

1 **Selección de una especie de *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae) para el control**  
2 **biológico de la polilla de la patata *Phthorimaea operculella* (Lep., Gelechiidae) mediante**  
3 **el estudio del comportamiento de parasitación del huésped**

4 J.R. Gallego<sup>1</sup>, L. Mellado-López<sup>1</sup> y T. Cabello<sup>1</sup> \*

5 <sup>1</sup>Escuela Superior de Ingeniería, Departamento de Biología y Geología, Universidad de  
6 Almería, Ctra. Sacramento s/n, CP 04120 Almería, España

7 \*autor para correspondencia: tcabello@ual.es

8 **Resumen**

9 Las plagas que actualmente ocasionan mayores pérdidas económicas en el cultivo de patata de  
10 en España son las denominadas “polilla común de la patata” *Phthorimaea operculella* y “polilla  
11 guatemalteca de la patata” *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). Por ello, se ha llevado  
12 a cabo un estudio, en condiciones de laboratorio, para evaluar el potencial biológico de dos  
13 especies de parasitoides de huevos: *Trichogramma achaeae* y *T. cacoeciae* (Hym.:  
14 Trichogrammatidae) como agentes de control *P. operculella*. Se han realizado tres grupos de  
15 ensayos: “no elección” de huésped, “elección” de huésped y estudio del comportamiento de  
16 parasitación. En todos los ensayos se compararon los huevos de la plaga frente al huésped de  
17 cría de los parasitoides: *Ephestia kuehniella*. En los resultados del ensayo de “no elección” se  
18 ha encontrado que *T. achaeae* parasitó significativamente más huevos huéspedes de ambas  
19 especies que *T. cacoeciae*. Así, la mortalidad total de huevos en *P. operculella* fue del  
20 92,78±13,47% para *T. achaeae* frente al 70,88±15,11% para *T. cacoeciae*. A su vez, en el  
21 ensayo de “elección” se ha encontrado que las hembras adultas de ambas especies de  
22 parasitoides presentaron una preferencia por los huevos de *P. operculella* ( $\beta_2 = 0,58 \pm 0,10$  y  $\beta_2$   
23 =  $0,61 \pm 0,17$  para *T. achaeae* y *T. cacoeciae*, respectivamente). Por último, en el ensayo de  
24 comportamiento de parasitación, se ha encontrado que *T. cacoeciae* presentó significativamente  
25 menores tiempos de búsqueda y menores tiempos de manipulación de ambos huevos huéspedes

Comentado [TCG1]: Revisor 2: Numeración de línea continua en todas las páginas: HECHO.

Comentado [TCG2]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG3]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG4]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG5]: Revisor 2: ACEPTADO.

26 que *T. achaeae*. Ambas especies de *Trichogramma* parecen ser buenos candidatos como  
27 agentes de control biológico de *P. operculella*, lo que debe ser confirmado posteriormente  
28 mediante estudios en campo y en almacén.

29 **Palabras clave:** Parasitoides oófagos, selección de huésped, aceptación de huésped, **Tiempo**  
30 **tiempo** de búsqueda, tiempo de manipulación.

Comentado [TCG6]: Revisor 2: ACEPTADO.

31 **Selection of a *Trichogramma* species (Hym., Trichogrammatidae) for the biological**  
32 **control of the potato moth *Phthorimaea operculella* (Lep., Gelechiidae) by host-parasitism**  
33 **behavioral study**

34 **Abstract**

35 Currently, the “potato tuber worm” *Phthorimaea operculella* and the “Guatemalan potato moth”  
36 *Tecia solanivora* (Lep.: Gelechiidae) are the two pests of the greatest economic importance in  
37 Spanish potato crops. For this reason, the potential as biological control agent of two egg  
38 parasitoid species (*Trichogramma achaeae* and *T. cacoeciae*) (Hym.: Trichogrammatidae) of  
39 the pest species *P. operculella* has been studied, under laboratory conditions. Three groups of  
40 trials have been carried out: “non-choice” test, “choice” test, and study of parasitic behavior. In  
41 all the trials the eggs of the pest specie were compared with the rearing host of the parasitoids:  
42 *Ephestia kuehniella*. In the results, “no choice” test, *T. achaeae* parasitized significantly more  
43 eggs of both species than *T. cacoeciae*. Thus, total egg mortality in *P. operculella* was  $92.78 \pm$   
44  $13.47\%$  by *T. achaeae* versus  $70.88 \pm 15.11\%$  by *T. cacoeciae*. In turn, in the “choice” test, it  
45 was found that adult females of both parasitoid species preferred *P. operculella* eggs ( $\beta_2 =$   
46  $0.58 \pm 0.10$  y  $\beta_2 = 0.61 \pm 0.17$  para *T. achaeae* y *T. cacoeciae*, respectively). Finally, in the  
47 parasitic behavior test, it was found that *T. cacoeciae* showed significantly shorter host  
48 searching times and shorter host handling times than *T. achaeae*. Both *Trichogramma* species  
49 seem to be good candidates as biological control agents of *P. operculella*, which must be  
50 subsequently confirmed by field and warehouse trials.

Comentado [TCG7]: Corrección nueva de los autores.

51 **Key words:** egg parasitoids, host selection, host acceptance, foraging behavior, searching time,  
52 handling time.

## 53 **Introducción**

54 La patata (*Solanum tuberosum* L.) está ~~considerado~~ ~~considerada~~ como uno de los cuatro  
55 cultivos más importantes para la alimentación humana, con una producción mundial de 195  
56 millones de toneladas y una superficie ~~cultivada~~ de 19 millones de hectáreas (FAOSTAT,  
57 2018).

Comentado [TCG8]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG9]: Revisor 2: ACEPTADO.

58 Las plagas que actualmente ocasionan mayores pérdidas económicas en el cultivo de  
59 patata en España son las denominadas “polilla común de la patata” *Phthorimaea operculella*  
60 (Zeller) (Lep.: Gelechiidae) y “polilla guatemalteca de la patata” *Tecia solanivora* (Povolný)  
61 (Lep.: Gelechiidae).

62 De ellas, *T. solanivora* fue detectada en Canarias en 1999, llegando a producir pérdidas  
63 cercanas al 50% de la producción total en algunas campañas (Trujillo-García y Perera-  
64 González, 2017). ~~Más recientemente en~~ En la Península, esta plaga se detectó por primera vez en  
65 septiembre de 2015 en varios términos municipales de las provincias de A Coruña y Lugo  
66 (Galicia); así como en el Principado de Asturias (MAPAMA 2017).

Comentado [TCG10]: Revisor 2: ACEPTADO.

67 A su vez, la “polilla común de la patata” es una de las plagas más importantes de los  
68 cultivos de patata a nivel mundial, ~~donde puede~~ ~~dediando~~ llegar a producir hasta un 80% de  
69 pérdidas en campo, así como daños importantes durante el almacenamiento (Rondon, 2010).

Comentado [TCG11]: Revisor 2: ACEPTADO.

70 Es una especie cosmopolita que está ampliamente extendida en los cinco continentes  
71 (EPPO, 2015); así como en todas las zonas de cultivo de patata del territorio español.

72 En España, *P. operculella* se citó ~~por primera vez~~, en el año 1925 en Valencia, aunque  
73 posiblemente llevase más tiempo en la Península Ibérica (García-Mercet, 1925). Sus larvas  
74 forman galerías en el interior de los tubérculos, inutilizándolos para el consumo. Además,  
75 perforan los tallos y hojas de la planta, debilitándola y reduciendo los rendimientos, aunque los

Comentado [TCG12]: Revisor 2: ACEPTADO.

76 daños más importantes se producen después de la cosecha, cuando se almacenan los tubérculos  
77 (Kroschel y Schaub, 2013).

78 Hasta la fecha, el control químico con insecticidas ha dado buenos resultados para  
79 controlar la “polilla común de la patata” en campo y **en** almacenamiento (Trujillo-García y  
80 Perera-González, 2014). Sin embargo, la aparición de resistencia **a** insecticidas, conjuntamente  
81 con la cada vez más restrictiva lista de sustancias activas permitidas y la importancia de los  
82 residuos químicos en las hortalizas, hace que cada vez se tengan más en cuenta otros tipos de  
83 alternativas, como el uso de agentes de control biológico (Perera-González *et al.*, 2009).

84 Las liberaciones de himenópteros parasitoides oófagos del género *Trichogramma*  
85 Westwood (Hym., Trichogrammatidae), constituyen un importante componente en los  
86 programas de manejo integrado de plagas para el control biológico de lepidópteros (Mills,  
87 2010). Así, las especies de *Trichogramma* son los parasitoides más empleados como agentes  
88 de control biológico de especies plaga en cultivos y masas forestales a nivel mundial debido a  
89 su efectividad, **por a** la facilidad para su producción en biofábricas **a** bajos costes **y** a su amplio  
90 rango de especies huésped (Cabello, 1985). Varias especies de este género son liberadas **a**  
91 **anualmente a nivel mundial y anualmente, en el mundo** en más de 33 millones de hectáreas **en**  
92 **de** diferentes cultivos; ello para el control biológico de diversas especies plaga de lepidópteros  
93 (Hajek y Eilenberg, 2018).

