catepsina B y aminopeptidasas sólo 3 veces mayor en las heces respecto a los cuerpos completos, aunque indicaban que al no emplear detergentes en el proceso de extracción era posible que se estuviera subestimando la contribución de enzimas ligadas a membrana. En este sentido, está bien establecido que las aminopeptidasas se encuentran unidas a las paredes del sistema digestivo en la mayoría de las especies de insectos (Terra et al., 1996), pudiendo tener una localización similar en los ácaros. Por su parte, la actividad catepsina D sólo fue localizada en los extractos de cuerpos de *T. putrescentiae*, lo que indica que este tipo de enzimas no actúa como proteasa digestiva en esta especie.

A partir de esta información se emplearon los siguientes inhibidores de proteasas para la realización de los ensayos *in vivo*: STI, LBI, SBBI, TEI y CEOM, inhibidores de serín proteinasas; E-64, inhibidor de cisteín proteinasas; pepstatina-A, inhibidor de aspartil proteinasas; bestatina, inhibidor de aminopeptidasas; y PCPI, inhibidor de carboxipeptidasas.

Por otra parte, y con el fin de establecer comparaciones entre el efecto de los inhibidores de proteasas sobre especies de ácaros astigmátidos con diferentes espectros alimenticios, se realizaron experimentos sobre dos especies de ácaros oligófagos, *D. pteronyssinus* y *D. farinae*, representantes de los denominados ácaros del polvo. La mayor plasticidad enzimática de *T. putrescentiae* (Smrz y Catská, 1987) hace pensar que el efecto de los inhibidores en estas dos especies de ácaros de la familia Pyroglyphidae sea más severo que el que se detecte sobre este representante de la familia Acaridae.

7. 2. RESULTADOS

7. 2. 1. Efecto de inhibidores de proteasas digestivas sobre *T. putrescentiae*

El desarrollo de los estados juveniles de *T. putrescentiae*, desde larva hasta adulto, alimentados sobre dieta tratada con un 1% en peso de los distintos inhibidores considerados se muestra en la Tabla 7. 1. Menos de un 5% de mortalidad fue registrado en todos los tratamientos, no detectándose diferencias significativas entre ninguno de ellos ($K = 17,1$; $P > 0,5$). La alimentación sobre dieta que contenía un 1% en peso de STI, LBI y SBBI incrementó significativamente el periodo de desarrollo desde larva hasta

Tabla 7. 1. Efecto de diferentes inhibidores de proteasas, solos o en mezcla, sobre el periodo de desarrollo (días \pm ES) desde larva hasta adulto de *T. putrescentiae*

Tratamiento	Dosis (% en peso)	Duración
Control (albúmina)	1	5,6 \pm 0,1
STI	1	6,4 \pm 0,1 *
LBI	1	6,4 \pm 0,1 *
SBBI	1	6,2 \pm 0,1 *
TEI	1	5,8 \pm 0,1
CEOM	1	5,6 \pm 0,1
E-64	1	5,6 \pm 0,1
Pepstatina-A	1	5,5 \pm 0,1
Bestatina	1	5,8 \pm 0,1
PCPI	1	5,7 \pm 0,1
STI/SBBI	0,5/0,5	6,4 \pm 0,1 *
STI/LBI	0,5/0,5	6,5 \pm 0,1 *
SBBI/LBI	0,5/0,5	6,2 \pm 0,1 *
STI/SBBI/LBI	0,3/0,3/0,3	6,6 \pm 0,1 *,**
STI/E-64	0,5/0,5	6,2 \pm 0,1 *
STI/Pepstatina-A	0,5/0,5	6,0 \pm 0,1 *
STI/Bestatina	0,5/0,5	6,5 \pm 0,1 *,**
STI/PCPI	0,5/0,5	6,7 \pm 0,1 *,**
Bestatina/PCPI	0,5/0,5	6,0 \pm 0,1 *,**
STI/PCPI/Bestatina	0,3/0,3/0,3	6,6 \pm 0,1 *,**

* Diferencias significativas respecto al control ($P < 0,05$; ANOVA encajado seguido de prueba de Dunnet de dos colas).

** Diferencias significativas de las mezclas respecto a los componentes por separado ($P < 0,05$; contraste de grupo de medias).

(n inicial = 50 larvas por inhibidor o grupo de inhibidores)

adulto, mientras que las larvas alimentadas con dieta tratada con un 1% en peso de TEI, CEOM, E-64, pepstatina-A, bestatina y PCPI presentaron periodos de desarrollo similares a los del grupo control. El efecto de diferentes mezclas de los inhibidores de proteasas

también fue determinado (Tabla 7. 1.). Se comparó el efecto de las mezclas con respecto al grupo control y con respecto a los efectos de los componentes cuando se administraron separadamente. Todas las mezclas ensayadas retrasaron de forma significativa el desarrollo de los ácaros con respecto al grupo control. La mezcla de los 3 inhibidores de serín proteinasas (STI/SBBI/LBI), la mezcla de STI con el inhibidor de aminopeptidasas bestatina, con el inhibidor de carboxipeptidasas PCPI, o con ambos, y la mezcla de bestatina y PCPI produjeron un incremento significativo del periodo de desarrollo comparado con el grupo de medias de los componentes por separado de cada mezcla.

7. 2. 2. Efecto de lectinas sobre *T. putrescentiae*

La adición de las lectinas VSA, LEA, WGA, Con-A, DBA, y la de las mezclas VSA/LEA y WGA/Con-A a una dosis de un 1% en peso de dieta no tuvo ningún efecto sobre el desarrollo de los estados inmaduros ($F = 2,7$; $P > 0,05$) ni sobre la mortalidad de los mismos ($K = 1,2$; $P > 0,9$). Cuando cada lectina fue mezclada con STI a la dosis 0,5/0,5 respecto al peso de la escama, el efecto sobre el desarrollo de los ácaros fue igual al promedio de las medias agrupadas de sus componentes por separado ($P > 0,05$; contraste de grupo de medias).

7. 2. 3. Efecto de inhibidores de proteasas digestivas en dos especies de ácaros oligófagos, *Dermatophagoides pteronyssinus* y *D. farinae*

Pernas et al. (en prensa) detectaron *in vitro* elevados niveles de inhibición de la actividad proteasa por parte del inhibidor de cisteín proteinasas E-64 sobre extractos de *D. pteronyssinus* y *D. farinae*. Dichos autores, sin embargo, registraron una débil inhibición por parte del inhibidor de serín proteinasas SBBI sobre ambas especies de ácaros. A partir de estas observaciones se realizaron experimentos *in vivo* con el fin de determinar el efecto diferencial sobre la mortalidad y el desarrollo de los estados juveniles de estas especies de ácaros tras la adición sobre la dieta de los citados inhibidores.

El efecto de los inhibidores seleccionados sobre la mortalidad de los ácaros del polvo citados estuvo en consonancia con los resultados de inhibición obtenidos *in vitro* (Tabla 7. 2.). El E-64 produjo un 100% de mortalidad para el estado de larva en ambas especies. Este valor fue significativamente más alto que los porcentajes de mortalidad

encontrados para los otros dos tratamientos. La mortalidad registrada para el SBBI y para el control fue del 23% para *D. farinae*, y del 30% y 23%, respectivamente, para *D. pteronyssinus*, no existiendo diferencias significativas entre los dos tratamientos en ninguna de las dos especies.

Por su parte, el periodo de desarrollo desde huevo hasta protoninfa fue significativamente mayor en la población sometida al tratamiento con SBBI respecto al control para ambas especies (Tabla 7. 2.). La magnitud de dicho incremento fue de un 2,4% respecto al control para *D. farinae* y de un 6,5% para *D. pteronyssinus*. Como era de esperar, la duración del estado de huevo no fue significativamente diferente entre tratamientos (Tabla 7. 2.) por lo que las diferencias detectadas en el citado periodo de desarrollo desde huevo hasta protoninfa son atribuibles al efecto de la ingestión de SBBI por parte de las larvas de *D. farinae* y *D. pteronyssinus*.

Tabla 7. 2. Efecto de dos inhibidores de proteasas sobre la duración del estado de huevo y del periodo de desarrollo desde huevo hasta protoninfa (días ± ES), y sobre el porcentaje de mortalidad (media ± ES) de larvas de *D. farinae* y *D. pteronyssinus*

Tratamiento	<i>D. farinae</i>			<i>D. pteronyssinus</i>		
	Huevo	Huevo-Prot.	% Mort. Larva	Huevo	Huevo-Prot.	% Mort. Larva
Control	11,2 ± 0,1 a (97)	29,3 ± 0,3 a (75)	23,7 ± 7,1 a (75)	7,7 ± 0,1 a (88)	18,4 ± 0,3 a (68)	23,2 ± 7,2 a (68)
SBBI	11,2 ± 0,1 a (91)	30,0 ± 0,3 b (69)	22,9 ± 4,5 a (69)	7,8 ± 0,1 a (95)	19,6 ± 0,3 b (67)	29,6 ± 6,9 a (67)
E-64	11,2 ± 0,1 a (95)	-	100 ± 0,0 b (95)	7,7 ± 0,1 a (98)	-	100 ± 0,0 b (98)

Los valores seguidos de letras distintas dentro de una misma columna presentan diferencias significativas (P < 0,05; ANOVA encajado en el caso de las columnas de duración y prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba de Dunn en el caso de las columnas de mortalidad). Debajo de cada valor, entre paréntesis, se indica el tamaño muestral.

