



DEPARTAMENT DE CIÈNCIES AGRÀRIES I DEL MEDI NATURAL

**Estudio de la diversidad genética y desarrollo de umbrales  
de *Tetranychus urticae* en clementinos para la mejora  
de su gestión integrada**

TESIS DOCTORAL  
SARA PASCUAL RUIZ  
Ingeniera Agrónoma

**Directores: Dr. Josep A. Jacas Miret  
Dra. Mónica A. Hurtado Ruiz**





DEPARTAMENT DE CIÈNCIES AGRÀRIES I DEL MEDI NATURAL

**Estudio de la diversidad genética y desarrollo de umbrales  
de *Tetranychus urticae* en clementinos para la mejora  
de su gestión integrada**

Memoria presentada para optar al grado de Doctora por la Universitat Jaume I por

**SARA PASCUAL RUIZ**

Esta Tesis se ha realizado en el Departament de Ciències Agràries i del Medi Natural, de la Universitat Jaume I gracias a una beca FPI (AGL2005-07155-c03-01/AGR), y a los proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) AGL2005-07155-c03-01/AGR y AGL2008-05287-C04/AGR

**Directores: Dr. Josep A. Jacas Miret**

**Dra. Mónica A. Hurtado Ruiz**



## **Agradecimientos**

Esta es una Tesis que se ha podido finalizar gracias al trabajo en equipo, así que me gustaría agradecer a todas las personas que en algún momento han compartido su tiempo y esfuerzo para ayudarme y acompañarme.

Quiero agradecer ante todo a mis directores de Tesis, al Dr. Josep Jacas y a la Dra. Mónica Hurtado por darme esta oportunidad, formarme, apoyarme y ayudarme como lo han hecho hasta el final.

Muchas gracias Tina Aguilar por ser tan buena compañera y amiga, y haberme ayudado siempre con una sonrisa de manera incondicional en todas las fases de este trabajo.

Me gustaría dar las gracias al Dr. Alberto Urbaneja, que desde que era una estudiante me ha dado la oportunidad de conocer la Entomología, y que, junto con el Dr. Pedro Castañera, han sido como unos padres profesionales que siempre me han apoyado.

A la Dra. Beatriz Sabater, por ser siempre tan amable y ayudarme con sus conocimientos en Biología Molecular cuando lo he necesitado.

A Antonio Benajes y M<sup>a</sup> José Garcés (COCALNI, Les Alqueries) por proporcionar la parcela donde se han realizado los estudios de campo, y estar siempre disponibles y dispuestos a ayudar en todo lo que hemos necesitado.

A Marian Gómez por ayudarme en el trabajo de laboratorio y ser tan buena compañera y amiga. A Tatiana Pina por haber estado ahí, siempre, desde mis comienzos, y a Consuelo Pérez por ayudarme en el trabajo de campo y laboratorio cuando ha sido necesario. A Tommaso Ansaloni por sus consejos profesionales y su colaboración. También quiero agradecer al resto de compañeros que han colaborado en los muestreos y en la recolección y valoración de los frutos: mis directores de Tesis Josep Jacas y Mónica Hurtado, que han colaborado como el que más, a Tina Aguilar, Oscar Dembilio, Tatiana Pina, Consuelo Pérez, Patricia López, Paloma Pérez, Helga Montón y Lucía Zaragoza.

A Toia Ibáñez por todo lo que me ha enseñado y ayudado para poder realizar los análisis estadísticos.

A los demás compañeros que todavía no he mencionado, tanto de la UJI como del IVIA, con los que he compartido todos estos años: Raquel, Vicky, María, Óscar Mollá, Miquel, Jose, César, Joel, Elena, Belén, Pili, Cristian, Poliane, Laura, Francesc, Pablo, Nacho, Alejandro, Paco, Alfons, M<sup>a</sup> Jesús

A Mavi, Tomás, Vicente y Sandra por estar disponibles cuando los he necesitado en el último empujón.

A mi familia, los que están y faltan por venir, a mis padres y en especial a Daniel, por su cariño, compañía y todo su apoyo incondicional.

## Resumen

*Tetranychus urticae* Koch es un ácaro plaga que se considera clave en el cultivo de los cítricos, especialmente en mandarino clementino. España es el primer productor de cítricos para consumo en fresco a nivel mundial, por lo tanto es imprescindible controlar de una manera eficaz aquellas plagas que, como *T. urticae*, dañan el fruto y, como consecuencia, lo devalúan económicamente. La mejora de la gestión integrada de esta plaga en clementinos puede ayudar a hacer más sostenible la producción cítrica, garantizando el menor impacto posible tanto económico como sobre la salud de los consumidores y el medio ambiente.

Determinar la influencia de la brotación estival y otoñal de los clementinos en el daño provocado por *T. urticae* en la fruta puede ayudar a entender cómo la presencia de brotes a finales de verano puede modular las pérdidas provocadas por este ácaro. Las prácticas culturales que aseguran una brotación sana y abundante, como un riego adecuado y el control de las especies plaga que atacan los brotes (*P. citrella* y los pulgones), son clave para minimizar los daños que produce *T. urticae* en la calidad del fruto.

Para justificar la decisión de intervenir con cualquier método de control curativo contra *T. urticae* en clementino, se ha establecido el umbral económico. Para ello se han llevado a cabo muestreos, estudiando la dinámica de la plaga, y valorado la producción. Los muestreos realizados en hojas sintomáticas y frutos predicen de una manera adecuada los daños futuros en la cosecha. *Tetranychus urticae* reduce significativamente la producción y calidad de la fruta (manchado), pero no su diámetro. Los análisis estadísticos realizados muestran que tanto los fitoseidos como la brotación tienen un papel importante a la hora de reducir los daños producidos por *T. urticae* en la cosecha. Para predecir estos daños, el periodo de muestreo más corto que encontramos aconsejable se extiende entre el 1 de agosto y el 15 de octubre. Para obtener el umbral económico de acuerdo con las dinámicas de *T. urticae*, hay que muestrear durante este periodo de tiempo los ácaros por m<sup>2</sup> en hojas sintomáticas. El umbral que hemos obtenido es de 31,14 ácaros por m<sup>2</sup>, y el umbral de intervención oscilaría entre 10 y 15 ácaros por m<sup>2</sup> de hoja sintomática en el mismo periodo, dependiendo del método de tratamiento elegido (fundamentalmente, biológico y químico, respectivamente). Cuando este umbral se sobrepasa, los agricultores tienen una semana de margen de actuación.