94 Por otra parte, existen pocos antecedentes disponibles sobre aspectos relacionados con  
95 especies de *Trichogramma* como parasitoides de *P. operculella*. Se ha citado el potencial  
96 biótico de algunas especies de este género para controlar la plaga, como p. ej. *T. pretiosum*  
97 (Riley), *T. cacoeciae* (Marchal), *T. evanescens*, (Westwood) y *T. brasiliensis* (Ashmead)  
98 (Harwalkar *et al.* 1987; Pratisoli y Parra, 2000; Saour *et al.*, 2004). Además, especies no  
99 identificadas de este género han **a**parecido en prospecciones de enemigos naturales de la “polilla  
100 de la patata” en Colombia (Kroschel y Schaub, 2013).

Comentado [TCG13]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG14]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG15]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG16]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG17]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG18]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG19]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG20]: Revisor 2: ACEPTADO.

101 No es la primera vez que se utiliza **especies de *Trichogramma*** **en** el control biológico  
102 de la “polilla común de la patata” en España. Así, Urquijo (1944) introdujo desde Estados  
103 Unidos de América y llevó a cabo la cría en masa de *T. minutum* y *T. pretiosum* en la antigua  
104 Estación Fitopatológica de A Coruña. **De ellas, rR** realizó sueltas de *T. minutum* en más de 44  
105 parcelas con cultivo comercial en las zonas costeras de Galicia, desde Muros (A Coruña) **h** hasta  
106 la desembocadura del Miño (Pontevedra). Los resultados, en los casos **en los** que se dispuso de  
107 datos, fueron muy buenos con un resultado favorable de control en el 54,6% de los casos, no  
108 favorable en el 29,5% y dudoso en el resto (15,9%). Asimismo, este autor destacó la  
109 importancia de la coincidencia de dichas liberaciones con los máximos de oviposición de los  
110 adultos de la “polilla común de la patata”.

111 En el presente trabajo, dos especies autóctonas de *Trichogramma* fueron evaluadas en  
112 condiciones de laboratorio mediante el estudio del parasitismo, emergencia, desarrollo, elección  
113 de huésped en condiciones de “no-elección” y “elección” **así como por el estudio del**  
114 comportamiento de parasitación. Todo ello con el objetivo de seleccionar la especie de  
115 parasitoide de huevos con mejor potencial biótico para el control de la “polilla común de la  
116 patata”. En este sentido, hay que señalar que el parasitismo y la idoneidad de los huevos de  
117 especies plaga, usualmente determinado mediante el porcentaje de huevos parasitados y el  
118 número de adultos emergidos, entre otros parámetros, son fundamentales para la selección de  
119 un buen agente de control biológico (Hou *et al.*, 2018).

## 120 **Material y métodos**

### 121 ***Material biológico y condiciones experimentales***

122 Los ejemplares de los parasitoides *T. achaeae* y *T. cacoeciae*, utilizados en los ensayos,  
123 se obtuvieron de poblaciones naturales de huevos parasitados de lepidópteros y hemípteros  
124 Scutelleridae en las localizaciones de Fuencaliente (Isla de la Palma, España) (28° 28' 43" N,  
125 17° 51' 42" W) y Sierra de Cazorla (Jaén, España) (37°47'43.2" N, 2°54'26.9" W),

Comentado [TCG21]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG22]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG23]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG24]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG25]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG26]: Revisor 2: ACEPTADO.

126 respectivamente. Posteriormente, dichas especies fueron mantenidas artificialmente en el  
127 laboratorio de Entomología Agrícola de la Universidad de Almería durante 9 y 6 años,  
128 respectivamente, antes del inicio de los ensayos.

Comentado [TCG27]: Revisor 2: ACEPTADO.

129 Para la cría se utilizaron huevos de la “polilla mediterránea de la harina”, *Ephesia*  
130 *kuehniella* (Zeller) (Lep., Pyralidae) siguiendo la metodología descrita por Cabello (1985). Para  
131 ello, en dos cartulinas de 2 x 7 cm, se adhirieron aproximadamente 2000 huevos con agua y se  
132 introdujeron en tubos de plástico de 130 ml donde se encontraban los parasitoides adultos en  
133 proporción de 1:4 (adultos del parasitoide:huevos huéspedes), como alimento se aportó una  
134 línea fina de miel aplicada con una aguja.

135 La población de *P. operculella*, fue criada en el mismo laboratorio y se inició con  
136 ejemplares suministrados por el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Almería (Junta de  
137 Andalucía, España). La cría ~~de *P. operculella*~~ se realizó siguiendo la metodología descrita por  
138 Fenemore (1977) utilizando patatas pequeñas, tipo guarnición, como alimento para las larvas.  
139 Para que se iniciase el desarrollo larvario sobre las patatas, discos de papel de filtro con huevos  
140 de la polilla provenientes de las cámaras de apareamiento y oviposición de los adultos  
141 (aproximadamente 20 parejas de adultos confinadas en vasos de plástico de 1000 ml de volumen  
142 cerrados con goma elástica y gasa quirúrgica) se dejaban en contacto con los tubérculos  
143 previamente agujereados superficialmente para facilitar la penetración de las larvas neonatas.  
144 Además, disponían de una capa de vermiculita para favorecer su posterior transformación en  
145 pupa. Una vez completado el desarrollo larvario, el sustrato era tamizado para retirar las pupas  
146 y colocarlas nuevamente en cámaras de oviposición hasta la emergencia de los adultos.

Comentado [TCG28]: Revisor 2: ACEPTADO.

147 En todos los casos anteriores, las poblaciones de insectos fueron criadas en condiciones  
148 climáticas controladas a 25±1°C, 60-80% de humedad relativa (H.R.) y fotoperiodo de 16:8  
149 (L:O). A su vez, los huevos de *E. kuehniella* (irradiados con luz UV) empleados en los

150 diferentes ensayos fueron suministrados semanalmente por la empresa Biotop® (Valbonne,  
151 Francia).

### 152 **Ensayo de “no elección” de huésped**

153 Se realizó un primer ensayo del tipo “no elección” en el que se evaluaron la aceptación  
154 y parasitación por parte de las dos especies de *Trichogramma* ~~en especies sobre~~ *P. operculella*  
155 y *E. kuehniella* (este último, huésped habitual de cría). Para ello, se utilizaron hembras de *T.*  
156 *achaeae* (previamente apareadas) o *T. cacoeciae* que fueron colocadas individualmente en  
157 tubos de ensayo (7 cm x 1 cm de diámetro). A continuación, en cada tubo de ensayo se introdujo  
158 una cartulina blanca (0,9 x 5,0 cm) que llevaba adheridos 15 huevos de *E. kuehniella* o de *P.*  
159 *operculella*; también, en dicho momento, se aportó (sobre las paredes del tubo de ensayo) unas  
160 gotas de miel (como alimento de las hembras). Los tubos de ensayo fueron posteriormente  
161 tapados con algodón y ~~a las hembras fueron dejadas~~ ~~les permitió~~ parasitar durante 24 horas,  
162 en las condiciones ambientales anteriormente indicadas.

163 El diseño experimental fue univariante factorial, totalmente aleatorio, con dos factores  
164 implicados: especie de parasitoide (a dos niveles: *T. achaeae* y *T. cacoeciae*) y especie de huevo  
165 huésped (a dos niveles: *P. operculella* y *E. kuehniella*); el número de repeticiones fue variable  
166 de 10 a 19 por tratamiento. Al final del ensayo, los datos recogidos fueron: (1) ~~el~~ porcentaje de  
167 parasitismo aparente (huevos huéspedes parasitados que viraron a color negro; respecto a los  
168 huevos no parasitados que quedaban de color blanco-anacarado), (2) porcentaje de mortalidad  
169 total (por parasitismo y por depredación; en este caso, por alimentación en el huevo huésped,  
170 “host-feeding”, por parte de la hembra, sin llegar a ser parasitados) y (3) emergencia de adultos  
171 del parasitoide correspondiente ( $F_1$ ). Los valores del número de huevos huéspedes parasitados  
172 fueron analizados estadísticamente mediante modelo lineal generalizado (MLGZ) con la  
173 distribución de Poisson y la función de enlace logaritmo; a su vez, los valores medios fueron

Comentado [TCG29]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG30]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG31]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG32]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG33]: Revisor 2: ACEPTADO.

174 comparados por pares mediante el test de Wald. Para ello se usó el software estadístico IBM  
175 SPSS versión 23.