7. 3. DISCUSIÓN

7. 3. 1. Efecto de inhibidores de proteasas digestivas y lectinas sobre *T. putrescentiae*

Diversos inhibidores de proteasas de diferente especificidad fueron ensayados *in vivo* para establecer su potencial como agentes de control de *T. putrescentiae*. Los resultados obtenidos en estos ensayos se ajustaron a los obtenidos *in vitro* por Ortego et al. (2000). El desarrollo sufrió un retraso significativo en larvas alimentadas con levadura de cerveza que contenía inhibidores de serín proteinasas, mientras que no se detectó ningún efecto en los tratamientos con inhibidores de cisteín y aspartil proteinasas, ni en los que presentaban inhibidores de carboxi y aminopeptidasas. La ausencia de efecto de inhibidores de carboxipeptidasas y aminopeptidasas añadidos a la dieta por separado se explica por el tipo de actividad de este tipo de enzimas. Su actuación produce la liberación de los aminoácidos de las cadenas peptídicas al hidrolizar los enlaces peptídicos de los aminoácidos terminales (Terra et al., 1996), de forma que al inhibirse únicamente uno de los tipos enzimáticos el otro continúa el proceso con normalidad. Sin embargo, cuando se aplican mezclas de inhibidores de este tipo de enzimas, su acción complementaria produce un efecto sinérgico retrasando el desarrollo de los estados inmaduros de *T. putrescentiae*. El mismo efecto se produce al alimentar este ácaro con dieta tratada con mezclas de inhibidores de serín proteinasas, y con mezclas de los tres tipos de inhibidores, lo que es debido igualmente a su efecto complementario. Resultados similares a estos han sido obtenidos al ensayar inhibidores de proteasas que actúan sobre diferentes tipos enzimáticos en insectos. Así, Oppert et al. (1993) observaron que la mezcla de inhibidores de serín y cisteínproteinasas en la dieta producía toxicidad sinérgica en larvas de *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). Por su parte Ortego et al. (1998), registraron tasas de mortalidad de cerca del 90% en larvas de *Aubeonymus mariaefranciscae* Roudier (Coleoptera: Curculionidae) que habían sido alimentadas con dieta que contenía mezclas de varios inhibidores, valor superior al 70% obtenido al aplicar los inhibidores por separado.

Aunque los resultados aquí mostrados fueron estadísticamente significativos, el retraso producido no fue en ningún caso superior al 20% respecto al tiempo empleado por los ácaros alimentados sobre dieta enriquecida con albúmina, siendo además la mortalidad muy baja en todos los tratamientos. Es necesario, por tanto, identificar

inhibidores más efectivos antes de poder emplear esta metodología para el control de estos organismos.

Las lectinas de origen vegetal han mostrado también un papel importante en la defensa de las plantas frente a insectos (Czapla, 1997). Sin embargo, resalta el hecho de que, a pesar de la marcada diferencia en especificidad de las lectinas ensayadas frente a *T. putrescentiae*, ninguna de ellas tuvo efecto alguno sobre este ácaro, no detectándose tampoco efectos sinérgicos cuando se aplicaron mezclas de lectinas, ni combinaciones de éstas con inhibidores de proteasas.

7. 3. 2. Comparación del efecto de inhibidores de proteasas digestivas en *T. putrescentiae* y en *D. pteronyssinus* y *D. farinae*

Los resultados obtenidos en *T. putrescentiae* con un amplio rango de inhibidores contrasta con los que se produjeron para las dos especies de ácaros del polvo. Como se acaba de indicar, el efecto de los inhibidores sobre *T. putrescentiae* fue muy leve, afectando únicamente a la velocidad de desarrollo de los estados juveniles. Sin embargo, en el caso de *D. pteronyssinus* y *D. farinae*, la totalidad de las larvas sometidas al tratamiento con el inhibidor de cisteín proteinasas E-64 fueron incapaces de completar su desarrollo hasta el estado de protoninfa. Por su parte el inhibidor de serín proteinasas SBBI no tuvo ningún efecto sobre la mortalidad, produciendo tan solo un ligero incremento en el periodo de desarrollo de las larvas de ambas especies.

Bowman (1984) indicó que el espectro de enzimas digestivas de los ácaros astigmátidos es un reflejo de sus especializaciones tróficas. En este sentido, las cisteín proteinasas detectadas en los ácaros del polvo (Stewart et al., 1991 y 1992), parecen haber evolucionado para hidrolizar proteínas de la piel, colágeno y queratina (Stewart, 1995), ya que estas especies se alimentan del material epidérmico desprendido de animales (Hughes, 1976; Hallas, 1991). Las cisteín proteinasas no se han encontrado en ácaros astigmátidos de productos almacenados (Pernas et al., 1998; Ortego et al., 2000). Sin embargo, en los ácaros del polvo sí existen otros tipos de proteasas tales como serín proteasas (Stewart et al., 1991 y 1994) que aparecen en mayores concentraciones en las bolitas fecales respecto a extractos de cuerpos, lo que indica su implicación en procesos digestivos. No obstante, la importancia relativa de estas enzimas en la digestión proteica parece ser menor según los resultados obtenidos en el presente trabajo. La

especialización trófica desarrollada por los ácaros del polvo parece haber desembocado en una mayor susceptibilidad a determinados inhibidores de sus enzimas digestivas en relación a lo observado para *T. putrescentiae*. Por su parte, el amplio espectro alimenticio mostrado por esta especie (Hughes, 1976; Pankiewicz-Nowicka y Boczek, 1984; Walter et al., 1986) ha sido considerado como indicativo de una gran plasticidad enzimática (Smrz y Catská, 1987), lo que podría explicar el escaso efecto encontrado tras la ingestión de los inhibidores aplicados.

8. CONCLUSIONES

1. La temperatura tiene una gran influencia en la supervivencia y velocidad de desarrollo de los estados inmaduros de *T. putrescentiae*. El estado de larva es el más susceptible a las condiciones extremas de temperatura, presentando los mayores porcentajes de mortalidad. La duración del desarrollo desde huevo hasta adulto se prolonga más de 100 días a 10°C, reduciéndose a poco más de una semana a 30°C. Dicha duración es ligeramente más larga para las hembras en relación a los machos.
2. De los diferentes modelos de desarrollo aplicados para predecir el desarrollo de los estados inmaduros de este ácaro respecto a la temperatura, los modelos no lineales de Lactin y Logan III proporcionan los mejores resultados. Los umbrales térmicos predichos por estos modelos para el periodo de desarrollo total oscilan entre 5,0 y 6,8 °C, para el umbral inferior y entre 36,1 y 36,3 °C, para el superior. La temperatura óptima de desarrollo predicha se sitúa alrededor de los 30°C.
3. Las temperaturas extremas aumentan el periodo de preoviposición y disminuyen el número de huevos puestos por hembra. Por su parte, el periodo de oviposición se incrementa linealmente a medida que la temperatura disminuye. Dentro de la gama de temperaturas favorables la capacidad reproductora de este ácaro es muy alta, siendo capaz de poner entre 15 y 25 huevos diariamente. La probabilidad de supervivencia es mayor para los machos respecto a las hembras, presentando patrones diferentes tanto en relación al tiempo como a la temperatura.
4. El modelo de Lactin proporciona una excelente descripción del desarrollo de las poblaciones de *T. putrescentiae* a temperaturas constantes. Los límites de desarrollo estimados en relación a la temperatura son de 10,4°C y 34,8°C. La temperatura óptima de desarrollo es de 29,5°C. A esta temperatura el tiempo de duplicación de la población es de tan solo 1,8 días, lo que ilustra la enorme capacidad multiplicativa de este ácaro y su potencial como plaga.

5. La humedad relativa presenta, asimismo, una gran influencia en la biología de *T. putrescentiae*. El desarrollo no se produce a 70% HR y a 80% HR sufre un retraso considerable respecto a las condiciones óptimas. El estado de larva es el más vulnerable frente a los cambios en las condiciones de humedad relativa, debido a su mayor susceptibilidad a procesos de desecación derivada de su elevada relación superficie/volumen.
6. La capacidad reproductora y la supervivencia de los adultos también se ve afectada en gran medida por las variaciones de humedad relativa. La longevidad de machos y hembras sufre un cambio de patrón a medida que este factor disminuye debido nuevamente a la influencia del tamaño en la susceptibilidad a los procesos de desecación. La fecundidad se reduce considerablemente a 80% HR, con tan solo 6 huevos por hembra y día frente a los 24 huevos a 90% HR. Estos factores producen una sensible disminución de la capacidad multiplicativa de las poblaciones de *T. putrescentiae* a 80% HR.
7. Siete monoterpenos componentes de aceites esenciales de plantas han demostrado alta actividad acaricida por fumigación sobre *T. putrescentiae*. Los compuestos más efectivos son pulegona, mentona, linalol y fenchona, con CL50 para las hembras inferiores a los 14 μ l/l de aire. Los machos y las larvas de este ácaro son más susceptibles a la actuación de estos compuestos, presentando porcentajes de mortalidad cercanos al 100% a las CL50 calculadas para las hembras. Sin embargo, no se ha observado efecto ovicida por fumigación con los monoterpenos. El modo de acción de estas sustancias parece estar relacionado con procesos de deshidratación.
8. La aplicación por ingestión de azadiractina, hexaflumurón, piriproxifén, halofenocida y spinosad no produce ningún efecto sobre los estados de desarrollo de *T. putrescentiae* a las dosis de 10 y 100 ppm. A partir de 1.000 ppm se produce un alargamiento del desarrollo en todos los casos y a 10.000 ppm sólo halofenocida y piriproxifén producen una mortalidad cercana al 100%.
9. El piriproxifén no afecta a la fecundidad ni a la supervivencia de los adultos mientras que el halofenocida reduce drásticamente el número de huevos producidos por hembra a las dosis de 1.000 y 10.000 ppm. Asimismo este producto incrementa la

mortalidad de los adultos hasta valores cercanos al 80% respecto a la población control.