Un buen conocimiento de la plaga y sus enemigos naturales es imprescindible para una correcta GIP, y para ello las técnicas moleculares están siendo muy utilizadas en el campo de la entomología agrícola. Con el fin de estudiar la evolución de las poblaciones de *T. urticae* en diferentes sistemas de cultivo, así como el posible efecto de los acaricidas en esta plaga, los marcadores microsatélites son herramientas muy útiles. Sin embargo, el escaso número de marcadores microsatélites desarrollados para esta especie ha hecho necesaria la búsqueda de nuevos marcadores microsatélites para una mejor separación de las poblaciones que nos encontramos en nuestros campos de cítricos. Con este fin se han aislado y caracterizado 11 marcadores microsatélites, que además se han probado en otras especies de tetránquidos y fitoseidos con éxito, por lo que podrán ser utilizados en futuros estudios poblacionales con esas especies.

Conocer la influencia de la brotación en el daño en los frutos, obtener los umbrales de intervención de *T. urticae* en clementino, así como aumentar el número de marcadores microsatélites disponibles para estudiar la composición genética de sus poblaciones son herramientas de gran utilidad para incrementar el conocimiento sobre esta importante plaga en cítricos y nos aproxima a un control satisfactorio, más sostenible, tanto desde el punto de vista económico como ecológico de la misma.



## Resum

*Tetranychus urticae* Koch es un àcar plaga que es considera clau en el cultiu dels cítrics, especialment en mandarí clementí. Espanya és el primer productor de cítrics per a consum en fresc a nivell mundial, per tant és imprescindible controlar d'una manera eficaç aquelles plagues que, com *T. urticae*, danyen el fruit i, com a conseqüència, el devaluen econòmicament. La millora de la gestió integrada d'aquesta plaga en clementins pot ajudar a fer més sostenible la producció citrícola, garantint el menor impacte possible, tant econòmic com sobre la salut dels consumidors i del medi ambient.

La determinació de la influència de la brotada estival i de tardor dels clementins en el dany provocat per *T. urticae* en la fruita pot ajudar a entendre com la presència de brots a finals d'estiu pot modular les pèrdues provocades per aquest àcar. Les pràctiques culturals que assegurin una brotada sana i abundant, com un rec adequat i el control de les espècies plaga que ataquen als brots (*P. citrella* i els pugons), són clau per minimitzar els danys que produeix *T. urticae* en la qualitat del fruit.

Per a justificar la decisió d'intervenció amb qualsevol mètode de control curatiu contra *T. urticae* en clementí, s'ha establert el llindar econòmic. Amb aquesta finalitat, s'han dut a terme mostreigs, s'ha estudiat la dinàmica de la plaga, i s'ha valorat la producció. Els mostreigs realitzats en fulles simptomàtiques i fruits són bons predictors dels danys futurs en la collita. *Tetranychus urticae* redueix significativament la producció i la qualitat de la fruita (tacet), però no el seu diàmetre. Les anàlisis estadístiques realitzades mostren que tant els fitoseïds com la brotada tenen un paper important a l'hora de reduir els danys produïts per *T. urticae* en la collita. El període de mostratge més curt que permet estimar amb cura els danys en collita s'estén entre l'1 d'agost i el 15 d'octubre. Per a obtenir el llindar econòmic d'acord amb la dinàmica de *T. urticae*, cal mostrejar durant aquest període de temps els àcars per m<sup>2</sup> en fulles simptomàtiques. El llindar que hem trobat és de 31,14 àcars per m<sup>2</sup>, i el llindar d'intervenció varia entre 10 i 15 àcars per m<sup>2</sup> de fulla simptomàtica en el mateix període, depenent del mètode de tractament elegit (fonamentalment, biològic i químic, respectivament). Quan aquest llindar se sobrepassa, els agricultors tenen una setmana de marge per a actuar.

Un bon coneixement de la plaga i els seus enemics naturals és imprescindible per a una correcta GIP, i per a això les tècniques moleculars s'estan utilitzant cada vegada més en el camp de l'entomologia agrícola. Amb la finalitat d'estudiar la evolució de les

poblacions de *T. urticae* en diferents sistemes de cultiu, així com el possible efecte dels acaricides en aquesta plaga, els marcadors microsatèl·lits són eines molt útils. No obstant això, l'escàs nombre de marcadors microsatèl·lits desenvolupats per aquesta espècie ha fet necessària la cerca de nous marcadors per a una millor separació de les poblacions que ens trobem en els camps de cítrics. Amb aquesta finalitat s'han aïllat i caracteritzat onze marcadors microsatèl·lits, que a més s'han assajat amb èxit en altres espècies de tetraníquids i fitoseïds, per la qual cosa podran ser utilitzats en futurs estudis poblacionals amb aquestes espècies.

Conèixer la influència de la brotada en el dany en fruit, obtenir els límits d'intervenció de *T. urticae* en clementí, així com augmentar el nombre de marcadors microsatèl·lits disponibles per a estudiar la composició genètica de les seues poblacions són eines de gran utilitat per apropar-nos a un control satisfactori, més sostenible, tant des del punt de vista econòmic com ecològic de d'aquesta plaga.

## Abstract

*Tetranychus urticae* Koch is a mite pest of citrus, especially of clementine mandarin trees, where it is considered a key pest. Spain is the world's number one producer of fresh citrus fruit for consumption, so it is essential to control in an efficient manner species as *T. urticae*, which downgrade the fruit. The improvements in integrated pest management (IPM) of this particular pest in clementine mandarins can help to make citrus production more sustainable, assuring the least possible impact, both economic and on human health and the environment.

Determining the influence of the summer and autumn leaf flushes of the clementine trees on the fruit damage caused by *T. urticae* can help us to understand how the presence of leaf flushes at the end of summer can moderate the losses produced by this mite. Cultural practices that assure a healthy and abundant leaf flushing, such as appropriate irrigation and the control of pest species that attack the leaf flushes (*P. citrella* and aphids), are key elements in minimizing the damage produced by *T. urticae* in the quality of the fruit.