### 176 ***Ensayo de “elección” de huésped***

177 El segundo ensayo fue del tipo “elección”. Para ello, se siguió la misma metodología  
178 anteriormente señalada, ~~pero~~ con la excepción de que a cada hembra aislada de *Trichogramma*  
179 se le ofrecieron, simultáneamente, huevos de ~~las los dos especies de huevo~~ huéspedes, *E.*  
180 *kuehniella* y *P. operculella*, a las densidades de 8 huevos ~~huéspedes de cada una de ambas~~  
181 ~~especies~~ *ellas*. El diseño experimental fue univariante factorial, totalmente aleatorio, con dos  
182 factores implicados: especie de parasitoide (a dos niveles: *T. achaeae* y *T. cacoeciae*) y especie  
183 de huevo huésped (a dos niveles: *P. operculella* y *E. kuehniella*). Al final del ensayo se registró  
184 el número de huevos huéspedes parasitados. Estos datos se analizaron estadísticamente  
185 mediante el modelo lineal generalizado (MLGZ). Las medias se compararon usando el mismo  
186 test y software estadístico antes indicado. En este ensayo, el número de repeticiones por  
187 tratamiento fue de 20.

188 Se evaluó también la preferencia de las hembras de cada especie de *Trichogramma* por  
189 los huevos de las dos especies huéspedes. Para ello se utilizó el índice de preferencia de Manly  
190 ( $\beta_2$ ) (Manly *et al.*, 1972). La expresión de dicho índice, según Chesson (1983), fue la siguiente:

$$191 \quad \beta_2 = \frac{\text{Ln} \frac{(n_i - r_i)}{n_i}}{\sum_{i=1}^{i=2} \text{Ln} \frac{(n_i - r_i)}{n_i}}$$

192  
193 donde  $\beta_2$  es el índice de preferencia de Manly (sin reposición),  $r_i$  es el número de huevos  
194 huéspedes parasitados y  $n_i$  es el número de huevos huéspedes ofertados;  $i = 1$  y  $2$ , representa  
195 las dos diferentes especies de huevos huésped utilizados. Hay que señalar que cuando el valor  
196 del índice de preferencia de Manly es  $\beta_2 > 0,5$  indica preferencia, indiferencia cuando  $\beta_2 = 0,5$   
197 y rechazo si  $\beta_2 < 0,5$ . Los valores del índice de Manly, obtenidos para cada especie de

Comentado [TCG34]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG35]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG36]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG37]: Revisor 2: ACEPTADO.

198 *Trichogramma*, especie de huésped y repetición fueron analizados estadísticamente mediante  
199 el test de Wilcoxon usando el mismo software estadístico antes indicado.

Comentado [TCG38]: Revisor 2: ACEPTADO.

#### 200 ***Estudio del comportamiento de parasitación del huésped***

201 A una hembra aislada de cada especie de parasitoide se le ofreció una cantidad de 5  
202 huevos de *E. kuehniella* o de *P. operculella*, en tandas por separado, pegados con agua en papel  
203 vegetal (círculo de diámetro = 3 cm) y una distribución tipo “cinco de oros” (“patch” o parche).  
204 Para ello, cada hembra y patch de huevos huéspedes fueron colocados dentro de una placa Petri  
205 de vidrio (diámetro = 3 cm), permitiendo la parasitación durante 1 hora.

206 El diseño experimental fue univariante factorial, no totalmente aleatorio, con tres  
207 factores implicados: especie de parasitoide (a dos niveles: *T. achaeae* y *T. cacoeciae*), especie  
208 de huevo huésped (a dos niveles: *P. operculella* y *E. kuehniella*) y orden de parasitación de los  
209 huevos huéspedes (a 5 niveles).

210 En este ensayo, los valores medidos fueron el tiempo empleado en la búsqueda del  
211 huevo huésped dentro del “patch” o parche ( $T_s$ ) y el tiempo de manipulación del huésped ( $T_h$ )  
212 que corresponde a la suma de los tiempos empleados en la secuencia de oviposición estándar  
213 de las hembras adultas de *Trichogramma*: (1) primer contacto con el huésped mediante las  
214 antenas; (2) examen de la superficie del huevo huésped mediante las antenas antes de su  
215 perforación con el ovipositor; (3) perforación (punción con éxito del corion del huésped); (4)  
216 inserción completa del ovipositor y movimiento abdominal (pero antes del bombeo abdominal  
217 del huevo propio), y (5) oviposición (deposición del huevo propio en el huevo huésped)  
218 (Nurindah *et al.*, 1999a).

Comentado [TCG39]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG40]: Revisor 2: ACEPTADO.

219 Hay que señalar que la observación directa del comportamiento por parte de un  
220 observador humano puede causar interferencias en el comportamiento del animal observado y  
221 comprometer así la validez de los datos como ha sido señalado por Wade *et al.* (2005). Por este  
222 motivo y para facilitar el procesado de recogida de la información, en dichas condiciones y sin

Comentado [TCG41]: Revisor 2: ACEPTADO.

interferencia humana, se tomó una foto cada 10 segundos durante la realización de los ensayos mediante una cámara digital Eos 550D® (Canon), lente: EFS 18-55 con función macro y dotada de un tubo de extensión de 12 mm para permitir una menor distancia de enfoque. La cámara se conectó mediante cable a un ordenador mediante el software “communication software for the camera EOS utility”, versión 2.14. Se utilizó iluminación diascópica (luz transmitida) para obtener las fotografías. Debido al tipo de lente utilizada y la resolución en píxeles necesarios, solo se pudieron capturar las imágenes de 6 arenas al mismo tiempo. Por este motivo el proceso se debió repetir durante varios días; en cada sesión de fotos se dispusieron al azar los distintos tratamientos y repeticiones utilizadas. Ya que el ensayo no pudo realizarse al mismo tiempo, las repeticiones son en realidad pseudo-repeticiones y como tales fueron tratadas en los análisis estadísticos llevados a cabo tal y como se explica más adelante. Las fotografías, después de tomadas, fueron montadas secuencialmente mediante el software Virtual Dub versión 1.49 lo que permitió la visualización del comportamiento y **la anotación** los tiempos empleados por cada uno de los parasitoides en función de la especie huésped en cada repetición.

Como se ha comentado en el párrafo anterior, debido a tener que llevar a cabo el ensayo en diferentes días, las repeticiones de los tratamientos no representan verdaderas repeticiones en un diseño totalmente aleatorio. Esto es frecuente en estudios de comportamiento de insectos. Ante dicha situación no son de aplicación los clásicos análisis estadísticos mediante el análisis de la varianza (ANOVA), ni los más recientes de modelo lineal general (MLG). En cambio, sí le son de aplicación los modelos lineales generalizados (MLGZ) (Ricard, 2008). Por este motivo, se aplicaron MLGZ en los análisis estadísticos de los tiempos registrados ( $T_s$  y  $T_h$ ), utilizando la función de distribución gamma y función de enlace logaritmo, con el mismo software estadístico anteriormente indicado. El número de pseudo-repeticiones fue variable de 11 a 24 por tratamiento.

## Resultados

Comentado [TCG42]: Revisor 2: ACEPTADO.

### Ensayo de “no elección” de huésped

En la de la Tabla 1 (parte superior) se recogen los valores medios del número de huevos parasitados, en el ensayo de “no elección” de huésped por las hembras adultas de *T. achaeae* frente a *T. cacoeciae*, según la especie parasitada. A su vez, en la Figura 1 se representan dichos valores expresados en porcentaje.

En el análisis estadístico se presentó una alta significación estadística del modelo (Prueba Ómnibus:  $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 10,681; g.l. = 3,  $P = 0,014$ ). En las pruebas de efectos del modelo se encontró significación estadística de la especie de parasitoide ( $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 4,661, g.l. = 1;  $P = 0,031$ ) y de la especie de huésped ( $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 3,953, g.l. = 1;  $P = 0,047$ ); pero no de su interacción ( $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 1,468, g.l. = 1;  $P = 0,226$ ).

En la Figura 2 se muestra la mortalidad total causada por cada especie de parasitoide que engloba a los huevos muertos a consecuencia del parasitismo y de la depredación o “host-feeding”, en ambos casos por hembra. Dicha mortalidad total fue mayor para *T. achaeae*, independientemente del tipo de huésped. Para los huevos huéspedes de la “polilla común de la patata” dicho valor fue del  $92,78 \pm 13,47\%$  para *T. achaeae* frente al  $70,88 \pm 15,11\%$  para *T. cacoeciae*.

En la Figura 3 se muestra la emergencia de adultos según especie de huésped y especie de *Trichogramma* empleada. El porcentaje de adultos emergidos (generación  $F_1$ ) fue mayor para la especie *T. achaeae* que para *T. cacoeciae*.