10. La baja actividad acaricida observada para los plaguicidas ensayados induce a desestimar estos compuestos como alternativa para el control de *T. putrescentiae*.
11. Las larvas alimentadas desde su emergencia hasta el estado adulto sobre dieta que contiene diversos inhibidores de proteasas y/o lectinas no ven afectada su supervivencia, sufriendo tan sólo retrasos en el desarrollo por el efecto de los inhibidores de serín proteinasas STI, SBBI y LBI. La mezcla de estos tres inhibidores, la de STI con inhibidores de amino y carboxipeptidasas y la de estos dos últimos producen mayores incrementos en la duración del desarrollo, sugiriendo un efecto sinérgico de los inhibidores.
12. La alimentación de larvas de *D. farinae* y *D. pteronyssinus* sobre dieta tratada con el inhibidor de cisteín proteinasas E-64 produce un 100% de mortalidad de los estados de desarrollo de estos ácaros. Este resultado contrasta con el obtenido para *T. putrescentiae* e indica que el carácter polífago de esta especie, y en consecuencia su mayor plasticidad enzimática, le hace ser menos susceptible al efecto de los inhibidores de proteasas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, W. S. 1987. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 3 (2): 302-303.
- Abdel-Sater, M. A.; S. K. Hemida; S. A. Eraky y M. N. Nasser. 1995. Distribution of fungi on two mite species and their habitats in Egypt. *Folia Microbiologica*, 40 (3): 304-313.
- Abo-Taka, S. M. 1990. Toxicity of certain pesticides against the chicken mite, *Dermanyssus gallinae*. *Med Vet Entomol. Oxford : Blackwell Scientific Publications. Jan*, 4: 125-126.
- Adler, C. 1998. What is integrated stored product protection? *IOBC/WPRS Bulletin: Integrated Protection of Stored Products*, 21 (3): 1-8.
- Allsopp, P. G. y T. K. McGhie. 1996. Snowdrop and wheatgerm lectins and avidin as antimetabolites for the control of sugarcane whitegrubs. *Entomol. Exp. Appl.*, 80: 409-414.
- Andrewartha, H. G. y L. C. Birch. 1954. *The distribution and abundance of animals*. Univ. of Chicago, Chicago.
- Arbogast, R. T. 1984. Biological control of stored-product insects: status and prospects, En: *Insect Management for Food Storage and Processing*. Baur, F. J. (eds.). AACC, St Paul, Minnesota. Pp. 226-238.
- Arias-Reverón, J. M. y H. W. Browning. 1995. Development and mortality of the citrus snow scale (Homoptera: Diaspididae) under constant temperatures and relative humidity. *Environmental Entomology*, 24 (5): 1189-1195.
- Arlan, L. G. y G. W. Wharton. 1974. Kinetics of active and passive components of water exchange between the air and a mite, *Dermatophagoides farinae*. *Journal of Insect Physiology*, 20: 1063-1077.
- Arlan, L. G.; C. M. Rapp y S. G. Ahmed. 1990. Development of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *Journal of Medical Entomology*, 27 (6): 1035-1040.
- Arlan, L. G. 1992. Water balance and humidity requirements of house dust mites. *Experimental and Applied Acarology*, 16: 15-35.
- Arlan, L. G. y J. S. Dippold. 1996. Development and fecundity of *Dermatophagoides farinae* (Acari: Pyroglyphidae). *Journal of Medical Entomology*, 33 (2): 257-260.

- Armentia, A.; A. Fernandez; C. Pérez-Santos; R. de la Fuente; D. Sánchez; F. Sanchís; J. Méndez y R. Stolle. 1994. Occupational allergy to mites in salty ham, chorizo and cheese. *Allergologia et Immunopathologia*, 22 (4): 152-154.
- Armitage, D. M. 1980. The effect of aeration on the development of mite populations in rapeseed. *Journal of Stored Products Research*, 16: 93-102.
- Arnau, J.; M. Hugas y J. M. Monfort. 1987. *El jamón curado: Aspectos técnicos*. IRTA, Barcelona.
- Arnau, J. y I. Guerrero. 1994. Physical methods of controlling mites in dry-cured ham. *Fleischwirtsch*, 74: 1311-1313.
- Arnau, J. 1998. Principales problemas tecnológicos en la elaboración del jamón curado, En: *El Jamón Curado: Tecnología y Análisis de Consumo*. Arnau, J. y J. M. Monfort (eds.). Estrategías Alimentarias S. L.- Eurocarne, Barcelona. Pp. 71-86.
- Asmat, G. S. M. y A. Kader. 1990. A preliminary survey of mites from the nest of certain birds in the Chittagong university campus. *Bangladesh Journal of Zoology*, 18 (2): 177-183.
- Barker, P. S. 1967. The effects of high humidity and different temperatures on the biology of *Tyrophagus putrescentiae* (Acarina: Tyroglyphidae). *Canadian Journal of Zoology*, 45: 91-96.
- Beament, J. W. L. 1945. The cuticular lipoids of insects. *Journal of Experimental Biology*, 22: 115-131.
- Beament, J. W. L. 1958. The effect of temperature on the waterproofing mechanism of an insect. *Journal of Experimental Biology*, 35: 494-519.
- Beck, S. D. 1983. Insect thermoperiodism. *Annual Review of Entomology*, 28: 91-108.
- Benz, G. 1987. Integrated pest management in material protection, storage and food industry, En: *Protection intégrée: quo vadis? - "Parasitis 86"*. Delucchi, V. (eds.). Suiza. Pp. 31-69.
- Berreen, J. 1976. An analysis of feeding *Cheyletus eruditus* a predator of storage mites. *Annals of Applied Biology*, 82 (1): 190-192.
- Bilgrami, A. L. y Q. Tahseen. 1992. A nematode feeding mite, *Tyrophagus putrescentiae* (Sarcoptiformis: Acaridae). *Fundamental and Applied Nematology*, 15 (5): 477-478.
- Bilgrami, A. L. 1994. Predatory behaviour of a nematode feeding mite *Tyrophagus putrescentiae* (Sarcoptiformes: Acaridae). *Fundamental and Applied Nematology*, 17 (4): 293-297.
- Birch, L. C. 1948. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *Journal of Animal Ecology*, 17: 15-26.
- Blaney, W. M. y M. S. J. Simmonds. 1995. Insecta, Insects. Biological effects of neem and their modes of action. Feeding behavior, En: *The Neem Tree*. Schmutterer, H. (eds.). VHC, Weinheim. Pp. 171-176.

- Boczek, J. 1974. Reproduction biology of *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acarina: Acaridae), En: *Proc. I. Intern. Conf. Stor. Prod. Entomol.* (eds.). Savannah, GA., USA. Pp. 154-159.
- Bolaños, A. E.; C. Mendoza-Zamora y B. Resendiz-García. 1991. Identificación y control de ácaros contaminantes en cultivos de hongos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 9 (1): 14-15.
- Bowley, C. R. y C. H. Bell. 1981. The toxicity of twelve fumigants to three species of mites infesting grain. *Journal of Stored Products Research*, 17 (2): 83-87.
- Bowman, C. E. 1981. Hide protease in stored product mites (Astigmata: Acaridae). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 70 (4): 803-805.
- Bowman, C. E. 1984. Comparative enzymology of economically important astigmatid mites, En: *Acarology VI*. Griffiths, D. A. y B., C. E. (eds.). Ellis Horwood Limited, Chichester. England. Pp. 993-1001.
- Brady, J. 1970. The mites of poultry litter. Observations of the bionomics of common species with a species list for England and Wales. *Journal of Applied Ecology*, 7: 331-348.
- Bret, B. L.; L. L. Larson; J. R. Schoonover; T. C. Sparks y G. D. Thompson. 1997. Biological properties of spinosad. *Down to Earth*, 52 (1): 6-13.
- Briere, J.-F. y P. Pracros. 1998. Comparison of temperature-dependent growth models with the development of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology*, 27 (1): 94-101.
- Briere, J.-F.; P. Pracros; A.-Y. Le Roux y J.-S. Pierre. 1999. A novel rate model of temperature-dependent development for Arthropods. *Environmental Entomology*, 28 (1): 22-29.
- Broadway, R. M. y A. A. Colvin. 1992. Influence of cabbage proteinase inhibitors *in situ* on the growth of larval *Trichoplusia ni* and *Pieris rapae*. *J. Chem. Ecol.*, 18: 1009-1024.
- Brody, A. R.; J. C. McGrath y G. W. Wharton. 1972. *Dermatophagoides farinae*: The digestive system. *J. NY Entomol. Soc.*, 80: 152-177.
- Brust, G. E. y G. J. House. 1988. A study of *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae) as a facultative predator of southern corn rootworm eggs. *Experimental and Applied Acarology*, 4: 335-344.
- Burkholder, W. E. 1984. The use of pheromones and food attractants for monitoring and trapping stored-product insects, En: *Insect Management for Food Storage and Processing*. Baur, F. J. (eds.). AACC, St Paul, Minnesota. Pp. 70-86.
- Burrell, N. J. y S. J. Havers. 1976. The effects of cooling on mite infestations in bulk grain. *Annals of Applied Biology*, 82 (1): 192-197.
- Callaini, G. y M. Mazzini. 1984. Fine structure of the egg shell of *Tyrophagus putrescentiae*. *Acarologia*, 25 (4): 359-364.

- Carpenter, J. E. 1995. *Ichneumon promissorius* (Erichson) (Hymenoptera: Ichneumonidae): factors affecting fecundity, oviposition, and longevity. *Journal of Entomol. Sci.*, 30 (2): 279-286.
- Chmielewski, W. 1991. Stored products mites (Acaroidea) in Polish bee hives, En: *Modern Acarology*. Bukva, F. D. & V. (eds.). Academia, Prague. Pp. 615-619.
- Christeller, J. T.; W. A. Laing; N. P. Marwick y E. P. J. Burgess. 1992. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22: 735-746.
- Coats, J. R.; L. L. Karr y C. D. Drewes. 1991. Toxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids, En: *Naturally occurring pest biorregulators*. Heiden, P. A. (eds.). American Chemical Society, Washington D. C. Pp. 305-316.
- Coats, J. R. 1994. Risks from natural versus synthetic insecticides. *Annual Review of Entomology*, 39: 489-515.
- Cogburn, R. R. 1988. Fenoxycarb as a long-term protectant for stored rough rice. *Journal of Economic Entomology*, 81: 722-726.
- Colloff, M. J. 1991. Population studies on the house dust mite, *Euroglyphus maynei* (Cooreman 1950) (Pyroglyphidae), En: *The Acari. Reproduction, development and life-story strategies*. Schuster, R. (eds.). Chapman & Hall, Victoria. Pp. 497-506.
- Corpuz-Raros, L. A.; G. C. Sabio y M. Velasco-Soriano. 1998. Mites associated with stored products, poultry houses and house dust in the Philippines. *The Philippine Entomologist*, 7 (3): 311-321.
- Cowles, R. S. y M. G. Villani. 1996. Susceptibility of Japanese beetle, Oriental beetle, and European chafer (Coleoptera: Scarabaeidae) to halofenozide, an insect growth regulator. *Journal of Economic Entomology*, 89: 1556-1565.
- Cunnington, A. M. 1965. Physical limits for complete development of the grain mite, *Acarus siro* L. (Acarina, Acaridae), in relation to its world distribution. *Journal of Applied Ecology*, 2: 295-306.
- Cunnington, A. M. 1969. Physical limits for complete development of the copra mite, *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acarina: Acaridae), En: *Proc. 2nd. Int. Congr. Acarology*. Evans, G. O. (eds.). Akad. Kaidó, Budapest. Pp. 241-248.
- Cunnington, A. M. 1976. The effect of physical conditions on the development and increase of some important storage mites. *Annals of Applied Biology*, 82 (1): 175-178.
- Cunnington, A. M. 1985. Factors affecting oviposition and fecundity in the grain mite *Acarus siro* L. (Acarina: Acaridae), especially temperature and relative humidity. *Experimental and Applied Acarology*, 1: 327-344.
- Cusack, P. D.; G. O. Evans y P. A. Brennan. 1976. The origin and sources of mite infestation of stored grain and related products in the Republic of Ireland. *Annals of Applied Biology*, 82 (1): 178-179.