To justify the decision to intervene with any chosen curative control method against *T. urticae* in clementine trees, an economic threshold has been established. This has been done through samplings to determine the dynamics of the pest, and evaluating the plant production. The sampling performed on symptomatic leaves and fruits adequately predicts the future damage to the harvest. *Tetranychus urticae* significantly reduces both production and quality of the fruit (scarring), but not its diameter. Statistical analysis shows that both phytoseiids and leaf flushing have an important role in reducing the damage produced by *T. urticae* on the harvest. In order to predict such damage, the shortest sampling period that we have found advisable extends between August the 1<sup>st</sup> and October the 15<sup>th</sup>. To obtain the economic threshold in accordance with the dynamics of *T. urticae*, the number of mites per m<sup>2</sup> in symptomatic leaves has to be sampled during this period. The threshold we have found is of 31,14 mites/m<sup>2</sup>, and the intervention threshold ranges between 10 and 15 mites per m<sup>2</sup> of symptomatic leaves during the same period, depending on the treatment method chosen (essentially, biological and chemical, respectively). When this threshold is exceeded, the growers have a margin of one week in which to act.

A sound knowledge of *T. urticae* and its natural enemies is essential for a correct Integrated Pest Management, and, for this, molecular techniques are now being applied in the field of agricultural entomology. With the aim of studying the evolution of

the populations of *T. urticae* in different systems of cultivation, as well as the effect of acaricides on this pest, microsatellite markers have proven to be very useful tools. Nevertheless, the scarce number of such markers developed so far for this species has prompted the search for new microsatellite markers for a better characterization of *T. urticae* populations found in citrus orchards. With this aim, 11 microsatellite markers have been isolated and characterized. These markers have also been successfully tested in other tetranychid and phytoseiid species and can be used in future population studies on these species.

Knowing the influence of leaf flushing on fruit damage, obtaining the thresholds for intervention of *T. urticae* in clementine mandarins, as well as increasing the number of microsatellite markers available to study the genetic composition of their populations bring us closer to its satisfactory control, a control more sustainable from both the economic and the ecologic viewpoints.

## Índice

1. Introducción.....	19
1.1. La Gestión Integrada de plagas en cítricos.....	19
1.1.1. Jerarquización de las especies plaga.....	20
1.1.2. Métodos de muestreo.....	21
1.1.3. Umbrales económicos de daño.....	21
1.1.4. Métodos de control.....	22
1.2. <i>Tetranychus urticae</i> .....	22
1.2.1. Aspectos generales.....	23
1.2.2. Biología.....	23
1.2.3. Daños y síntomas en mandarino clementino.....	24
1.2.4. Importancia de <i>Tetranychus urticae</i> en cítricos.....	25
1.2.5. Métodos de muestreo.....	26
1.2.6. Umbrales económicos de daño.....	27
1.2.7. Métodos de control.....	28
1.2.7.1. Control químico.....	28
1.2.7.2. Control biológico.....	29
1.2.7.3. Control cultural.....	32
1.3. Los marcadores moleculares en la gestión integrada de plagas.....	34
1.3.1. Marcadores moleculares y secuenciación.....	35
1.3.1.1. Isoenzimas.....	35
1.3.1.2. RFLPs.....	36
1.3.1.3. RAPDs.....	36
1.3.1.4. AFLPs.....	37
1.3.1.5. SCARs.....	37
1.3.1.6. SSRs o Microsatélites.....	38
1.3.1.7. Secuenciación.....	38
1.3.2. Aplicaciones de los marcadores moleculares a la Gestión Integrada de Plagas.....	39
1.3.2.1. Taxonomía y Filogenia.....	39
1.3.2.2. Variabilidad en la estructura poblacional.....	41
1.3.2.3. Relaciones tróficas.....	42
1.3.2.4. Relaciones simbióticas.....	42
1.3.2.5. Resistencia a insecticidas.....	43

1.4. Aplicaciones de los marcadores moleculares a la mejora del control de <i>Tetranychus urticae</i> .....	44
1.5. Objetivos.....	49
2. Can summer and fall vegetative growth regulate the incidence of Tetranychus urticae Koch on Clementine fruit?.....	53
2.1. Introduction.....	53
2.2. Material and Methods.....	54
2.2.1. Assay in 2005.....	54
2.2.2. Assay in 2006.....	55
2.3. Results.....	56
2.4. Discussion.....	56
3. Economic Threshold for <i>Tetranychus urticae</i> (Acari: Tetranychidae) In <i>Citrus clementina</i> .....	69
3.1. Introduction.....	69
3.2. Experimental methods.....	71
3.2.1. Experimental orchard.....	71
3.2.2. <i>Tetranychus urticae</i> stock colony.....	71
3.2.3. Mite management.....	72
3.2.4. Sampling.....	72
3.2.5. Mite species composition.....	73
3.2.6. Data processing and analysis.....	73
3.3. Results and Discusión.....	74
3.4. Conclusions.....	78

4. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in <i>Tetranychus urticae</i> and cross amplification in other Tetranychidae and Phytoseiidae species of economic importance.....	105
4.1. Introduction.....	105
4.2. Material and Methods.....	107
4.2.1. Biological material.....	107
4.2.2. DNA extraction.....	107
4.2.3. Enriched library.....	108
4.2.4. Library screening.....	108
4.2.5. Microsatellite markers design.....	108
4.2.6. Microsatellite abalysis.....	109
4.3. Results.....	110
4.3.1. Microsatellite markers design.....	110
4.3.2. Amplification mismatches and other amplification patterns.....	110
4.3.3. Polymorphism detection on microsatellite markers.....	111
4.4. Discussion.....	111
5. Conclusiones.....	123
6. Bibliografía.....	127





## 1. Introducción





## **1. Introducción**

### **1.1 La Gestión Integrada de plagas en cítricos**

Los modernos sistemas productivos de los países desarrollados se encuadran dentro de lo que denominamos agricultura sostenible, caracterizada por la puesta en práctica de estrategias que respeten al máximo el medio ambiente y la biodiversidad, y que se aplican a todas las facetas del cultivo (Wijnands y Kroonen-Backbier, 1993). Así, en uno de los elementos esenciales de la producción, la protección de cultivos, la gestión de plagas, enfermedades y malas hierbas se contempla desde la perspectiva de la gestión integrada de plagas (GIP). La GIP se entiende como la combinación inteligente de todos los métodos de control disponibles, incluida la no intervención, para evitar que las especies plaga causen un daño económico al cultivo (Viñuela y Jacas, 1993). Ésta pone énfasis en la utilización de medidas preventivas, en la vigilancia de las poblaciones de las especies plaga importantes y en la aplicación de umbrales económicos, antes de llegar a utilizar una medida directa de control encaminada a eliminar la porción de la población plaga que nos está causando pérdidas económicas en los cultivos (Boller et al., 1998).