Se puede observar que las hembras adultas de ambas especies de parasitoides aceptaron como huésped y consiguieron un desarrollo completo en los huevos de la plaga *P. operculella* (Tabla 1, Figura 3).

### Ensayo de “no elección” de huésped

Comentado [TCG43]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG44]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG45]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG46]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG47]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG48]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG49]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG50]: Corrección nueva de los autores

272 Los datos obtenidos para el número de huevos parasitados en el ensayo de “elección”  
273 (preferencia) se recogen en la Tabla 1(parte inferior). En el análisis estadístico se presentó una  
274 alta significación estadística del modelo (Prueba Ómnibus:  $\chi^2$  de razón de verosimilitud =  
275 12,247; g.l. = 3,  $P = 0,007$ ). En las pruebas de efectos del modelo se encontró también alta  
276 significación estadística de la especie de parasitoide ( $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 8,906, g.l.  
277 = 1;  $P = 0,003$ ); pero no de la especie ~~de huevos~~ huésped ( $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 3,350,  
278 g.l. = 1;  $P = 0,067$ ) ni de su interacción ( $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 0,028, g.l. = 1;  $P =$   
279 0,867).

Comentado [TCG51]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG52]: Revisor 2: ACEPTADO.

280 Puede observarse cómo *T. cacoeciae* parasitó significativamente un mayor número de  
281 huevos de *P. operculella* ( $6,70 \pm 0,58$ ) respecto a *T. achaeae* ( $5,10 \pm 0,51$ ).

282 Las hembras adultas de *T. achaeae* presentaron una preferencia por los huevos de *P.*  
283 *operculella* ( $\beta_2 = 0,58 \pm 0,10$ ) respecto a los de *E. kuehniella* ( $\beta_2 = 0,42 \pm 0,10$ ) ( $Z = -2,772$ ,  $P =$   
284 0,006). Similar preferencia ~~mostró-mostraron~~ las hembras adultas de *T. cacoeciae* por los  
285 huevos de *P. operculella* ( $\beta_2 = 0,61 \pm 0,17$ ) respecto a los de *E. kuehniella* ( $\beta_2 = 0,39 \pm 0,17$ ) ( $Z =$   
286 -2,501,  $P = 0,012$ ).

Comentado [TCG53]: Revisor 2: ACEPTADO.

### 287 **Comportamiento de parasitación**

288 Los valores de  $T_s$  y  $T_h$  encontrados para las dos especies de *Trichogramma* en relación  
289 al huésped *E. kuehniella* se recogen en las Figuras 4A y 5A. A su vez, los valores  
290 correspondientes para *P. operculella* se muestran en las Figuras 4B y 5B.

291 En el análisis estadístico mediante MLGZ del tiempo de búsqueda ( $T_s$ ); ~~mediante~~  
292 ~~MLGZ~~, se encontró una alta significación del modelo (Prueba ómnibus:  $\chi^2$  de razón de  
293 verosimilitud = 324,882, g.l. = 19,  $P < 0,0001$ ); en las pruebas de los efectos del modelo se  
294 encontraron efectos altamente significativos de la especie de parasitoide ( $\chi^2$  de razón de  
295 verosimilitud = 124,754, g.l. = 1,  $P < 0,0001$ ), especie ~~de huevo~~ huésped ( $\chi^2$  de razón de  
296 verosimilitud = 139,421, g.l. = 1,  $P < 0,0001$ ) y orden de parasitación del huésped ( $\chi^2$  de razón

Comentado [TCG54]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG55]: Revisor 2: ACEPTADO.

de verosimilitud = 341,602, g.l. = 4,  $P < 0,0001$ ), así como de las interacciones parasitoide\*huésped ( $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 124,754, g.l. = 1,  $P < 0,0001$ ), parasitoide\*orden ( $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 237,311, g.l. = 4,  $P < 0,0001$ ), huésped\*orden ( $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 135,774, g.l. = 4,  $P < 0,0001$ ) y parasitoide\*huésped\*orden ( $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 148,462, g.l. = 4,  $P < 0,0001$ ). De sus análisis se observa un comportamiento de búsqueda del huésped muy diferente entre ambas especies de parasitoides, así como el hecho de estar muy condicionado por la especie de huevo parasitado y el orden de parasitación. No obstante, a efectos globales, los valores medios del tiempo de búsqueda no presentaron diferencias significativas entre las dos especies de parasitoides ( $\chi^2$  de Wald = 0,763; g.l. = 1;  $P = 0,382$ ). Así, el valor medio para *T. achaeae* fue de 1,67±0,12 min y para *T. cacoeciae* de 1,51±0,15 min.

Comentado [TCG56]: Revisor 2: ACEPTADO.

Sin embargo, si se tiene en cuenta el orden de parasitación, sí se presentaron marcadas diferencias. En este sentido, hay que señalar que el  $T_s$  del huevo parasitado en primer lugar por *T. achaeae* fue, tanto para el huevo huésped de *E. kuehniella* (21,15±4,24 min) como para *P. operculella* (13,88±2,99 min), significativamente mayores que el empleado por *T. cacoeciae* para ambos huéspedes y número de orden (1,91±0,52 y 2,01±0,60 min, respectivamente) ( $\chi^2$  de Wald = 111,883; g.l. = 19;  $P < 0,0001$ ) (Figuras 4A y B).

Comentado [TCG58]: Revisor 2: ACEPTADO.

A su vez, en el análisis estadístico mediante MLGZ del tiempo de manipulación ( $T_h$ ) se encontró una alta significación del modelo (Prueba ómnibus:  $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 138,780, g.l. = 19,  $P < 0,0001$ ); en las pruebas de los efectos del modelo se encontraron efectos altamente significativos de la especie de parasitoide ( $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 14,863, g.l. = 1,  $P < 0,0001$ ) y orden de parasitación del huésped ( $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 94,188, g.l. = 4,  $P < 0,0001$ ), así como de las interacciones parasitoide\*huésped ( $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 8,163, g.l. = 1,  $P = 0,004$ ), y parasitoide\*orden ( $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 10,073, g.l. = 4,  $P = 0,039$ ). Sin embargo, pero no se encontraron efectos significativos de la

Comentado [TCG60]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG61]: Revisor 2: ACEPTADO.

322 especie ~~de huevo~~ huésped ( $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 0,001, g.l. = 1,  $P$  = 0,977),  
323 huésped\*orden ( $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 3,398, g.l. = 4,  $P$  = 0,494) y  
324 parasitoide\*huésped\*orden ( $\chi^2$  de razón de verosimilitud = 2,063, g.l. = 4,  $P$  = 0,724). A  
325 diferencia de lo encontrado en el  $T_s$ , parece que los tiempos de manipulación del huevo huésped,  
326 por ambas especies de *Trichogramma*, presentaron menos variabilidad.

Comentado [TCG62]: Revisor 2: ACEPTADO.

327 El promedio del tiempo de manipulación en función de la especie de *Trichogramma*  
328 fue de 4,18±0,14 min para *T. achaeae* y de 3,32±0,16 min para *T. cacoeciae*, con diferencias  
329 altamente significativas entre dichos valores ( $\chi^2$  de Wald = 16,427; g.l. = 1;  $P$  < 0,0001). Sin  
330 embargo, no hubo diferencias significativas entre los valores medios encontrados para el huevo  
331 huésped *E. kuehniella* (3,72±0,15 min) y el de *P. operculella* (3,73±0,15 min) ( $\chi^2$  de Wald =  
332 0,001; g.l. = 1;  $P$  = 0,977). Ello parece indicar un comportamiento de parasitación distinto entre

Comentado [TCG63]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG64]: Revisor 2: ACEPTADO.

333 *T. achaeae* y *T. cacoeciae*, más debido ~~para~~ las características propias de las hembras de cada  
334 especie e independiente del huevo huésped. Según los datos obtenidos (Figuras 5A y B), se  
335 debe señalar que las hembras de *T. achaeae* emplearon un  $T_h$  (4,54±0,23 min) en huevos de *P.*  
336 *operculella* significativamente mayor que ~~para las de~~ *T. cacoeciae* (3,06±0,20 min); pero no  
337 con relación al otro ~~huevo~~ huésped ( $\chi^2$  de Wald = 24,568; g.l. = 3;  $P$  < 0,0001). A su vez, se  
338 puede observar, en ambas especies de parasitoides y ambas especies de huevos huéspedes, que  
339 el valor medio del  $T_h$  decreció a medida que las hembras adultas fueron parasitando los huevos.

Comentado [TCG65]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG66]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG67]: Revisor 2: ACEPTADO.