- Cutcher, J. 1973. The critical equilibrium activity of non-feeding *Tyrophagus putrescentiae*. *Annals of the Entomological Society of America*, 66 (3): 609-611.
- Cuthbert, O. D.; J. Brostoff; D. G. Wraith y W. D. Brighton. 1979. "Barn allergy": asthma and rhinitis due to storage mites. *Clinical Allergy*, 9: 229-236.
- Czaja-Topinska, J.; Z. Stepien y R. Sterzycki. 1979. The effect of some juvenile hormone analogues on *Tyrophagus putrescentiae*, En: *Recent Advances in Acarology*. Rodríguez, J. G. (eds.). Academic Press, New York. Pp. 231-241.
- Czajkowska, B. y D. Kropczynska. 1991. The influence of different host plants on the reproductive potential of *Tyrophagus putrescentiae* (Scrank) and *Tyrophagus neiswanderi* Johnston and Bruce (Acaridae), En: *The Acari. Reproduction, development and life-story strategies*. Schuster, R. (eds.). Chapman & Hall, Victoria. Pp. 313-317.
- Czapla, T. H. y B. A. Lang. 1990. Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and Southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.*, 83: 2480-2485.
- Davies, R. G. 1991. *Introducción a la Entomología*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. Pp. 449.
- Czapla, T. H. 1997. Plant lectins as insect control proteins in transgenic plants, En: *Advances in Insect Control. The role of Transgenic Plants*. Carozzi, N. y M. Koziel (eds.). Taylor & Francis Ltd., London. Pp. 123-138.
- Delaplane, K. S. 1992. Controlling tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) in colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae) with vegetable oil and menthol. *Journal of Economic Entomology*, 85 (6): 2118-2124.
- De Liñán, C. 1999. *Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales 2000*. Ediciones Agrotécnicas, Madrid, Pp. 628.
- Dhadialla, T. S.; G. R. Carlson y D. P. Le. 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenil hormone activity. *Annual Review of Entomology*, 43: 545-569.
- Dobson, R. M. 1979. Some effects of microclimate on the longevity and development of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart). *Acarologia*, XXI (3-4): 482-486.
- Don-Pedro, K. N. 1989. Mechanisms of action of some vegetable oils against *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera: Curculionidae) on wheat. *Journal of Stored Products Research*, 25 (4): 217-223.
- Donahue, W. A.; P. D. Teel; O. F. Strey y R. W. Meola. 1997. Pyriproxifen effects on newly engorged larvae and nymphs of the lone star tick (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, 34 (2): 206-211.
- DowElanco. 1994. *Spinosad. Technical guide*. DowElanco ed., U. K. Pp. 25.
- Downing, A. S.; C. G. Wright y M. H. Farrier. 1990. Effects of five insect growth regulators on a laboratory populations of the North American house-dust mite *Dermatophagoides farinae*. *Experimental and Applied Acarology*, 9: 123-130.

- Ebeling, W. y R. E. Wagner. 1959. Rapid desiccation of drywood termites with inert sorptive dusts and other substances. *Journal of Economic Entomology*, 52 (2): 190-207.
- Ebeling, W. 1976. Insect Integument: a Vulnerable Organ System, En: *The Insect Integument*. Hepburn, H. R. (eds.). Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam. Pp. 383-400.
- Eisemann, C. H.; R. A. Donaldson; R. D. Pearson; L. C. Cadogan; T. Vuocolo y R. L. Tellam. 1994. Larvicidal activity of lectins on *Lucilia cuprina*: mechanism of action. *Entomol. Exp. Appl.*, 72: 1-10.
- Ellman, G. L.; K. D. Courtney; V. Andres Jr y R. M. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95.
- Emmanouel, N. G.; C. T. Buchelos y C. T. E. Dukidis. 1994. A survey on the mites of stored grain in Greece. *Journal of Stored Products Research*, 30 (2): 175-178.
- Estrada Peña, A.; C. Sánchez Acedo; J. A. Castillo Hernandez y J. F. Gutierrez Galindo. 1981. *Tyroborus lini* como ácaro contaminante de alimentos. *Revista Ibérica de Parasitología*, 41 (3): 435-445.
- Etzler, M. E. 1986. Distribution and function of plant lectins, En: *The Lectins*. Liener, I. E.; N. Sharon y I. J. Goldstein (eds.). Academic, New York. Pp. 371-435.
- Evans, G. O. 1992. *Principles of Acarology*. CAB International, Wallingford. Pp. 563.
- Fan, Y.; E. Groden y F. A. Drummond. 1992. Temperature-dependent development of Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae) under constant and variable temperatures. *Journal of Economic Entomology*, 85: 1762-1770.
- Farinós, G. P.; G. Smagghe; L. Tirry y P. Castañera. 1999. Action and pharmacokinetics of a novel insect growth regulator, halofenozide, in adult beetles of *Aubeononymus mariaefranciscae* and *Leptinotarsa decemlineata*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 41: 201-213.
- Fashing, N. J. y W. J. Hefele. 1991. Biology of *Rhizoglyphus robini* (Astigmata: Acaridae), En: *Modern Acarology*. Bukva, F. D. & V. (eds.). Academia, Prague. Pp. 499-503.
- Fields, P. G. 1992. The control of stored-products insects and mites with extreme temperatures. *Journal of Stored Products Research*, 28 (2): 89-118.
- Finney, D. J. 1971. *Probit Analysis*. Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 333.
- Fornasari, L. 1995. Temperature effects on the embryonic development of *Aphthona abdominalis* (Coleoptera: Chrysomelidae), a natural enemy of *Euphorbia esula* (Euphorbiales: Euphorbiaceae). *Environmental Entomology*, 24 (3): 720-723.
- Gatehouse, A. M. R.; D. Boulter y V. A. Hilder. 1992. Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance, En: *Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*. Gatehouse, A. M. R.; V. A. Hilder y B. Boulder (eds.). C. A. B. International, Wallingford, U. K.

- Gatehouse, A. M. R.; K. S. Powell; W. J. Peumans; E. J. M. van Damme y J. A. Gatehouse. 1995. Insecticidal properties of lectins: Their potential in plant protection, En: *Lectins: Biomedical Perspectives*. Puzstai, A. J. y S. Bardocz (eds.). Taylor and Francis, Hants, UK. Pp. 35-57.
- Goldstein, I. J.; R. C. Hughes; M. Monsigny; T. Osawa y N. Sharon. 1980. What should be called a lectin? *Nature*, 285: 66.
- Got, B.; S. Piry; A. Migeon y J. M. Labatte. 1997. Comparison of different models for predicting development time of the European Corn Corer (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology*, 26 (1): 46-60.
- Grainge, M. y S. Ahmed. 1987. *Handbook of plants with pest-control properties*. John Wiley & Sons, New York. Pp. 470.
- Griffiths, D. A.; A. C. Hodson y C. M. Christensen. 1959. Grain storage fungi associated with mites. *Journal of Economic Entomology*, 52: 514-518.
- Griffiths, D. A. 1960. Some field habitats of mites of stored food products. *Annals of Applied Biology*, 48: 134-144.
- Griffiths, D. A.; D. R. Wilkin; B. J. Southgate y S. M. Lynch. 1976. A survey of mites in bulk grain stored on farms in England and Wales. *Annals of Applied Biology*, 82 (1): 180-185.
- Grondziel, E. 1976. Karyotypes of three species of Acarina. *Folia Biologia*, 24: 235-239.
- Guerrero, L.; J. Arnau; E. Maneja; J. M. Monfort; J. Senen y A. La Plana. 1991. Adaptación a escala industrial del procedimiento para eliminar los ácaros de los productos cárnicos. *IRTA CARNE. Boletín informativo para el sector cárnico*, Septiembre (nº. extraordinario).
- Guerrero, L. y J. Arnau. 1995. Dry cured hams. Chemical methods to control mites. *Fleischwirsch*, 75 (4): 449-450.
- Gulati, R. y S. Mathur. 1995. Effect of *Eucalyptus* and *Mentha* leaves and *Curcuma* rhizomes on *Tyrophagus putrescentiae* in wheat. *Experimental and Applied Acarology*, 19: 511-518.
- Habibi, J.; E. A. Backus y T. H. Czapla. 1993. Plant lectins affect survival of the potato leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *J. Econ. Entomol.*, 86: 945-951.
- Hagedorn, H. H. 1985. The role of ecdysteroids in reproduction, En: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut, G. A. y L. I. Gilbert (eds.). Pergamon Press, Oxford. Pp. 205-262.
- Hagstrum, D. W. y G. A. Milliken. 1991. Modelling differences in insect developmental times between constant and fluctuating temperatures. *Annals of Entomological Society of America*, 84 (4): 369-379.
- Hallas, T. E. 1991. The biology of mites. *Allergy*, 46, Suppl. 11: 6-9.