En Europa, la Organización Internacional para la Lucha Biológica (OILB) fue pionera a la hora de adoptar estrategias de tipo integrado. Desde 1967, con el apoyo de la Comisión Europea, se empezaron a organizar proyectos internacionales con el fin de desarrollar programas de GIP para cítricos (Cavalloro, 1986). A partir de estos trabajos aparecieron publicadas las primeras normas donde se indicaban métodos de muestreo y umbrales de intervención para las plagas más importantes de los cítricos (Cavalloro y Prota, 1983). En 1991, estos trabajos sirvieron de base para la redacción del primer protocolo de actuación de control integrado de plagas en este cultivo (Ripollés et al., 1995). En 2009, la Unión Europea publicó una directiva sobre la sostenibilidad del uso de plaguicidas en la cual se establecieron unos principios clave esenciales para la implementación del uso de la GIP en todo el territorio de la Unión (OJEU, 2009). Hoy en día, todas las Comunidades Autónomas donde se cultivan cítricos disponen de reglamentos que hacen referencia a la GIP como base de la protección de los cítricos, y recientemente se ha publicado un Real Decreto, con relación a la directiva europea antes mencionada (BOE, 2012), donde se contempla la necesidad de conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios con el fin de garantizar el menor impacto posible sobre la salud de los consumidores y el medio ambiente, mediante la implementación de los principios de GIP y otras técnicas alternativas a partir de 2014.

### 1.1.1 Jerarquización de las especies plaga

Para cada cultivo, hay que tener un conocimiento preciso de las especies plaga que lo afectan, cuáles son sus enemigos naturales y la biología de ambos. Estas especies han de ser clasificadas según su importancia. Aquéllas que causan daños, sobrepasan el umbral económico y por lo tanto requieren de intervención para ser controladas todos los años, se denominan plagas clave.

En España, las plagas clave que afectan a los cítricos son la mosca de la fruta *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), el conjunto de los diaspididos *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae), *Parlatoria pergandei* Comstock (Hemiptera: Diaspididae) y *Cornuaspis beckii* (Newman) (Homoptera: Diaspididae), la araña roja *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) (Figura 1.1) y varios pulgones, entre los que destacan *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) (Jacas et al., 2001) y *Aphis spiraecola* Pagenstecher (Hemiptera: Aphididae) (Hermoso de Mendoza et al., 2004).

Figura 1.1. Adulto de *Tetranychus urticae*



Fuente: R. Abad-Moyano

Los enemigos naturales que ejercen un mayor control sobre las especies plaga deben ser conservados. En nuestro país existen varios enemigos naturales, autóctonos o exóticos, que ejercen un buen control biológico (Ripollés et al., 1995; Jacas et al., 2010) sobre la mayoría de las especies plaga potenciales del cultivo de los cítricos, como son: *Rodolia cardinalis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) que regula eficazmente a la cochinilla acanalada *Icerya purchasi* Maskell (Hemiptera: Margarodidae) o *Encarsia herndoni* (Girault) (Hymenoptera: Aphelinidae) que parasita a la serpeña fina, *Insulaspis gloverii* Packard (Hemiptera: Diaspididae).

Existen otros enemigos naturales que ejercen un control satisfactorio, como son el coccinélido depredador *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) y el himenóptero parasitoide *Leptomastix dactylopii* Howard (Hymenoptera: Encyrtidae), que conjuntamente controlan el cotonet, *Planococcus citri* Risso (Hemiptera: Pseudococcidae), *Cales noacki* Howard (Hymenoptera: Aphelinidae), que parasita a la mosca blanca algodonosa, *Aleurothrixus floccosus* Maskell (Hemiptera: Aleyrodidae), o *Euseius stipulatus* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae), que regula las poblaciones del ácaro pardo *Panonychus citri* McGregor

(Acari: Tetranychidae). Hace algunos años, también se incorporó a esta lista de enemigos naturales a conservar en el agroecosistema cítricos el ectoparasitoide *Citrostichus phyllocnistoides* (Narayanan) (Hymenoptera: Eulophidae) el cual ha contribuido a reducir las poblaciones del minador *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) (Urbaneja et al., 2003; Karamaouna et al., 2010).

### **1.1.2 Métodos de muestreo**

En la directiva europea sobre el uso sostenible de plaguicidas (OJEU, 2009), se hace hincapié en la importancia del desarrollo de herramientas para realizar el muestreo, así como la obtención de los umbrales económicos de daños para las plagas más importantes. Un muestreo adecuado es aquel que permite estimar correctamente la densidad de la especie en cuestión. Este ha de ser preciso, sencillo y práctico para poder ser aplicado en campo (Aucejo, 2005). Además es importante tener conocimiento de la densidad poblacional de los enemigos naturales más eficaces, puesto que pueden contribuir a mantener la población de la especie plaga bajo control.

A la hora de implementar un método de muestreo, hay que saber de antemano cuál es la pauta de distribución de esa especie y estudiar el tipo de agregación que presenta. Una vez decidido el muestreo a aplicar, se deben establecer unos umbrales de daño, superados los cuales estaría justificada una intervención con los métodos de control más adecuados (Boller et al., 1998, 1999).