340 Así, el valor medio para todas las especies fue de 6,39±0,39 min ~~para~~ para el primer huevo,  
341 disminuyendo significativamente hasta los 2,87±0,21 min en el quinto huevo huésped ( $\chi^2$  de  
342 Wald = 66,421; g.l. = 4;  $P$  < 0,0001). Este hecho fue más acusado ~~para sobre el huésped P.~~  
343 *operculella* que ~~para sobre~~ *E. kuehniella* (Figuras 5A y B).

Comentado [TCG68]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG69]: Revisor 2: ACEPTADO.

## 344 **Discusión**

345 ~~Como se indicó en la Introducción, n~~ No es la primera vez que se aborda el control  
346 biológico de la “polilla común de la patata” mediante especies de *Trichogramma*. Así, el

Comentado [TCG70]: Revisor 2: ACEPTADO.

347 presente trabajo se puede considerar una continuación de dicha línea con la diferencia, en el  
348 presente caso, de que se aborda el control biológico de la especie plaga con especies autóctonas  
349 de este género de parasitoides de huevosoófagos.

Comentado [TCG71]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG72]: Revisor 2: ACEPTADO.

350 De los resultados encontrados en el ensayo de “no elección” demuestran la capacidad  
351 de reconocimiento y aceptación de los huevos de *P. operculella* como huésped por parte de las  
352 especies de *Trichogramma* estudiadas. Para ambas especies de parasitoides, el número de  
353 huevos parasitados de la plaga supera a los del huésped habitualmente empleado para la cría.  
354 *E. kuehniella* (Tabla 1). Además, en este mismo ensayo se ha constatado cómo las dos especies  
355 de *Trichogramma* consiguen completar su desarrollo dentro del huevo plaga con un buen  
356 porcentaje de emergencia, lo cual es un indicativo de la idoneidad del huésped, ya que ésta hace  
357 referencia a la capacidad del parasitoide para completar el desarrollo usando el huésped en  
358 cuestión (Pak, 1990).

Comentado [TCG73]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG74]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG75]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG76]: Revisor 2: ACEPTADO.

359 Por otra parte, la emergencia de adultos, en ambos huéspedes, presentó diferencias  
360 significativas en ambas especies de parasitoides (Figura 3). Con relación a este parámetro  
361 autores como van Lenteren (1980) no consideran la idoneidad del huésped como un criterio  
362 importante para la selección de enemigos naturales que van a ser liberados en sueltas  
363 inundativas, siempre y cuando la acción de los parasitoides conlleve la muerte del huésped,  
364 aunque éstos no lleguen a desarrollarse. Por el contrario, hay otros autores que sostienen que si  
365 los huevos plaga no mueren cuando son atacados, la emergencia debería ser considerada un  
366 criterio en la selección del enemigo natural (Pak *et al.* 1990; Hou *et al.*, 2018).

Comentado [TCG77]: Revisor 2: ACEPTADO.

367 En línea con estas argumentaciones, cabe destacar que en la mortalidad total causada  
368 por el parasitismo y el “host feeding”, es particularmente importante en la especie de  
369 parasitoide para *T. achaeae* frente a *T. cacoeciae*. En ambos casos, el porcentaje de “host  
370 feeding” es similar, en torno al 12 %, por lo que las diferencias en la mortalidad se deben a un  
371 mayor parasitismo por parte de *T. achaeae*. En algunas especies de *Trichogramma*, el “host

Comentado [TCG78]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG79]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG80]: Revisor 2: ACEPTADO.

372 feeding” contribuye significativamente al control de la plaga (Vasquez *et al.*, 1997). En el caso  
373 de *T. achaeae*, usado para el control de *T. absoluta* en invernaderos, se ha demostrado la  
374 importancia de la mortalidad causada por el parasitoide sin que este llegue a desarrollarse en el  
375 huevo huésped (“host-feeding”), siendo un mecanismo importante para en el control de la plaga  
376 (Cabello *et al.*, 2009; Cabello *et al.*, 2012).

377 En principio, la “polilla común de la patata” puede ser ~~considerado~~ ~~considerada~~ como  
378 un buen huésped para *Trichogramma* spp. ~~En parte,~~ debido al tamaño de su huevo, ~~tal y~~  
379 como se ha indicado en los resultados, ~~que~~ es ligeramente superior al del huésped de cría *E.*  
380 *kuehniella*, que presenta valores de longitud y anchura inferiores a las 600 y 300  $\mu\text{m}$ ,  
381 respectivamente (Cabello *et al.*, 2009).

382 Los resultados encontrados no nos deben extrañar ~~y es que,~~ *Trichogramma* es un género  
383 compuesto por parasitoides generalistas y altamente polífagos (Cabello 1985; Polaszek, 2010).

384 Sin embargo, el nivel de parasitismo puede variar ~~entre diferentes especies de huevos huéspedes.~~  
385 ~~Ello,~~ debido a factores como ~~son:~~ la preferencia del parasitoide ~~o el;~~ estado, tamaño y edad del  
386 huevo huésped, ~~entre otros~~ (Pak, 1988; Monje *et al.*, 1999; Chailleux *et al.*, 2012; Pizzol *et*  
387 *al.*, 2012; Du *et al.*, 2018).

388 En el presente estudio, las dos especies de *Trichogramma* evaluadas prefirieron los  
389 huevos de *P. operculella* frente a los de *E. kuehniella*, como se refleja observando los valores  
390 de huevos parasitados con síntomas de parasitismo aparente (viran a color negro) y del índice  
391 de preferencia de Manly.

392 Por otra parte, parecería que los huevos de la plaga son un huésped menos idóneo que  
393 ~~la los de~~ *E. kuehniella* debido a que emergieron un menor número de adultos de los huevos  
394 parasitados de la “polilla de la patata” frente a los del huésped de cría. Esto puede deberse a  
395 una baja calidad nutricional del huevo huésped que repercute ~~en~~ el desarrollo larvario de  
396 *Trichogramma* (Huang *et al.*, 2018) o a la existencia de superparasitismo, ~~que puede~~

Comentado [TCG81]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG82]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG83]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG84]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG85]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG86]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG87]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG88]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG89]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG90]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG91]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG92]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG93]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG94]: Revisor 2: ACEPTADO.

397 incrementar significativamente la mortalidad de la descendencia en parasitoides oófagos, por  
398 competencia intraespecífica (Duval *et al.*, 2018).

399 *T. achaeae* y *T. cacoeciae* aceptan bien los huevos de *P. operculella*. Es la primera vez  
400 que se cita a *T. achaeae* como potencial agente de control de esta especie plaga, según la  
401 bibliografía consultada. Por el contrario, *T. cacoeciae* ya ha sido evaluada en condiciones de  
402 laboratorio y con buenos resultados como potencial agente de control biológico de la “polilla  
403 común de la patata” por Saour (2004).

404 En los resultados obtenidos en los ensayos se ha encontrado que los tiempos de búsqueda  
405 y, en menor medida, los tiempos de manipulación, de las hembras adultas de *T. cacoeciae* eran  
406 menores que los correspondientes a *T. achaeae*. Dichas diferencias pueden ser debidas a la  
407 diferente forma de reproducción de ambas especies [~~Por una parte, se conoce que la primera  
408 presenta una reproducción por partenogénesis telitóquica y ,partenogénesis arrenotóquica,  
409 respectivamente) con presencia en la descendencia de hembras únicamente (Vavre *et al.*, 2004).  
410 Por el contrario, *T. achaeae* se reproduce por partenogénesis arrenotóquica, con existencia de  
411 machos y hembras en la descendencia; los machos son haploides y se desarrollan de óvulos no  
412 fecundados en el interior de la hembra; por el contrario, las hembras son diploides y se  
413 desarrollan de huevos fecundados (determinación del sexo por haplo-diploidia) (Cabello, 1995;  
414 Wajnberg, 2010).~~]

415 Las hembras adultas de *Trichogramma*, con reproducción arrenotóquica, tienen  
416 que decidir, en función del huevo huésped, tamaño del patch, etc. (Wajnberg, 2010) si  
417 ovipositar un óvulo que no sea fecundado (que generará a un macho) o un óvulo fecundado  
418 (que generará a una hembra) (Wajnberg, 1993). Contrariamente, las hembras adultas de *T.*  
419 *cacoeciae* no tiene que hacer dicha asignación del sexo y a que siempre ovipositan óvulos con  
420 embriones diploides viables que dan lugar a hembras. Por ello, sus valores de  $T_s$  y  $T_h$  serían  
421 menores, como se ha encontrado en el presente trabajo.

Comentado [TCG95]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG96]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG97]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG98]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG99]: Revisor 2: corregido

Con formato: Sangría: Primera línea: 1,25 cm

Comentado [TCG100]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG101]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG102]: Revisor 2: ACEPTADO.