- Halverson, S. L.; W. E. Burkholder; T. S. Bigelow; E. V. Nordheim y M. E. Misenheimer. 1996. High-power microwave radiation as an alternative insect control method for stored products. *Journal of Economic Entomology*, 89 (6): 1638-1648.
- Higley, L. G.; L. P. Pedigo y K. R. Ostlie. 1986. DEGDAY: A program for calculating degree-days, and assumptions behind the degree-day approach. *Environmental Entomology*, 15: 999-1016.
- Hilbert, D. W. y J. A. Logan. 1983. Empirical model of nymphal development for the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* (Orthoptera: Acrididae). *Environmental Entomology*, 12: 1-5.
- Hilbert, D. W. 1995. Growth-based approach to modeling the developmental rate of Arthropods. *Environmental Entomology*, 24 (4): 771-778.
- Hilder, V. A. y D. Boulter. 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance - a critical review. *Crop Prot*, 18: 177-191.
- Hilsenhoff, W. L. y R. J. Dicke. 1963. *Effects of temperature and humidity on cheese mites*. Marketing Research Report no. 599. USDA in cooperation with Univ. Wisc. Agr. Exp. Sta., 46.
- Holling, C. S. 1965. The functional response of predators to prey density and its role in mimicry and population regulation. *Memories of the Entomological Society of Canada*, 45. Pp. 60.
- Hone, J. 1992. Rate of increase and fertility control. *Journal of Applied Ecology*, 29: 695-698.
- Horowitz, A. R.; M. Klein; S. Yablonski y I. Ishaaya. 1992. Evaluation of benzoylphenyl ureas for controlling the spiny bollworm, *Earias insulana* (Boisd.) in cotton. *Crop Protection*, 11: 465-469.
- Hughes, A. M. 1976. The mites of stored food and houses. *Technical Bulletin of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food*, 9: 1-400.
- Hurlock, E. T.; D. M. Armitage y B. E. Llewellyn. 1980. Seasonal changes in mite (Acari) and fungal populations in aerated and unaerated wheat stored for three years. *Bulletin of Entomological Research*, 70: 537-548.
- Ignatowicz, S. 1981. Effect of inorganic salts upon biology and development of acarid mites VII. Rapid dessication of the copra mite *Tyrophagus putrescentiae* and other mites with tricalcium phosphate and ferric phosphate. *Polskie Pismo Entomologiczne*, 51 (3): 471-482.
- Ignatowicz, S.; J. Boczek; R. Davis y W. A. Bruce. 1983. Utilization of irradiated sperm from successive matings by the mold mite. *Journal of Economic Entomology*, 76 (4): 683-686.
- Ignatowicz, S. 1986. Sex ratio in the Acarid mites (Acarida: Acaroidea). *Roczniki Nauk Rolniczych, Seria E Ochrona Roslin*, 16 (1): 101-110.

- Ignatowicz, S. 1992. Irradiation as a quarantine treatment for agricultural products infested by acarid mites (Acarina: Acaridae), En: *Use of Irradiation as a Quarantine Treatment of Food and Agricultural Commodities*. (eds.). International Atomic Energy Agency, Viena. Pp. 157-173.
- Ishaaya, I. 1990. Benzoylphenyl ureas and other selective insect control agents - mechanisms and application, En: *Pesticides and Alternatives*. Casida, J. E. (eds.). Elsevier, Amsterdam. Pp. 365-376.
- Ishaaya, I. y A. R. Horowitz. 1992. Novel phenoxy juvenile hormone analog (pyriproxyfen) suppresses embryogenesis and adult emergence of sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology*, 85: 2113-2117.
- Ishaaya, I.; A. De Cock y D. Degheele. 1994. Pyriproxyfen, a potent suppressor of egg hatch and adult formation of the greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology*, 87: 1185-1189.
- Jay, E. 1984. Recent advances in the use of modified atmospheres for the control of stored-product insects, En: *Insect Management for Food Storage and Processing*. Baur, F. J. (eds.). AACC, St Paul, Minnesota. Pp. 241-254.
- Jeffrey, I. G. 1976. A survey of the mite fauna of Scottish farms. *Journal of Stored Products Research*, 12: 149-156.
- Jongsma, M. A. y C. Bolter. 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol.*, 43: 885-895.
- Krafsur, E. S.; R. D. Moon y Y. Kim. 1995. Age structure and reproductive composition of summer *Musca autumnalis* (Diptera: Muscidae) populations estimated by pterin concentrations. *Journal of Medical Entomology*, 32 (5): 685-696.
- Kramer, K. J. y H. E. McGregor. 1976. Evaluation of hexadecyl cyclopropane carboxylate for preventive control of the mold mite in stored grain. *Journal of Economic Entomology*, 69 (5): 637-638.
- Krantz, G. W. 1961. The biology and ecology of granary mites of the Pacific Northwest I. Ecological considerations. *Annals of the Entomological Society of America*, 54: 169-174.
- Kraus, W. 1995. Biologically active ingredients. Azadirachtin and other triterpenoids, En: *The Neem Tree*. Schmutterer, H. (eds.). VHC, Weinheim. Pp. 35-73.
- Kumud, S. y R. B. Mathur. 1989. Influence of ultraviolet radiation on the survival of the acarid mite, *Tyrophagus putrescentiae* (Astigmata: Acaridae), En: *Progress in Acarology*. (eds.). Pp. 249-253.
- Kunkel, B. A.; D. W. Held y D. A. Potter. 1999. Impact of halofenozide, imidacloprid, and bendiocarb on beneficial invertebrates and predatory activity in turfgrass. *Journal of Economic Entomology*, 92: 922-930.
- Kuwahara, Y.; S. Ishii y H. Fukami. 1975. Neryl formate: alarm pheromone of the cheese mite, *Tyrophagus putrescentiae*. *Experientia*, 31 (10): 1115-1116.

- Kuwahara, Y.; L. Thim� Yen; Y. Tominaga; K. Matsumoto y Y. Wad. 1982. 1, 3, 5, 7-Tetramethyldecyl formate, lardolure: aggregation pheromone of the acarid mite, *Lardoglyphus konoī*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46 (9): 2283-2291.
- Kuwahara, Y.; W. S. Leal; Y. Nakamo; Y. Kaneko; H. Nakao y T. Suzuki. 1989. Pheromone study on astigmatid mites XXIII. Identification of the alarm pheromone on the acarid mite, *Tyrophagus neiswanderi* and species specificities of alarm pheromones among four species of the same genus. *Applied Entomology and Zoology*, 24 (4): 424-429.
- Kuwahara, Y. 1991. Pheromone studies on Astigmatid mites - Alarm, aggregation and sex, En: *Modern Acarology*. Bukva, F. D. & V. (eds.). Academia, Prague. Pp. 43-52.
- Kvalseth, T. O. 1985. Cautionary note about R^2 . *American Statistician*, 39: 279-285.
- Lactin, D. J.; N. J. Holliday; D. L. Johnson y R. Craigen. 1995. Improved rate model of temperature-dependent development by Arthropods. *Environmental Entomology*, 24 (1): 68-75.
- Lactin, D. J. y D. L. Johnson. 1995. Temperature-dependent feeding rate of *Melanoplus sanguinipes* nymphs (Orthoptera: Acrididae) in laboratory trials. *Environmental Entomology*, 24 (5): 1291-1296.
- Lamb, R. J.; G. H. Gerber y G. F. Atkinson. 1984. Comparison of developmental rate curves applied to egg hatching data of *Entomoscelis americana* Brown (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 13: 868-872.
- Laughlin, R. 1965. Capacity for increase: a useful population statistic. *Journal of Animal Ecology*, 34: 77-91.
- Law, I. J. y R. Kfir. 1997. Effect of mannose-binding lectin from peanut and pea on the stem borer *Chilo partellus*. *Entomol. Exp. Appl.*, 82: 261-265.
- Leal, W. S.; Y. Nakano; Y. Kuwahara; H. Nakao y T. Suzuki. 1988. Pheromone study of acarid mites XVII. Identification of 2-hydroxy-6-methyl-benzaldehyde as the alarm pheromone of the acarid mite *Tyrophagus pemiciosus* and its distribution among related mites. *Applied Entomology and Zoology*, 23 (4): 422-427.
- Leal, W. S.; Y. Kuwahara y T. Suzuki. 1989. 2 (E)-(4-Methyl-3-penteylidene)-butanodial-b-Acaridial: a new type of monoterpene from the mold mite *Tyrophagus putrescentiae*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53 (3): 875-878.
- Lehtinen, P. T. y I. Oksala. 1991. Astigmatic and Prostigmatic mites of grain stores, mills and sawmills in Finland, En: *The Acari. Reproduction, development and life-story strategies*. Schuster, R. (eds.). Chapman & Hall, Victoria. Pp. 519-520.
- LeOra y Software. 1987. *POLO-PC, user's guide to probit or logit analysis*. LeOra Software Inc., Berkeley, CA.
- Letellier, C.; E. Haubruge y C. Gaspar. 1995. Biological activity of fenoxycarb against *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 31 (1): 37-42.