### **1.1.3 Umbrales económicos de daño**

Los conceptos de Umbral Económico de Daño y Umbral Económico (UED y UE, o en su versión en inglés EIL y ET, respectivamente) fueron desarrollados por Stern y colaboradores (1959). El UED se define como la mínima densidad de la especie plaga que es capaz de crear una pérdida económica que justifique el coste de una intervención para su control, mientras que el UE es la densidad de plaga aceptable a partir de la cual hay que tomar medidas para prevenir un aumento de las poblaciones con el fin de evitar llegar al UED. Este concepto de UED es una alternativa viable a los calendarios de aplicación de plaguicidas (Pedigo et al., 1986), además de ser la única herramienta de gestión de cultivos que puede ayudar a reducir la cantidad y número de aplicaciones de plaguicidas y acaricidas, y de esta manera indirecta también aumentar el beneficio del agricultor (Weersink et al., 1991).

El concepto de UED todavía no se ha desarrollado para las plagas clave de muchos cultivos de importancia económica debido al tiempo y esfuerzo que requiere. Para calcular el UED se necesita un conocimiento previo de las dinámicas poblacionales de las especies plaga con el fin de determinar la relación entre densidad y daño (Weersink et al., 1991). Además, cuando la actividad de los enemigos naturales ayuda a controlar la plaga es conveniente tenerlos en cuenta a la hora de desarrollar el UED (Stern, 1973; Croft, 1975).

#### **1.1.4 Métodos de control**

En la GIP se hace uso de todas las alternativas o métodos de control que respeten el equilibrio entre los diversos componentes del sistema, tales como el suelo, el propio cultivo y los enemigos naturales de las plagas que viven en este medio. Estos métodos incluyen (Jacas et al., 2001): 1) métodos biológicos, como la suelta y el mantenimiento de depredadores y parasitoides, 2) métodos culturales, como una buena poda, que favorece la aireación de la copa, permitiendo la correcta aplicación de plaguicidas si se considerase oportuno, un buen manejo del riego, o un abonado equilibrado que no favorezca proliferaciones de artrópodos por excesivo vigor, 3) métodos físicos, como la destrucción de la madera de poda o el uso de trampas pegajosas, 4) uso de variedades resistentes, 5) métodos legales, como la aplicación de cuarentenas para la prevención de la difusión y propagación de especies dañinas aún ausentes, y 6) métodos químicos, empleados como último recurso y siguiendo las buenas prácticas agrícolas. Entre todas estas técnicas se intenta dar prioridad a aquellas que favorezcan los mecanismos naturales de regulación de las poblaciones de fitófagos, así como a las medidas preventivas sobre las curativas. Antes de escoger uno o varios de los métodos de control anteriormente citados se debe conocer la biología y comportamiento de la especie plaga a estudiar y sus enemigos naturales.

#### **1.2 *Tetranychus urticae***

*Tetranychus urticae* Koch 1836 (Acari: Tetranychidae), es un ácaro cuya familia engloba a la mayoría de ácaros considerados plaga. *Tetranychus urticae* es una especie que se suele conocer vulgarmente como araña roja, y produce grandes pérdidas económicas en cultivos de todo el mundo (Zhang y Jacobson, 2000). Se trata de un fitófago altamente polífago y cosmopolita, que causa daños en plantas ornamentales y cultivos agrícolas, tanto hortícolas como leñosos (Viñuela y Jacas,

1993; García-Marí et al., 1994) que se encuentren al aire libre o en invernadero (García-Marí et al., 1994; Zhang, 2003).

### 1.2.1 Aspectos generales

*Tetranychus urticae* tiene una gran variación intraespecífica dependiendo del lugar de procedencia geográfica, planta huésped en la que habita e incluso entre diferentes poblaciones (Bund y Helle, 1960; Wang, 1981; Zhang y Jacobson, 2000). De hecho, tras Koch, fue identificada por numerosos autores (Bordeaux y Dosse, 1963; Manson, 1967; Tuttle y Baker, 1968; Meyer, 1974; DuPont, 1979; Brandenburg y Kennedy, 1981; Zaher et al., 1982; Gutiérrez y Schicha, 1983) bajo otras denominaciones específicas.

Desde que Bordeaux en 1956 diferenciara a *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) de *T. urticae*, muchos autores se han planteado la cuestión de si se trata de una única especie o no. Hay autores que han considerado a *T. urticae* y *T. cinnabarinus* como especies distintas basándose sobre todo en las características morfológicas, principalmente su color. Esta separación de especies fue apoyada con varios estudios posteriores (Parr y Hussey, 1960; Jordaan, 1977; Brandenburg y Kennedy, 1981, Zhang y Jacobson, 2000), incluso con estudios morfológicos, biológicos y moleculares (Kuang y Cheng, 1990; Zhang y Jacobson, 2000; Ueckermann et al., 2010), pero rechazada por otros (DuPont, 1979; Mollet y Sevacherian, 1984; Sun et al., 2012). Tras varios estudios bibliográficos realizados por Smith-Meyer en 1987, y basados en DuPont (1979) se consideró *T. cinnabarinus* como sinónimo de *T. urticae* y esto fue aceptado de manera general por los especialistas en la familia Tetranychidae (Ehara, 1993; Baker y Tuttle, 1994; Bolland et al., 1998; Zhang y Jacobson, 2000).

### 1.2.2 Biología

Las hembras de araña roja son las fundadoras de las colonias de esta especie, que en clementino se suelen localizar en el envés de las hojas en el centro o alrededor de las nerviaduras. Los individuos inmaduros (estados de huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y estados de muda que se producen entre cada uno de ellos) y los adultos viven bajo la protección de la telaraña que producen, creando un microclima adecuado para su supervivencia (Hazan et al., 1975). Las hembras de *T. urticae* se dispersan moviéndose a las hojas de alrededor, donde inician nuevas colonias. De esta manera aumenta la población, que suele localizarse en focos (Croft, 1976; Sabelis, 1981).

La reproducción de esta especie es por partenogénesis arrenotoca, por lo que las hembras no fecundadas dan lugar a machos haploides y las fecundadas tanto a machos haploides como hembras diploides (Helle y Pijnacker, 1985). La proporción entre hembras y machos es de 1:3 (Zhang, 2003). Una hembra puede poner de 3 a 5 huevos por día, llegando a poner hasta 120 huevos a lo largo de su vida en condiciones óptimas (Huffaker et al., 1969; Zhang, 2003) y vivir entre 20-28 días.