## Conclusiones

Los resultados de aceptación, desarrollo en el huésped, preferencia y comportamiento de parasitación por parte de *T. achaeae* y *T. cacoecia* sobre la “polilla común de la patata”, *P. operculella*, muestran que ambas especies de *Trichogramma* son buenas candidatas para el control biológico de la plaga con ciertas peculiaridades. Por una parte, *T. achaeae* parasita más, se desarrolla mejor y causa una mayor mortalidad en los huevos de la “polilla de la patata”. Por otra parte, *T. cacoeciae* encuentra los huevos de la plaga más rápido y los parasita en menor tiempo. En vista a la complementariedad de ambas especies de *Trichogramma*, podría ser interesante plantear el empleo simultáneo de ambas especies. Ese uso simultáneo de varias especies de *Trichogramma* ha sido reportado con anterioridad como exitoso para el control de esta plaga en invernaderos (Zimmerman y Wührer, 2010). Sin embargo, estos resultados deben ser corroborados con posteriores estudios en condiciones de semi-campo y campo; así como en condiciones de almacenamiento de la patata.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado dentro del proyecto titulado: Desarrollo de nuevos métodos para el manejo integrado para las polillas de la patata *Phthorimaea operculella* y *Tecia solanivora* (Ref.: RTA2015-00074-C02-00), financiado en la convocatoria de 2015 de proyectos de investigación fundamental orientada y acciones complementarias en el marco del programa estatal de I+D+I orientada a los retos de la sociedad (reto de seguridad y calidad alimentaria, actividad agraria productiva y sostenible, sostenibilidad de los recursos naturales e investigación marina y marítima). Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y Ministerio de Economía y Competitividad. España.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Referencias bibliográficas

Comentado [TCG103]: Revisor 2: ACEPTADO.

Comentado [TCG104]: Revisor 2: ACEPTADO.

447 Cabello, T. (1985). Biología de dos especies de *Trichogramma* (Hym.: Trichogrammatidae)  
 448 parasitas de *Heliothis* spp. Lep.: Noctuidae) en algodónero. Posibilidades de su empleo  
 449 como agente de control. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, España.

450 Cabello T, Gallego JR, Fernandez FJ, Gamez M, Vila E, del Pino M, Hernandez-Suarez E  
 451 (2012). Biological control strategies for the South American tomato moth (Lep.:  
 452 Gelechiidae) in greenhouse tomatoes. Journal of Economic Entomology 105: 2085-2096.  
 453 Disponible en: <https://doi.org/10.1603/EC12221>

454 Cabello T, Gallego JR, Vila E, Soler A, del Pino M, Carnero A, Hernandez-Suarez E, Polaszek  
 455 A (2009). Biological control of the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta* (Lep.:  
 456 Gelechiidae), with releases of *Trichogramma achaeae* (Hym.: Trichogrammatidae) in  
 457 tomato greenhouses of Spain. IOBC WPRS Bulletin 49: 225-230.

458 Chesson J (1983). The estimation and analysis of preference and its relationship to foraging  
 459 models. Ecology 64(5): 1297-1304. Disponible en: <https://doi.org/10.2307/1937838>

460 Du WM, Xu J, Hou Y-Y, Lin Y, Zang L.-S, Yang X, Desneux N (2018). *Trichogramma*  
 461 parasitoids can distinguish between fertilized and unfertilized host eggs. Journal of Pest  
 462 Science 91(2): 771-780. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0919-z>

463 Duval J-F (2018). Quantification des effets du superparasitisme sur la valeur adaptative et la  
 464 survie des couvées chez *Trichogramma euproctidis* Girault. Tesis Doctoral, Université de  
 465 Montréal, Canada.

466 EPPO (2015). *Phthorimaea operculella* (PHTOOP). EPPO Global Database. Disponible en:  
 467 <https://gd.eppo.int/taxon/PHTOOP> (Consultado: 30 de agosto de 2018).

468 FAOSTAT (2018). Food and Agriculture Organization statistical database. Disponible en:  
 469 <http://www.fao.org/statistics/es/> (Consultado: 30 agosto 2018).

470 Fenemore PG (1977). Oviposition of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* Zell. (Lep.:  
 471 Gelechiidae); fecundity in relation to mated state, age, and pupal weight. New Zealand

Con formato: Español (España)

Código de campo cambiado

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Journal of Zoology 4(2): 187-191. Disponible en:  
<https://doi.org/10.1080/03014223.1977.9517952>

García-Mercet R (1925). La polilla de la patata. Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural 25: 469-476.

Hajek A, Eilenberg J (2018). Natural enemies: an introduction to biological control. 2ª Edición Cambridge University, Cambridge, UK, 439 pp.

Harwalkar MR, Rananavare HD, Rahaikar GW (1987). Development of *Trichogramma brasiliensis* (Hym: Trichogrammatidae) on eggs of radiation sterilized females of potato tuberworm, *Phthorimaea operculella* (Lep.: Gelechiidae). Entomophaga 32(2): 159-162. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/BF02373126>

Hou Y-Y, Yang X, Zang L-S, Zhang C, Monticelli LS, Desneux N (2018). Effect of oriental armyworm *Mythimna separata* egg age on the parasitism and host suitability for five *Trichogramma* species. Journal of Pest Science 91: 1181. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0980-2>

Huang J, Hua HQ, Zhang F, Li YX (2018). Suitability assessment of three *Trichogramma* species in the control of *Mythimna separata* (Lep.: Noctuidae). Journal of Applied Entomology 142(1-2): 131-140. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jen.12414>

Kroschel J, Schaub B (2013). Biology and ecology of potato tuber moths as major pests of potato. En Insect Pests of Potato Global Perspective on Biology and Management, (Eds. Alyokhin A, Giordanengo P, Vincent C), pp. 165-192. Ed Elsevier, Massachusetts, USA.

Manly BFJ, Miller P, Cook LM (1972). Analysis of a selective predation experiment. The American Naturalist 106(952): 719-736. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/2459502>

MAPAMA (2017). Áreas demarcadas de *Tecia solanivora* en España. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad->

Con formato: Español (España)

Código de campo cambiado

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Código de campo cambiado

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

Código de campo cambiado

497 [vegetal/zonasdemarcadasteciaespana-14junio2017\\_tcm30-381566.pdf](#) (Consultado: 4 de  
 498 diciembre de 2018).

499 Mills N (2010). Egg parasitoids in biological control and integrated pest management. En Egg  
 500 parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma* (Eds Consoli FL, Parra JRP,  
 501 Zucchi RA), pp 389-411. Ed Springer, Dordrecht, NL. Disponible en:  
 502 [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9110-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9110-0_15)

503 Nurindah, Bronwen WC, Gordh G (1999a). Experience acquisition by *Trichogramma*  
 504 *australicum* (Hym.: Trichogrammatidae). Australian Journal of Entomology, 38: 115-119.  
 505 Disponible en: <https://doi.org/10.1046/j.1440-6055.1999.00084.x>

506 Nurindah, Cribb BW, Gordh G (1999b). Effects of physiological condition and experience on  
 507 oviposition behaviour of *Trichogramma australicum* Girault (Hym.: Trichogrammatidae)  
 508 on eggs of *Helicoverpa armigera* (Lep.: Noctuidae). Australian Journal of Entomology  
 509 38:104-114. Disponible en: <https://doi.org/10.1046/j.1440-6055.1999.00085.x>

510 Pak GA (1988). Selection of *Trichogramma* for inundative biological control. Tesis Doctoral,  
 511 Wageningen Agricultural University, Netherlands.

512 Pak G (1990). Inundative release of *Trichogramma* for the control of cruciferous lepidoptera:  
 513 preintroductory selection of an effective parasitoid. En Diamondback moth and other  
 514 crucifers pests: Proceedings of the second International Workshop (Ed Talekar NS), pp 297-  
 515 308. Ed Asian vegetable Research and development Center, Tainan, Taiwan,

516 Pak G, Kaskens J, De Jong E (1990). Behavioural variation among strains of *Trichogramma*  
 517 spp.: host-species selection. Entomologia Experimentalis et Applicata 56(1): 91-102.  
 518 Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1990.tb01384.x>

519 Perera-González S, Cubas-Hernández F, Padilla-Cubas Á, Carnero-Hernández A, Hernández-  
 520 Borges J, Asensio Ramos M. (2009). Ensayo de eficacia en el control de la polilla

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

Código de campo cambiado

521 guatemalteca de la patata (*Tecia solanivora*) mediante la aplicación en campo de nematodos  
 522 entomopatógenos. Cabildo Insular de Tenerife, 24 pp.

523 Pizzol J, Desneux N, Wajnberg E, Thiéry D (2012). Parasitoid and host egg ages have  
 524 independent impact on various biological traits in a *Trichogramma* species. Journal of Pest  
 525 Science 85(4): 489-496. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10340-012-0434-1>

526 Polaszek A (2010). Species diversity and host associations of *Trichogramma* in Eurasia. En  
 527 Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma*. (Eds. Consoli FL,  
 528 Parra JRP, Zucchi RA), pp 237-266. Ed. Springer, Dordrecht, NL.