- Liener, I. E. 1976. Phytohemagglutinins (phytolectins). *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 27: 291-319.
- Liener, I. E. 1979. Phytohemagglutinins, En: *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. Rosenthal, G. A. y D. H. Jantzen (eds.). Elsevier, Amsterdam. Pp. 567-597.
- Lipa, J. J. 1971. Microbial control of mites and ticks, En: *Microbial control of insects and mites*. Hussey, H. D. B. & N. W. (eds.). Pp. 357-373.
- Logan, J. A.; D. J. Wolkind; S. C. Hoyt y L. K. Tanigoshi. 1976. An analytic model for description of temperature dependent rate phenomena in Arthropods. *Environmental Entomology*, 5 (6): 1133-1140.
- Logan, J. A. y D. W. Hilbert. 1983. Modeling the effects of temperature on arthropod population systems, En: *Analysis of ecological Systems: State-of-the-art in ecological modeling*. W. K. Lauenroth, G. V. S. a. M. F. (eds.). Elsevier, Amsterdam. Pp. 113-122.
- Logan, J. A. 1988. Toward an Expert System for development of Pest Simulation Models. *Environmental Entomology*, 17 (2): 359-376.
- Lotka, A. J. 1945. Population analysis as a chapter in the mathematical theory of evolution, En: *Essays on Growth and Form*. Clark, W. E. L. y P. B. Medawar (eds.). Oxford. Pp. 355-385.
- Luxton, M. y H. Petersen. 1982. Survey of the main animal taxa of the detritus food web. *Oikos*, 39 (3): 293-294.
- Lysyk, T. J. 1998. Relationships between temperature and life history parameters of *Trichomalopsis sarcophagae* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Environmental Entomology*, 27 (2): 488-498.
- Mahmood, S. H. 1992. Mite fauna of stored grain seeds in central Iraq. *Journal of Stored Products Research*, 28 (3): 179-181.
- Mansour, F. y K. R. S. Ascher. 1995. Acarina, mites, En: *The Neem Tree*. Schmutterer, H. (eds.). VCH, Weinheim. Pp. 161-166.
- Marco, V. y E. Viñuela. 1994. Effects of hexaflumuron on fecundity, fertility and longevity of *Ephesia kuehniella* Zeller and *Spodoptera exigua* (Hübner). *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 59: 457-463.
- Marco, V.; A. Taberner y P. Castañera. 1997. Development and survival of immature *Aubeonymus mariaefrancisciae* (Coleoptera: Curculionidae) at constant temperatures. *Annals of Entomological Society of America*, 90 (2): 169-176.
- Mason, L. J. y T. P. Mack. 1984. Influence of temperature on oviposition and adult female longevity for the soybean looper, *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 13: 379-383.

- Matsumoto, T.; T. Hisano; M. Hamaguchi y T. Miike. 1996. Systemic Anaphylaxis after Eating Storage-Mite-Contaminated Food. *International Archives of Allergy and Immunology*, 109: 197-200.
- McClymont Peace, D. 1983. Reproductive success of the mite *Acarus siro* L. on stored Cheddar cheese of different ages. *Journal of Stored Products Research*, 19 (3): 97-104.
- McMurtry, J. A. 1984. A consideration of the role of predators in the control of acarine pests, En: *Acarology VI*. Griffiths, D. A. y C. E. Bowman (eds.). Ellis Horwood Limited, Chichester, England. Pp. 109-121.
- Meazza, G.; F. Rama; F. Bettarini; P. Piccardi; P. Massardo y V. Caprioli. 1992. Synthesis and bioactivity of some fluorine-containing benzoyl arylureas. I. Insecticidal-acaricidal products in which the aryl group bears a trifluoromethyl-substituted alkyl or alkenyl side chain. *Pestic Sci. Essex : Elsevier Applied Science Publishers*, 35: 137-144.
- Messina, F. J. y J. A. A. Renwick. 1983. Effectiveness of oils in protecting stored cowpeas from the cowpea weevil (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Economic Entomology*, 76: 634-636.
- Meyer, J. S.; C. G. Ingersoll; L. L. McDonall y M. S. Boyce. 1986. Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs. Bootstrap techniques. *Ecology*, 67 (5): 1156-1166.
- Milliken, G. A. y D. E. Johnson. 1984. *Analysis of messy data. Vol. I: designed experiments*. Van Nostrand Reinhold, New York. 473.
- Miyazawa, M.; H. Watanabe y H. Kameoka. 1997. Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a p-menthane skeleton. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 677-679.
- Miyazawa, M.; H. Watanabe; K. Umemoto y H. Kameoka. 1998. Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 3431-3434.
- Monthéan, C. y D. A. Potter. 1992. Effects of RH-5849, a novel insect growth regulator, on Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in turfgrass. *Journal of Economic Entomology*, 85: 507-513.
- Mori, K. y S. Kuwahara. 1986. Stereochemistry of lardolure, the aggregation pheromone of the acarid mite *Lardoglyphus konoi*. *Tetrahedron*, 42: 5545-5550.
- Mori, N. y Y. Kuwahara. 1995. Synthesis of (2R, 3R)-Epoxyneral, a sex pheromone of the acarid mite, *Caloglyphus sp* (Astigmata: Acaridae). *Tetrahedron letters*, 1477-1478.
- Murdock, L. L.; G. Brookhart; P. E. Dunn; D. E. Foard; S. Kelley; L. Kitch; R. E. Shade; R. H. Shukle y J. L. Wolfson. 1987. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. *Comp. Biochem. Physiol.*, 87B: 783-787.
- Mwangi, E. N.; A. Hassanali; S. Essuman; E. Myandat; L. Moreka y M. Kimondo. 1995. Repellent and acaricidal properties of *Ocimum suave* against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 19: 11-18.

- Norris, J. D. 1958. Observations on the control of mite infestations in stored wheat by *Cheyletus* spp. (Acarina, Cheyletidae). *Annals of Applied Biology*, 46: 411-422.
- Novillo, C.; P. Castañera y F. Ortego. 1997. Characterization and distribution of chymotrypsin-like and other proteases in Colorado Potato Beetle larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 36: 181-201.
- Nowierski, R. M.; Z. Zeng y A. L. Scharen. 1995. Age-specific life table modeling of the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) on barley grown in benzinidazole agar. *Environmental Entomology*, 24 (5): 1284-1290.
- Oberlander, H.; D. L. Silhacek y P. Porcheron. 1995. Non-steroidal ecdysteroid agonists: tools for the study of hormonal action. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 28: 209-223.
- Oberlander, H.; D. L. Silhacek; E. Shaaya y I. Ishaaya. 1997. Current status and future perspectives of the use of insect growth regulators for the control of stored product insects. *Journal of Stored Products Research*, 33 (1): 1-6.
- OConnor, B. M. 1979. Evolutionary origins of Astigmatid mites inhabiting stored products, En: *Recent Advances in Acarology*. Rodríguez, J. G. (eds.). Academic Press, New York. Pp. 273-278.
- OConnor, B. M. 1982. Evolutionary ecology of Astigmatid mites. *Annual Review of Entomology*, 27: 385-409.
- Oppert, B.; T. D. Morgan; C. Culbertson y K. J. Kramer. 1993. Dietary mixtures of cysteine and serine proteinase inhibitors exhibit synergistic toxicity toward the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105C: 379-385.
- Ortego, F.; C. Novillo y P. Castañera. 1996. Characterization and distribution of digestive proteases of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera: Noctuidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 33: 163-180.
- Ortego, F.; G. P. Farinós; M. Ruíz; V. Marco y P. Castañera. 1998. Characterization of digestive proteases in the weevil *Aubeonymus mariaefranciscae* and effects of proteinase inhibitors on larval development and survival. *Entomol. Exp. Appl.*, 88: 265-274.
- Ortego, F.; I. Sánchez-Ramos; M. Ruiz y P. Castañera. 2000. Characterization of proteases from a stored product mite, *Tyrophagus putrescentiae*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 43: 116-124.
- Pagani, M. y M. Ciampitti. 1990. Mite control on seasoned pork products by modified atmospheres. Preliminary tests, En: *II Proceedings of the Fifth International Working Conference on Stored-Product Protection*. Fleurat-Lessard, F. y P. Ducom (eds.). Pp. 887-891.
- Pankiewicz-Nowicka, D. y J. Boczek. 1984. A comparison of food preference of some acarid mites (Acarida: Acaroidea), En: *Acarology VI*. Bowman, D. A. G. & C. E. (eds.). Ellis Horwood Limited, Chichester, England. Pp. 987-992.

- Parajulee, M. N.; T. W. Phillips; J. E. Throne y E. V. Nordheim. 1995. Life history of immature *Lyctocoris campestris* (Hemiptera: Anthocoridae): Effects of constant temperatures and relative humidities. *Environmental Entomology*, 24 (4): 889-897.
- Parkinson, C. L. 1990. Population increase and damage by three species of mites on wheat at 20 °C on two humidities. *Experimental and Applied Acarology*, 8 (3): 179-193.
- Parkinson, C. L.; C. A. Barron; S. M. Barker; A. C. Thomas y D. M. Armitage. 1991a. Longevity and fecundity of *Acarus siro* on four field and eight storage fungi. *Experimental and Applied Acarology*, 11: 1-8.
- Parkinson, C. L.; N. Jamieson; J. Eborail y D. M. Armitage. 1991b. Comparison of the fecundity of three species of grain stored mites on fungal diets. *Experimental and Applied Acarology*, 12 (3/4): 297-302.
- Pernas, M.; R. Sánchez-Monge; L. Gómez y G. Salcedo. 1998. A chestnut seed cystatin differentially effective against cysteine proteinases from closely related pests. *Plant Molec. Biol.*, 38: 1235-1242.
- Pernas, M.; I. Sánchez-Ramos; R. Sánchez-Monge; M. Lombardero; C. Arteaga; P. Castañera y G. Salcedo. Der p 1 and Der f 1, the highly related and major allergens from the house dust mites, are differentially affected by a plant cystatin. *Clinical and Experimental Allergy*, En prensa.
- Perrucci, S. 1995. Acaricidal activity of some essential oils and their constituents against *Tyrophagus longior*, a mite of stored food. *Journal of Food Protection*, 58: 560-563.
- Peumans, W. J. y E. J. M. Van Damme. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.*, 109: 347-352.
- Pinder III, J. E.; J. G. Wiener y M. H. Smith. 1978. The Weibull distribution: a new method of summarizing survivorship data. *Ecology*, 59: 175-179.
- Poinar Jr, G. y R. Poinar. 1998. Parasites and pathogens of mites. *Annual Review of Entomology*, 43: 449-469.
- Pulpan, J. y P. H. Verner. 1965. Control of Tyroglyphoid mites in stored grain by the predatory mite *Cheyletus eruditus* (Schrank). *Canadian Journal of Zoology*, 43 (3): 417-432.
- Quintero, M. T. y H. A. Acevedo. 1991a. Studies on deep litter mites on farms in Mexico, En: *Modern Acarology*. Bukva, F. D. & V. (eds.). Academia, Prague. Pp. 443-448.
- Quintero, M. T. y H. A. Acevedo. 1991b. Mites of fermented liquid foods in Mexico, En: *Modern Acarology*. Bukva, F. D. & V. (eds.). Academia, Prague. Pp. 611-614.
- Reeck, G. R.; K. J. Kramer; J. E. Baker; M. R. Kanost; J. A. Fabrick y G. A. Behnke. 1997. Proteinase inhibitors and resistance of transgenic plants to insects, En: *Advances in Insect Control. The role of Transgenic Plants*. Carozzi, N. y M. Koziel (eds.). Taylor & Francis Ltd., London. Pp. 157-183.