En cuanto a su dinámica poblacional, la temperatura es un factor importante. *Tetranychus urticae* es una especie adaptada a climas cálidos. Su temperatura óptima de desarrollo es de 30° C aunque puede desarrollarse entre 12° y 40° C (Zhang, 2003). En cuanto a la humedad óptima de crecimiento, hay numerosos estudios realizados, pero difieren en sus resultados (Sabelis, 1981). En condiciones óptimas, puede completar su desarrollo en 9-10 días (Zhang, 2003; Aucejo-Romero et al., 2004). El tiempo que necesita la araña roja para doblar su población varía entre 2-4 días por lo que se puede considerar su incremento numérico como explosivo (Sabelis, 1981). En las zonas de clima frío, los individuos de *T. urticae* entran en diapausa como estrategia de supervivencia al periodo invernal. La inducción y la terminación de este periodo dependen del fotoperiodo, la temperatura y la disponibilidad de alimento (McMurthy et al., 1970; van de Vrie et al., 1972). Sin embargo, en zonas de clima cálido, como el mediterráneo, permanecen activos durante todo el año (Aucejo, 2005; Martínez-Ferrer et al., 2006a).

### 1.2.3 Daños y síntomas en mandarino clementino

El clementino es la especie de cítrico más sensible a los ataques de *T. urticae* en condiciones de clima mediterráneo. También es muy sensible el limonero, y, en menor medida, el naranjo (Agustí, 2000).

En limoneros y clementinos, la araña roja se agrupa formando colonias en el envés de las hojas, donde se alimenta y se reproduce protegida de los depredadores, plaguicidas y condiciones climáticas desfavorables bajo la tela de araña. Los daños que produce son debidos a su alimentación, ya que introduce el estilete en el interior

Figura 1.3. *Tetranychus urticae*  
a) Sus síntomas en hojas de clementino b) Defoliación



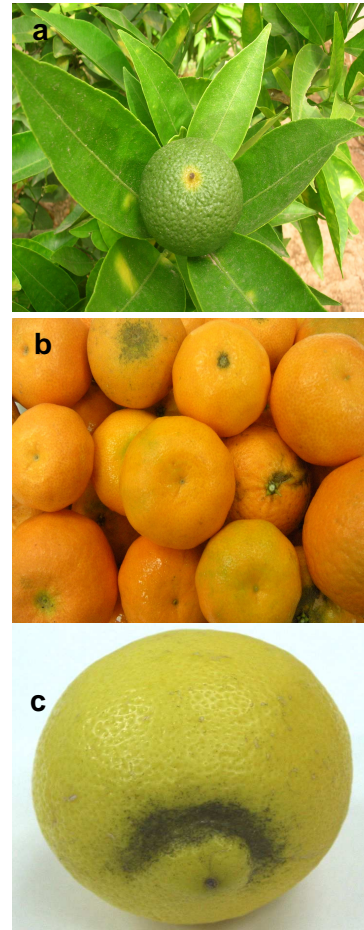


de las células epidérmicas y parenquimáticas de las hojas para alimentarse de ellas, por lo que la función fotosintética de las hojas se ve afectada, reduciendo los procesos de respiración y aumentando la transpiración.

Como resultado de la alimentación de la araña roja en clementinos, se produce un síntoma característico en la zona infestada de la hoja que se observa a simple vista como una mancha amarillenta producida por la decoloración al vaciarse el contenido celular y un abombamiento donde se sitúa la colonia (Figura 1.3 a). Si coinciden fuertes infestaciones de *T. urticae* con periodos de estrés hídrico, las hojas pueden caer prematuramente (Aucejo, 2005), y pueden llegar a producirse grandes defoliaciones (Figura 1.3 b) (Garrido y Ventura, 1993; Aucejo-Romero et al., 2004; Martínez-Ferrer et al., 2006a; Abad-Moyano et al., 2009b).

*Tetranychus urticae* tiene preferencia por los brotes de los clementinos, pero cuando no dispone de éstos, migra al fruto produciendo unos daños característicos (Figura 1.4 a y b) que lo devalúan comercialmente (Jeppson et al., 1975; Smith-Meyer, 1981; García-Marí et al., 1991; Aucejo-Romero et al., 2004; Martínez-Ferrer et al., 2006a; Abad-Moyano et al., 2009a).

Figura 1.4. Daños en fruto producidos por *T. urticae* en: a, b) clementinas, c) limón.



#### 1.2.4 Importancia de *T. urticae* en cítricos

En los cítricos en general, *T. urticae* es una de las especies sobre las que en ocasiones es necesario realizar tratamientos químicos. En este cultivo, ha ido adquiriendo importancia hasta encontrarse entre las plagas importantes y problemáticas tanto en España (García-Marí et al., 1991; Aucejo et al., 2003; Abad-Moyano et al., 2009a) como en otros países citrícolas (Smith et al., 1997; Jacas et al., 2010; Vacante, 2010; University of California, 2012). Además, en España, una de las más importantes zonas productoras de mandarinas, se ha convertido en plaga clave en el cultivo de clementino (Aguilar-Fenollosa, 2011b), y en limoneros en la Vega Baja, al sur de la provincia de Alicante (Generalitat Valenciana, 2008), donde también daña los frutos produciendo pérdidas económicas (Figura 1.4 c).

*Tetranychus urticae* es una plaga muy temida en el clementino, el cual es particularmente sensible a su ataque especialmente en verano (Jeppson et al., 1975; Smith-Meyer, 1981; García-Marí et al., 1991). Este ácaro afecta especialmente al clementino debido a sus hábitos vegetativos como son la frondosidad, porte arbustivo y sobre todo su brotación, que se produce a lo largo de todo el ciclo vegetativo (Moner, 1997).