529 Pratisoli D, Parra JRP (2000). Desenvolvimento e exigências térmicas de *Trichogramma*  
 530 *pretiosum* Riley, criados em duas traças do tomateiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira  
 531 35(7): 1281-1288. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2000000700001>

532 Ricard I (2008). Statistical methods for insect choice experiments. Tesis Doctoral, Ecole  
 533 Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH.

534 Rondon SI (2010). The potato tuberworm: a literature review of its biology, ecology, and  
 535 control. American Journal of Potato Research 87(2): 149-166. Disponible en:  
 536 <https://doi.org/10.1007/s12230-009-9123-x>

537 Saour G (2004). Efficacy assessment of some *Trichogramma* species (Hym.:  
 538 Trichogrammatidae) in controlling the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zell.  
 539 (Lep.: Gelechiidae). Journal of Pest Science 77(4): 229-234. Disponible en:  
 540 <https://doi.org/10.1007/s10340-004-0058-1>

541 Trujillo-García E, Perera-González S (2014). Guía de lucha contra las plagas y enfermedades  
 542 de la patata. Cabildo Insular de Tenerife, ES. 24 pp.

543 Trujillo-García E, Perera-González S (2017). Polilla guatemalteca de la pata (*Tecia*  
 544 *solanivora*): identificación y control. Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural,  
 545 Cabildo de Tenerife, ES: 8 pp.

Código de campo cambiado

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Código de campo cambiado

Con formato: Español (España)

Código de campo cambiado

Con formato: Español (España)

Con formato: Español (España)

546 Urquijo, L. (1944). Ensayo del parasito útil *Trichogramma minutum* en la lucha contra la polilla  
 547 de la patata. Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola, 13, 281-300.

548 ~~van Lenteren JC (1980). Evaluation of control capabilities of natural enemies: Does art have~~  
 549 ~~to become science? Netherlands Journal of Zoology 30: 369-381. Disponible en:~~  
 550 ~~<https://doi.org/10.1163/002829679X00467>~~

551 Vasquez LA, Shelton AM, Hoffmann MP, Roush RT (1997). Laboratory evaluation of  
 552 commercial Trichogrammatidae products for potential use against *Plutella xylostella* (L.)  
 553 (Lep.: Plutellidae). Biological Control 9(2): 143-148.

554 ~~Vavre F, Jong JH, Stouthamer R (2004). Cytogenetic mechanism and genetic consequences of~~  
 555 ~~theletoxy in the wasp *Trichogramma cacoeciae*. Heredity 93: 592-596. Disponible en:~~  
 556 ~~<https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800565>~~

557 Wade MR, Zalucki MP, Franzmann BA (2005). Influence of observer presence on pacific  
 558 damsel bug behavior: who is watching whom?. Journal of Insect Behavior 18(5): 651-667.  
 559 Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10905-005-7017-4>

560 Wajnberg E (1993). Genetic variation in sex allocation in a parasitic wasp: variation in sex  
 561 pattern within sequence of oviposition. Entomologia Experimentalis et Applicata 69: 221-  
 562 229. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1993.tb01745.x>

563 Wajnberg E (2010) Genetics of the behavioral ecology of egg parasitoids. En: Egg parasitoids  
 564 in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma* (Eds. Consoli FL, Parra JRP, Zucchi  
 565 RA), pp 149-165. Ed Springer Science+Business Media BV, Dordrecht, NL.

566 Zimmerman O, Wührer B (2010). The South American Tomato Moth, *Tuta absoluta*, a new  
 567 pest in Germany: An assessment of biological control options. Journal of Plant Diseases and  
 568 Protection 117 (2): 88-95.

569

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Código de campo cambiado

Con formato: Tachado

Comentado [TCG105]: Autores: Referencia eliminada al quitarse su cita en el texto eliminado y no ser citada en otros lugares del MS

Con formato: Tachado

Con formato: Tachado

Código de campo cambiado

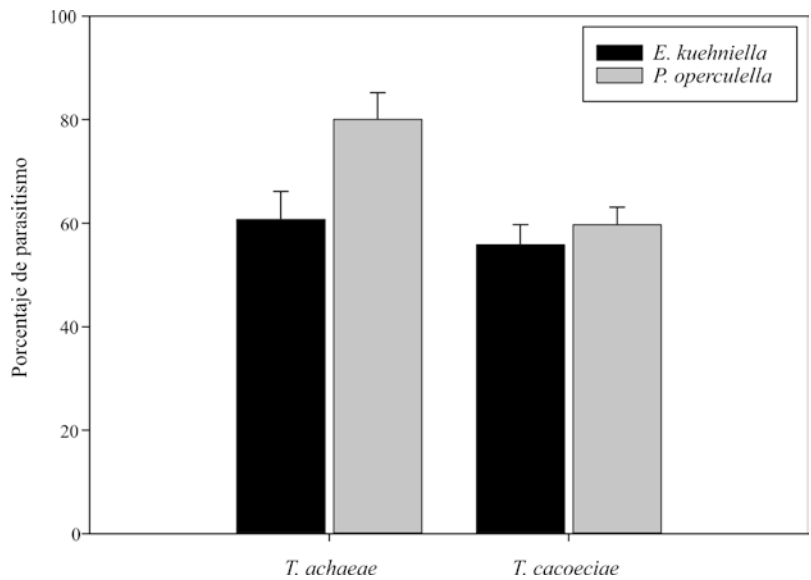
570 **Tabla 1.** Número medio ( $\pm$  E.E) de huevos parasitados (parasitismo aparente) en los ensayos  
571 de “elección” y “no elección”, cuando a las hembras de dos especies de parasitoides (T.  
572 achaeae y T. cacoeciae) se les ofertaron huevos de dos especies huéspedes (E. kuehniella y P.  
573 operculella), llevados a cabo en condiciones de laboratorio ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ; 60-80 % de H.R. y luz  
574 continua) (\* Valores, para cada ensayo, seguidos por distinta letra presenta diferencias  
575 significativas mediante test de Wald de comparación por pares:  $\chi^2$  de Wald = 9,546, g.l. = 3,  
576  $P = 0,023$  y  $\chi^2$  de Wald = 12,318, g.l. = 3,  $P = 0,006$ , respectivamente para el primer y segundo  
577 ensayo).

578 **Table 1.** Mean number ( $\pm$  SE) of parasitized eggs (apparent parasitism) in the "choice" and  
579 "no choice" trials, when eggs of two parasitoid species (T. achaeae and T. cacoeciae) were  
580 offered eggs of two host species (E. kuehniella and P. operculella), carried out under laboratory  
581 conditions ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 60-80% RH and continuous light) (\* Values, for each test, followed by  
582 different letter shows significant differences by Wald  $\chi^2$  pairwise test:  $\chi^2$  de Wald = 9,546, g.l.  
583 = 3,  $P = 0,023$  y  $\chi^2$  de Wald = 12,318, g.l. = 3,  $P = 0,006$ , respectively for the first and second  
584 trial).

| Parasitismo aparente (Media $\pm$ EE) |              |               |         |                |    |         |               |
|---------------------------------------|--------------|---------------|---------|----------------|----|---------|---------------|
| Ensayo                                | Parasitoide  | E. kuehniella |         | P. operculella |    |         |               |
|                                       |              | N             | Valores |                | N  | Valores |               |
| No elección                           | T. achaeae   | 10            | 9,10    | $\pm 0,95$ b   | 12 | 12,00   | $\pm 1,00$ a  |
|                                       | T. cacoeciae | 19            | 8,37    | $\pm 0,66$ b   | 19 | 8,95    | $\pm 0,69$ b  |
| Elección                              | T. achaeae   | 20            | 4,20    | $\pm 0,46$ c   | 20 | 5,10    | $\pm 0,51$ bc |
|                                       | T. cacoeciae | 20            | 5,70    | $\pm 0,53$ ab  | 20 | 6,70    | $\pm 0,58$ a  |

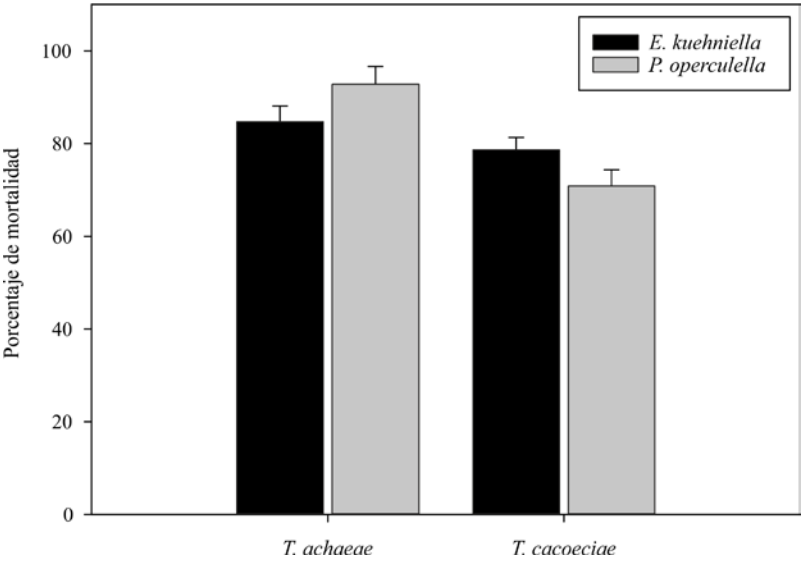
585 **Figura 1.** Porcentajes medios de parasitismo de los huevos huéspedes de *E. kuehniella* y *P.*  
586 *operculella*, causado por las hembras adultas de *T. achaeae* y *T. cacoeciae* en el ensayo de “no  
587 elección” de huésped, llevado a cabo bajo condiciones de laboratorio ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 60-80% HR y  
588 luz continua) (Lineas verticales indican los errores estándares de las medias).