- Rembold, H. 1995. Insecta, Insects. Biological effects of neem and their modes of action. Growth and metamorphoses, En: *The Neem Tree*. Schmutterer, H. (eds.). VHC, Weinheim. Pp. 177-192.
- Retnakaran, A.; J. Granett y T. Ennis. 1985. Insect growth regulators, En: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut, G. A. y L. I. Gilbert (eds.). Pergamon Press, Oxford. Pp. 529-601.
- Richter O. y D. Sondgerath. 1990. *Parameter Estimation in Ecology*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Federal Republic of Germany.
- Risha, E. M.; A. K. M. El-Nahal y G. H. Schmidt. 1990. Toxicity of vapours of *Acorus calamus* L. oil to the immature stages of some stored-product Coleoptera. *Journal of Stored Products Research*, 26 (3): 133-137.
- Rivard, I. 1958a. A technique for rearing Tyroglyphid mites on mould cultures. *Canadian Entomologist*, 90: 146-147.
- Rivard, I. 1958b. Influence of humidity on mortality and rate of development of immature stages of the grain-infesting mite *Tyrophagus castellani* reared on mould cultures. *Canadian Entomologist*, 90: 721-724.
- Rivard, I. 1959. Influence of humidity on longevity, fecundity and rate of increase of the grain infesting mite *Tyrophagus castellani* (Acarina: Acaridae) reared on mould cultures. *Canadian Entomologist*, 91: 32-35.
- Rivard, I. 1961. Influence of temperature and humidity on mortality and rate of development of immature stages of the mite *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank)(Acarina: Acaridae) reared on mold cultures. *Canadian Journal of Zoology*, 39: 419-426.
- Robertson, P. L. 1959. A revision of the genus *Tyrophagus*, with a discussion on its taxonomic position in the Acarina. *Australian Journal of Zoology*, 7: 146-181.
- Rodriguez, J. G.; M. F. Potts y C. G. Patterson. 1979. Allelochemic effects of some flavoring components on the acari, *Tyrophagus putrescentiae*., En: *Recent Advances in Acarology*. Rodriguez, J. G. (eds.). Academic Press, New York. Pp. 251-261.
- RohMid. 1996. *Technical information bulletin. RH-0345, turf and ornamental insecticide*. RohMid LLC, Philadelphia, PA, USA.
- Ross, D. H.; R. G. Pennington; L. R. Cruthers y R. L. Slone. 1997. Efficacy of a permethrin and pyriproxyfen product for control of fleas, ticks and mosquitoes on dogs. *Canine-Pract.*, 22 (2/3): 53-58.
- Royo, J.; J. León; G. Vancanneyt; J. P. Albar; S. Rosahl; F. Ortego; P. Castañera y J. J. Sánchez-Serrano. 1999. Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insects pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 1146-1151.

- Ruggle, P. y A. P. Gutiérrez. 1995. Use of life tables to assess host plant resistance in Alfalfa to *Therioaphis trifolii* f. *maculata* (Homoptera: Aphididae): Hypothesis for maintenance of resistance. *Environmental Entomology*, 24 (2): 313-325.
- Ryan, C. A. 1981. Proteinase inhibitors, En: *The Biochemistry of Plants*. Marcus, A. (eds.). Academic Press, New York. Pp. 351-370.
- Ryan, C. A. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28: 425-449.
- Ryan, M. F. y O. Byrne. 1988. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of Chemical Ecology*, 14 (10): 1965-1975.
- Sakagami, Y.; K. Taki; T. Matsuhisa y S. Marumo. 1992. Identification of 2-deoxyecdysone from the mite *Tyrophagus putrescentiae*. *Experientia*, 48 (8): 793-796.
- Salgado, V. L. 1997. The modes of action of spinosad and other insect control products. *Down to Earth*, 52 (1): 35-43.
- Sanguanpong, V. y H. Schmutterer. 1992. Laboratory trials on the effects of neem oil and neem-based extracts against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Z. PflKrankh. PflSchutz.*, 99: 637-646.
- Santos, M. A. 1989. Mortality and fecundity of *Tyrophagus putrescentiae* in relation to population density. *Environmental Entomology*, 18 (6): 1060-1065.
- Sauvion, N.; Y. Rahbé; W. Peumans J.; E. J. M. Van Damme; J. A. Gatehouse y A. M. R. Gatehouse. 1996. Effects of GNA and other mannose binding lectins on development and fecundity of the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomol. Exp. Appl.*, 79: 285-293.
- Schauer, M. y H. Schmutterer. 1981. Effects of neem kernel extracts on the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, En: *Natural Pesticides from the Neem Tree (Azadirachta indica A. Juss.)*. Proc. 1st Int. Neem Conf. Schmutterer, H.; K. R. S. Ascher y H. Rembold (eds.). Rottach-Egern, Germany. Pp. 259-266.
- Schmutterer, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the Neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology*, 35: 271-297.
- Schoolfield, R. M.; P. J. H. Sharpe y C. E. Magnuson. 1981. Non linear regression of biological temperature-dependent rate models based on absolute reaction-rate theory. *Journal of Theoretical Biology*, 88: 719-731.
- Schoonhoven, A. V. 1978. Use of vegetable oils to protect stored beans from Bruchid attack. *Journal of Economic Entomology*, 71: 254-256.
- Schuler, T. H.; G. M. Poppy; B. R. Kerry y I. Denholm. 1998. Insect-resistant transgenic plants. *Trends Biotech.*, 16: 168-175.
- Shaaya, E.; U. Ravid; N. Paster; B. Juven; U. Zisman y V. Pissarev. 1991. Fumigant toxicity of essential oils against four major stored-products insects. *Journal of Chemical Ecology*, 17 (3): 499-504.

- Shaaya, E. y M. Kostjukovsky. 1998. Efficacy of phyto-oils as contact insecticides and fumigants for the control of stored-product insects, En: *Insecticides with novel models of action*. Degheele, I. I. & D. (eds.). Springer, Berlin. Heidelberg. Pp. 171-187.
- Sharpe, P. J. y D. W. DeMichele. 1977. Reaction kinetics of poikilotherm development. *Journal of Theoretical Biology*, 64: 649-670.
- Shave, P. 1984. The coconut - a means of transportation of high humidity dependent organisms. *Entomologist's Monthly Magazine*, 120 (Sept.-Dec.): 215.
- Silhacek, D. L.; H. Oberlander y P. Porcheron. 1990. Action of RH-5849, a non-steroidal ecdysteroid mimic, on *Plodia interpunctella* (Hubner) in vivo and in vitro. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 15: 201-212.
- Silverstein, R. M. 1981. Pheromones: Background and potential for use in insect pest control. *Science*, 213: 1326-1332.
- Sinha, R. N. 1964. Effect of low temperature on the survival of some stored product mites. *Acarologia*, 6 (2): 336-341.
- Sinha, R. N. y J. T. Mills. 1968. Feeding and reproduction of the grain mite and the mushroom mite on some species of *Penicillium*. *Journal of Economic Entomology*, 61, 6: 1548-1552.
- Sinha, R. B. 1979. Role of Acarina in stored grain ecosystem, En: *Recent Advances in Acarology*. Rodriguez, J. G. (eds.). Academica Press, New York. Pp. 263-273.
- Slobodkin, L. B. 1962. *Growth and regulation of animal populations*. Dover Publications, Inc., New York.
- Smagghe, G. y D. Degheele. 1992. Effects of RH-5849, the first nonsteroidal ecdysteroid agonist, on larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 21: 119-128.
- Smagghe, G. y D. Degheele. 1994. Action of the nonsteroidal ecdysteroid mimic RH-5849 on larval development and adult reproduction of insects of different orders. *Invertebr. Reprod. Devel.*, 25: 227-236.
- Smith, A. M. 1986. Fecundity and survival of the common armyworm, *Mythimna convecta*: Effects of temperature and larval nutrition. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 42: 31-37.
- Smrz, J. y V. Catská. 1987. Food selection of the field population of *Tyrophagus putrescentiae*. *Journal of Applied Entomology*, 104 (4): 329-335.
- Smrz, J. y E. Jungová. 1989. The ecology of a field population of *Tyrophagus putrescentiae*. *Pedobiologia*, 33 (3): 183-192.
- Sonenshine, D. E. 1985. Pheromones and other semiochemicals of the acari. *Annual Review of Entomology*, 30: 1-28.
- Southwood, T. R. E. 1976. *Ecological Methods*. Chapman & Hall, London. 391.