### 1.2.5 Métodos de muestreo

Se han realizado estudios de la distribución de las hembras de *T. urticae* en varios cultivos (Helle y Sabelis, 1985), entre ellos en clementino (Ripollés et al., 1995; Martínez-Ferrer et al., 2006a), que mostraron un patrón de distribución agregada durante todo el año, tanto en el árbol (hojas y fruto), como en la parcela (Aucejo, 2005; Martínez-Ferrer et al., 2006a). Las hembras de araña roja tienen una movilidad limitada por lo que cuando colonizan una hoja o fruto y crían, fomentan la agregación, y esto hace que el foco se haga perceptible. Este comportamiento implica que hay que realizar muestreos largos para obtener unas estimaciones de muestra suficientemente precisas que nos permitan conocer la densidad de una manera certera. Martínez-Ferrer y colaboradores (2006a) estudiaron el comportamiento agregativo en los cítricos y definieron basándose en esa distribución los siguientes métodos de muestreo por hectárea o unidad homogénea menor:

- a) Muestreo enumerativo: en el caso de baja densidad poblacional (hasta 0,2 hembras por hoja). Muestrear el número de hembras por hoja en 250 hojas sintomáticas, lo que corresponde a un 11 % de las hojas sintomáticas ocupadas por hembras de *T. urticae*.
- b) Muestreo binomial: con elevada densidad poblacional (más de 0,3 hembras por hoja). Muestrear el porcentaje de hojas ocupadas con al menos una hembra en 100 hojas sintomáticas.
- c) Muestreo binomial de 600 frutos, cuando los haya, en el árbol.

Es importante conocer también la densidad de los enemigos naturales más eficaces ya que contribuyen a mantener la plaga bajo control. Hasta la fecha no se ha definido ningún método de muestreo para el estudio de la población de fitoseidos ni de otros enemigos naturales en *T. urticae*. Para los fitoseidos se emplea la misma técnica de muestreo que para *T. urticae* (Aucejo, 2005), es decir, se utiliza el muestreo

enumerativo en el caso de observar bajas densidades poblacionales y el binomial si hay presencia de elevadas densidades poblacionales.

### 1.2.6 Umbrales económicos de daño

Una vez establecidos los métodos de muestreo, el siguiente paso imprescindible para poder llevar a cabo una buena GIP es conocer los umbrales económicos de daños para *T. urticae* en los clementinos. Como la producción española de cítricos en general y de clementino en particular está destinada en su mayoría al consumo fresco, cualquier daño, por pequeño que sea, devalúa la fruta. Por esta razón los umbrales de tolerancia establecidos para los principales fitófagos que afectan a los cítricos son bajos, como ocurre con los umbrales de tipo cosmético (Hare, 1994). Hasta la fecha hay varios autores que han definido distintos índices empíricos como expresión del umbral de intervención:

- a) 6-8 % de hojas exteriores ocupadas y 0-2 % de fruta ocupada (Generalitat Valenciana, 2008; Generalitat de Catalunya, 2012).
- b) 11-23 % de hojas sintomáticas ocupadas y 0-2 % de frutos con presencia de araña roja (Ripollés et al., 1995; Martínez-Ferrer et al., 2004; Aucejo, 2005; Martínez-Ferrer et al., 2006a; Comunidad Valenciana, 2008).
- c) > 7 % de hojas ocupadas entre mayo-octubre o cuando hay presencia de daños en fruto (MAGRAMA, 2004).

Estos umbrales se basan en un método de muestreo que plantea serios problemas de ejecución práctica (Ripollés et al., 1995), y abarcan un amplio rango en cuanto al porcentaje necesario de hojas sintomáticas ocupadas, por lo que es necesario establecer de forma científica y precisa los umbrales de daños y de intervención.

Conseguir este objetivo y definir los umbrales de intervención, tanto para hojas como para frutos, permitiría racionalizar los tratamientos acaricidas que actualmente hay establecidos para esta especie y que frecuentemente rondan las dos aplicaciones por campaña (llegando en ocasiones hasta 4 ó 5), con todos los inconvenientes que el control químico conlleva.

### **1.2.7 Métodos de control**

Las técnicas de control de plagas a nuestro alcance son hoy día numerosas y van desde los métodos legales, biológicos, químicos, o biotecnológicos. Sin embargo, a pesar de ello, *T.urticae* en la actualidad continúa siendo una plaga de difícil control, que produce pérdidas económicas en los cítricos.

#### **1.2.7.1 Control químico**

Los insecticidas y acaricidas hoy día continúan siendo imprescindibles para la producción agrícola, tanto bajo los sistemas convencionales de agricultura, como en la producción integrada o ecológica, ya que los potenciales efectos negativos de diferentes plagas se traducen en pérdidas económicas en muchos cultivos (MAGRAMA, 2012).

La intensificación de la producción agraria en los países desarrollados, con el objetivo de lograr altos rendimientos, ha conducido a un incremento del uso de plaguicidas para que los cultivos rindan económicamente, ante el aumento de la presión de especies plaga en los mismos (Deh-ne y Schonbeck, 1994). En el caso de *T. urticae*, hoy día los acaricidas siguen teniendo un papel fundamental como medida correctiva en GIP, tanto en cultivos al aire libre como en invernadero, (van Leeuwen et al., 2009). Entre los acaricidas existe una amplia variabilidad en cuanto a su estructura química y modo de acción (MdA) (IRAC, 2011). Sin embargo, aunque el número de productos disponibles para el control de ácaros es muy amplio, en la práctica, los acaricidas que están registrados y permitidos para cada cultivo es cada vez menor (van Leeuwen et al., 2009; MAGRAMA, 2012).

Para evitar los efectos negativos de los productos fitosanitarios, las administraciones aplican los mecanismos necesarios para que sólo puedan comercializarse aquellos productos fitosanitarios que sean útiles y eficaces para combatir las plagas, pero que no comporten otros riesgos colaterales. Para que un producto pueda comercializarse debe estar autorizado previamente e inscrito necesariamente en el Registro Oficial de Productos Fitosanitarios (MAGRAMA, 2012).

Un tratamiento químico, sin embargo, puede no siempre ser efectivo contra la plaga que se desea eliminar y, si se realiza un mal control, pueden llegar a producirse resistencias (Hoyt et al., 1985; Viñuela, 1998). Para paliar este efecto negativo, el IRAC (Insecticida Resistance Action Comité) proporciona a los agricultores una

clasificación de los modos de acción (MdA) de insecticidas y acaricidas para que se pueda realizar una estrategia de gestión de la resistencia que sea eficaz y sostenible.