589 **Figure 1.** Average percentages of parasitism of the host eggs: *E. kuehniella* and *P. operculella*  
590 by the adult females of *T. achaeae* and *T. cacoeciae* in the host “no choice” test, carried out  
591 under laboratory conditions ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 60-80% RH and continuous light) (Vertical lines  
592 indicate the standard errors of the means).

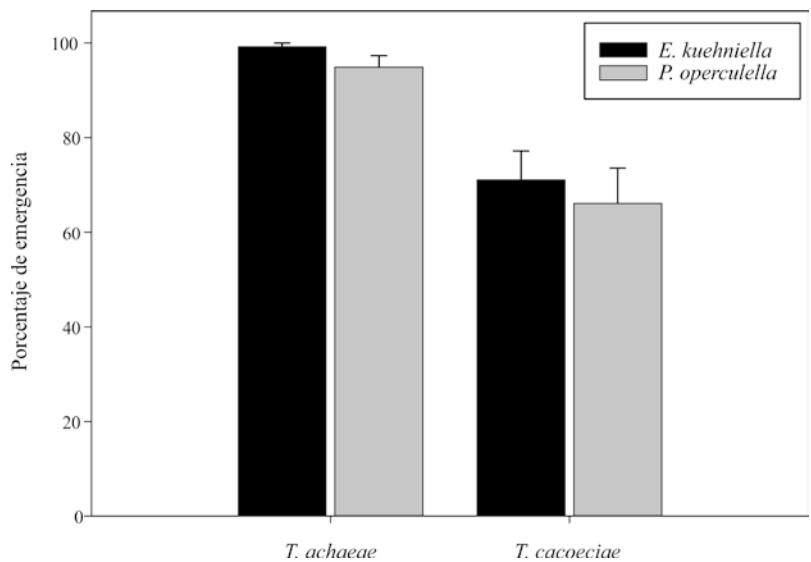


594 **Figura 2.** Porcentajes medios de mortalidad total (parasitismo + depredación por  
595 alimentación) en huevos huéspedes de *E. kuehniella* y *P. operculella*, causado por las hembras  
596 de *T. achaeae* y *T. cacoeciae* en el ensayo de “no elección” de huésped, llevado a cabo en  
597 condiciones de laboratorio ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ; 60-80 % HR y luz continua) (Líneas verticales indican los  
598 errores estándares de las medias).

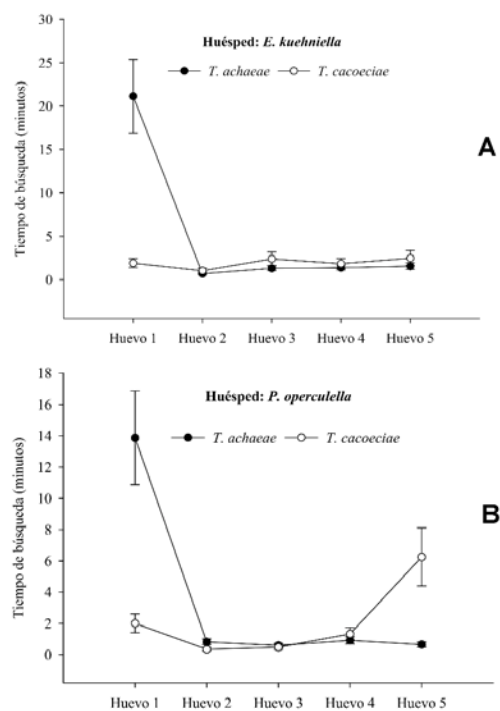
599 **Figure 2.** Average percentages of total mortality (parasitism + host feeding) in host eggs of *E.*  
600 *kuehniella* and *P. operculella*, by females of *T. achaeae* and *T. cacoeciae* in the host “no choice”  
601 test, carried out in laboratory conditions ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 60-80% RH and continuous light) (Vertical  
602 lines indicate the standard errors of the means).



605 **Figura 3.** Porcentajes medios de emergencia de *T. achaeae* y *T. cacoeciae* en función del  
606 huésped (*E. kuehniella* y *P. operculella*) parasitado previamente por las hembras adultas en el  
607 ensayo de “no elección”, llevado a cabo en condiciones de laboratorio ( $25\pm2^{\circ}\text{C}$ ; 60-80 % H.R.  
608 y luz continua) (Líneas verticales indican los errores estándares de las medias).  
609 **Figure 3.** Average emergency of *T. achaeae* and *T. cacoeciae* adults, according to the host egg  
610 (*E. kuehniella* and *P. operculella*) previously parasitized by the adult females in the "no choice"  
611 test, carried out under laboratory conditions ( $25\pm2^{\circ}\text{C}$ ) 60-80% RH and continuous light)  
612 (Vertical lines indicate the standard errors of the means).

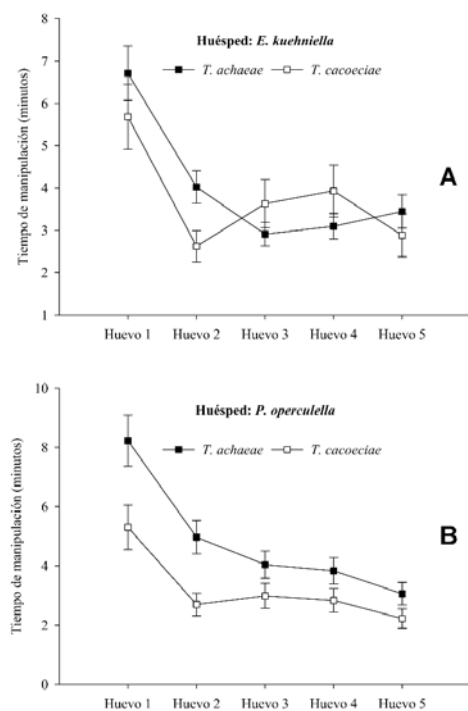


615 **Figura 4.** Variación del tiempo medio de búsqueda del huésped ( $T_s$ ), expresados en minutos,  
 616 de las hembras adultas de *T. achaeae* y *T. cacoeciae*, según secuencia de oviposición, en el caso  
 617 de la especie huésped *E. kuehniella* (A) y *P. operculella* (B) en condiciones de laboratorio  
 618 ( $25\pm1^\circ\text{C}$ , 60–80% H.R. y luz continua) (líneas verticales indican los errores estándares de las  
 619 medias).  
 620 **Figure 4.** Progression of the average of searching time ( $T_s$ ) per egg host, in minutes, of the  
 621 adult females of *T. achaeae* and *T. cacoeciae*, according to the oviposition sequence, in the case  
 622 of the host species *E. kuehniella* (A) and *P. operculella* (B) under laboratory conditions  
 623 ( $25\pm1^\circ\text{C}$ , 60–80% RH and continuous light) (vertical lines indicate the standard errors of the  
 624 means).



625

626 **Figura 5.** Variación del tiempo medio de manipulación del huésped ( $T_h$ ), expresados en  
 627 minutos, en las hembras adultas de *T. achaeae* y *T. cacoeciae*, según secuencia de oviposición,  
 628 en el caso de la especie huésped *E. kuehniella* (A) y *P. operculella* (B) en condiciones de  
 629 laboratorio ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 60–80% H.R. y luz continua) (líneas verticales indican los errores  
 630 estándares de las medias).  
 631 **Figure 5.** Progression of the average of handling time ( $T_h$ ) per egg host, in minutes, of the adult  
 632 females of *T. achaeae* and *T. cacoeciae*, according to the oviposition sequence, in the case of  
 633 the host species *E. kuehniella* and *P. operculella* (B) under laboratory conditions ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 60–  
 634 80% RH and continuous light) (vertical lines indicate the standard errors of the means).



635