- Spollen, K. M. y M. B. Isman. 1996. Acute and sublethal effects of a neem insecticide on the commercial biological control agents *Phytoseiulus persimilis* and *Amblyseius cucumeris* (Acari: Phytoseiidae) and *Aphidoletes aphidimyza* (Diptera: Cecidomyiidae). *J econ entomol. Lanham, Md. : Entomological Society of America*, 89: 1379-1386.
- Stables, L. M. 1984. Effect of pesticides on three species of *Tyrophagus* and detection of resistance to pirimiphos-methyl in *Tyrophagus palmarum* and *Tyrophagus putrescentiae*. En: *Acarology VI*. Bowman, D. A. G. & C. E. (eds.). Ellis Horwood Limited, Chichester, England. Pp. 1026-1033.
- Stamopoulos, D. C. 1991. Effects of four essential oil vapours on the oviposition and fecundity of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae): laboratory evaluation. *Journal of Stored Product Research*, 27(4): 199-203.
- Stark, J. D. 1992. Comparison of the impact of a neem seed-kernel extract formulation, 'Margosan-O' and chlorpyrifos on non-target invertebrates inhabiting turf grass. *Pestic Sci. Essex : Elsevier Applied Science Publishers*, 36: 293-299.
- Stendel, W. y R. Fuchs. 1984. Biological evaluation of flumethrin, a new synthetic pyrethroid for the control of ticks., En: *Acarology VI*. Bowman, D. A. G. & C. E. (eds.). Ellis Horwood Limited, Chichester, England. Pp. 1252-1255.
- Stewart, G. A.; F. R. Lake y P. J. Thompson. 1991. Faecally derived hydrolytic enzymes from *Dermatophagoides pteronyssinus*: Physicochemical characterization of potential allergens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 95: 248-256.
- Stewart, G. A.; C. H. Bird; K. D. Krska; M. J. Colloff y P. J. Thompson. 1992. A comparative study of allergenic and potentially allergenic enzymes from *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae* and *Euroglyphus maynei*. *Exp. Appl. Acarol.*, 16: 165-180.
- Stewart, G. A.; M. R. Kollinger; C. M. King y P. J. Thompson. 1994. A comparative study of three serine proteases from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*. *Allergy*, 49: 553-560.
- Stewart, G. A. 1995. Dust mite allergens. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 13: 135-150.
- Stinner, R. E.; A. P. Gutiérrez y G. D. J. Butler. 1974. An algorithm for temperature-dependent growth rate simulation. *The Canadian Entomologist*, 106: 519-524.
- Sundaram, K. M. S.; R. Campbell; L. Sloane y J. Students. 1995. Uptake, translocation, persistence and fate of azadirachtin in aspen plants (*Populus tremuloides* Michx.) and its effect on pestiferous two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Crop prot. Kidlington, Oxford, Uk : Elsevier Science Ltd. Aug*, 14: 415-421.
- Szlendak, E. y P. Kraszpulski. 1991. Energy budget of the grain mite, *Acarus siro* (Acari: Acaridae). *Experimental and Applied Acarology*, 10: 221-230.
- Taberner, A.; P. Castañera; E. Silvestre y J. Dopazo. 1993. Estimation of the intrinsic rate of natural increase and its error by both algebraic and resampling approaches. *Cabios*, 9 (5): 535-540.

- Tauber, M. J.; C. A. Tauber y S. Masaki. 1986. *Seasonal adaptations of insects*. Oxford University Press, New York.
- Tauber, M. J.; C. A. Tauber; J. P. Nyrop y M. G. Villani. 1998. Moisture, a vital but neglected factor in the seasonal ecology of insects: Hypotheses and tests of mechanisms. *Environmental Entomology*, 27 (3): 523-530.
- Taylor, F. 1981. Ecology and evolution of physiological time in insects. *American Naturalist*, 117: 1-23.
- Teel, P. D.; W. A. Donahue; O. F. Strey y R. W. Meola. 1996. Effects of pyriproxyfen on engorged females and newly oviposited eggs of the lone star tick (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, 33 (5): 721-725.
- Templeton, W. 1969. The monoterpenoids, En: *An introduction to the chemistry of steroids*. (eds.). Butterworths, London. Pp. 41-70.
- Terho, E. O.; K. Husman; I. Vohlonen; M. Rautalahti y H. Tukiainen. 1985. Allergy to storage mites or cow dander as a cause of rhinitis among Finnish dairy farmers. *Allergy*, 40: 23-26.
- Terra, W. R. y C. Ferreira. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113 B: 725-730.
- Terra, W. R.; C. Ferreira; B. P. Jordão y R. J. Dillon. 1996. Digestive enzymes, En: *Biology of the Insect Midgut*. Lehane, M. J. y P. F. Billingsley (eds.). Chapman & Hall, London. Pp. 153-194.
- Thomas, W. R. 1993. Mite allergens groups I-VII. A catalogue of enzymes. *Clin. Exp. Allergy*, 23: 350-353.
- Thompson, G. D.; K. H. Michel; R. C. Yao; J. S. Mynderse; C. T. Moosgurg; T. V. Worden; E. H. Chio; T. C. Sparks y S. H. Hutchins. 1997. The discovery of *Saccharopolyspora spinosa* and a new class of insect control products. *Down to Earth*, 52 (1): 1-5.
- Throne, J. E.; D. W. Hagstrum y J. Nawrot. 1998. Computer model for simulating almond moth (Lepidoptera: Pyralidae) population dynamics. *Environmental Entomology*, 27 (2): 344-354.
- Tigar, B. J. y D. B. Pinniger. 1989. An assessment of methacrifos as a grain protectant and its efficacy against *Oryzaephilus surinamensis* L., *Tribolium castaneum* Herbst, *Sitophilus granarius* L., *Sitophilus oryzae* L., *Acarus siro* L., *Glyciphagus destructor* Schrank and *Tyrophagus longior* Gervais. *Pesticide Science*, 25 (2): 175-185.
- Tsai, J. H. y Y.-H. Liu. 1998. Effect of temperature on development, survivorship, and reproduction of Rice Root Aphid (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology*, 23 (3): 662-666.
- Tsai, J. H. y K. Wang. 1999. Life table study of Brown Citrus Aphid (Homoptera: Aphididae) at different temperatures. *Environmental Entomology*, 28 (3): 412-419.

- Van Hage-Hamstem, M. y S. G. O. Johansson. 1992. Storage mites. *Experimental and Applied Acarology*, 16: 117-128.
- Wagner, T. L.; H. Wu; P. J. H. Sharpe; R. M. Schoolfield y R. N. Coulson. 1984a. Modeling insect development rates: a literature review and application of a biophysical model. *Annals of the Entomological Society of America*, 77: 208-225.
- Wagner, T. L.; H. I. Wu; P. J. H. Sharpe y R. N. Coulson. 1984b. Modeling distributions of insect development time: a literature review and application of the Weibull function. *Annals of the Entomological Society of America*, 77: 475-487.
- Wagner, T. L. 1995. Temperature dependent development, mortality, and adult size of sweetpotato whitefly biotype B (Homoptera: Aleyrodidae) on cotton. *Environmental Entomology*, 24 (5): 1179-1188.
- Walter, D. E.; R. A. Hudgens y D. W. Freckman. 1986. Consumption of nematods by fungivorous mites, *Tyrophagus* spp. (Acarina: Astigmata: Acaridae). *Oecologia*, 70 (3): 357-361.
- Wharton, G. W. y T. L. Devine. 1968. Exchange of water between a mite, *Laelaps echidnina*, and the surrounding air under equilibrium conditions. *Journal of Insect Physiology*, 14: 1303-1318.
- Wharton, G. W. y L. G. Arlian. 1972. Utilization of water by terrestrial mites and insects, En: *Insect and mite nutrition*. Rodríguez, J. G. (eds.). North-Holland, Amsterdam. Pp. 153-165.
- Wharton, G. W. y R. T. Furumizo. 1977. Supracoxal gland secretions as a source of fresh water for Acaridei. *Acarologia*, 19: 112-116.
- Wharton, R. H.; K. M. Duke y H. M. Epstein. 1979. Water and the physiology of house dust mites, En: *Recent Advances in Acarology*. Rodríguez, J. G. (eds.). Academic Press, New York. Pp. 325-335.
- Whitaker, J. R. 1997. Protease and alpha-amylase inhibitors of higher plants, En: *Antinutrients and Phytochemicals in Food*. Shahidi, F. (eds.). Amer. Chem. Soc., Washington DC. Pp. 10-30.
- Wigglesworth, V. B. 1942. Some notes on the integument of insects in relation to the entry of contact insecticides. *Bulletin of Entomological Research*, 33: 205-218.
- Wilkin, D. R. y J. A. Hope. 1973. Evaluation of pesticides against stored product mites. *Journal of Stored Products Research*, 8 (4): 323-327.
- Wilkin, D. R. 1973. Resistance to lindane in *Acarus siro* from an English cheese store. *Journal of Stored Products Research*, 9: 101-104.
- Wilkin, D. R.; G. Murdoch y H. C. Woodville. 1976. The chemical control of mites infesting freesia corms and narcissus bulbs. *Annals of Applied Biology*, 82 (1): 186-189.
- Wilkin, D. R. 1979. The control of mites in cheese stores, En: *Recent Advances in Acarology*. Rodríguez, J. G. (eds.). Academic Press, New York. Pp. 221-229.

- Williams, C. M. 1967. Third-generation pesticides. *Scientific American*, 217: 13-17.
- Wing, K. D.; R. A. Slaweki y G. R. Carlson. 1988. RH-5849, a nonsteroidal ecdysoneagonist: effects on larval lepidoptera. *Science*, 241: 470-472.
- Witalinski, W. 1993. Egg shells in mites: vitelline envelope and chorion in Acaridida (Acari). *Experimental and Applied Acarology*, 17: 321-344.
- Wolfson, J. L. y L. L. Murdock. 1990. Diversity in digestive proteinase activity among insects. *J. Chem. Ecol.*, 16: 1089-1102.
- Woodroffe, G. E. 1953. An ecological study of the insects and mites in the nests of certain birds in Britain. *Bulletin of Entomological Research*, 44: 739-772.
- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Zdarkova, E. y E. Horak. 1973. *Acarus siro* and *Tyrophagus putrescentiae*: toxicity of some insecticides assayed by a new method. *Journal of Economic Entomology*, 66 (5): 1237-1238.
- Zdarkova, E. y M. Reska. 1976. Weight losses of groundnuts (*Arachis hypogaea* L.) from infestation by the mites *Acarus siro* and *Tyrophagus putrescentiae*. *Journal of Stored Products Research*, 12 (2): 101-104.
- Zdarkova, E. 1991a. Stored Product Acarology, En: *Modern Acarology*. Bukva, F. D. & V. (eds.). Academia, Prague. Pp. 211-218.
- Zdarkova, E. 1991b. Mites as pests of stored products: Application of the bio-preparation "Cheyletin" in empty stores, En: *Modern Acarology*. Bukva, F. D. & V. (eds.). Academia, Prague. Pp. 607-610.
- Zdarkova, E. y V. Voracek. 1993. The effects of physical factors on survival of stored food mites. *Experimental and Applied Acarology*, 17 (3): 197-204.
- Zdarkova, E. 1994. The effectiveness of organophosphate acaricides in stored product mites interacting in biological control. *Experimental and Applied Acarology*, 18: 747-751.