El uso de los acaricidas también tiene como consecuencia la eliminación de la fauna auxiliar importante en el control de algunas especies plaga. Podríamos pensar, en un principio, que este empobrecimiento faunístico no es malo desde el punto de vista agronómico si a la vez estamos eliminando al fitófago. Sin embargo, el doble efecto de los plaguicidas sobre la plaga y sobre sus enemigos, hacen que una aproximación tan simplista al problema sea errónea. El hecho de eliminar especies beneficiosas que mantienen en equilibrio a especies plaga, puede provocar un incremento, a corto plazo, en las poblaciones de esta última, al quedar libres de la presión que sobre ellas ejercían los enemigos naturales (Urbaneja et al., 2008). De esta manera podemos llegar incluso a tener mayores pérdidas en nuestras cosechas tras un tratamiento, que sin él (Harper, 1991). Para evitar este problema, a la hora de elegir un plaguicida o acaricida para el control de una determinada plaga en los cítricos, es aconsejable tener en cuenta el efecto de las distintas materias activas recomendadas sobre los enemigos naturales más relevantes (Generalitat Valenciana, 2012). Estos productos además dejan residuos en el medio ambiente que son difíciles de eliminar y también en la propia fruta, lo que puede ocasionar problemas de comercialización.

La entrada en vigor de la Directiva Europea 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de octubre de 2009 establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas con el objetivo de reducir los riesgos y los efectos del uso de los plaguicidas en la salud humana y medio ambiente. Esto hace necesario el fomento de la GIP y de planteamientos y técnicas sostenibles, como alternativas al control químico (OJEU, 2009).

### **1.2.7.2 Control biológico**

El control biológico en cítricos se considera insuficiente en el caso de algunas plagas que dañan directamente el fruto, por lo que estas plagas todavía dependen en buena medida del control químico (Urbaneja et al., 2008). Este es el caso de *T. urticae*, cuyo control todavía está lejos de ser satisfactorio a pesar de que tiene muchos y variados enemigos naturales (Abad-Moyano et al., 2009a, Aguilar-Fenollosa et al., 2011a,b).

La primera publicación que consideraba el posible valor de los fitoseidos como agentes de control biológico de ácaros fue realizada por Parrot, Hodgkiss y Schoene en 1906. Desde hace ya algún tiempo, los ácaros depredadores de esta familia se

consideran el grupo de mayor eficacia en el control biológico de la araña roja (Helle y Sabelis, 1985) y son elementos esenciales en muchos programas de GIP (McMurtry, 1982). Estos ácaros no son especialmente voraces en comparación con otros insectos depredadores (Gotoh et al., 2004). Sin embargo, tienen unas características que hacen que algunas especies sean interesantes, como son la preferencia por alimentarse de tetránquidos, ciclos de vida cortos, alta supervivencia, habilidad para prosperar mejor a bajas densidades de presa que otros artrópodos y su disponibilidad comercial (Overmeer, 1985; van Lenteren, 2001).

Los fitoseidos tienen hábitos alimenticios muy variados, la mayoría son polípagos y se alimentan de microartrópodos, hongos, melaza o polen (McMurtry y Croft, 1997). Esta es una característica positiva, ya que les permite sobrevivir en los momentos en los que la presencia de presa es baja o nula (García-Marí et al., 1991). Otros fitoseidos se comportan como depredadores específicos.

Los fitoseidos tienen cinco estados de desarrollo: huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto con un periodo quiescente corto entre estados. Su tamaño es similar al de los tetránquidos y su coloración suele ser blanquecina o bien rojiza, si se han alimentado de araña o ácaro rojo (García-Marí et al., 1991), aunque *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae), uno de los fitoseidos más relevantes en clementino, es de color rojo, aún sin haber consumido presa. Estas características, junto con su agilidad y velocidad, facilitan su identificación a simple vista.

Los fitoseidos son capaces de alimentarse de todos los estados de la araña roja y suelen depositar sus huevos en telaraña. Son las hembras las que se encargan de la dispersión, y solo después del apareamiento (Sabelis, 1981). Para alimentarse utilizan sus quelíceros en forma de pinza con los que agarran y cortan a su presa.

Las especies más abundantes en los cítricos españoles son: *P. persimilis*, *E. stipulatus*, *Neoseiulus californicus* (Mc Gregor) (Acari: Phytoseiidae) y *Typhlodromus phialatus* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae), y se encuentran tanto en los árboles como en las cubiertas vegetales (Ripollés et al., 1995; Escudero y Ferragut, 1998; Aucejo, 2005; Abad-Moyano et al., 2009a; Aguilar-Fenollosa et al., 2011b).

*Phytoseiulus persimilis* se considera el depredador más importante de *T. urticae* (García-Marí et al., 1986a; Abad-Moyano et al., 2009a; Aguilar-Fenollosa et al., 2011b), ya que es específico de esta especie (Badii y McMurtry, 1984). Tiene unas características positivas como depredador: elevado potencial de aumento de población (Zhang, 1995), corto periodo de desarrollo (Sabelis y Janssen, 1994) y una elevada

tasa de puesta. Estas características le convierten en candidato idóneo para formar parte de estrategias aumentativas y por conservación de control biológico (Abad-Moyano et al., 2009a; Aguilar-Fenollosa et al., 2011a,b,c). Sin embargo, tiene los inconvenientes de que no tolera elevadas temperaturas y si eliminan la presa, entonces se extinguen, ya que no tienen la capacidad de sobrevivir con alimento alternativo.

La vida de este fitoseido ocurre exclusivamente en el interior de las colonias de *T. urticae*. Es ahí donde pone los huevos en la telaraña, y todas sus formas activas se mueven ágilmente por los hilos de esta (Sabelis y Afman, 1994). *Phytoseiulus persimilis* no se encuentra en abundancia en los cítricos españoles (García-Marí et al., 1986a; Abad-Moyano et al., 2009a; Aguilar-Fenollosa et al., 2011a,b), pero aparece de forma consistente en la parcela cuando se emplean técnicas de conservación como una correcta gestión de la cubierta vegetal (Aguilar-Fenollosa et al., 2011a,b).

Existen otros fitoseidos generalistas que se encuentran en los campos de cítricos de España (García-Marí et al., 1986a; Abad-Moyano et al., 2009a; Aguilar-Fenollosa et al., 2011a,b), y pueden reproducirse alimentándose de polen y otras especies de microartrópodos, aunque su velocidad de reproducción es mayor en presencia de estos alimentos que si se alimenta sólo de la araña roja (McMurtry y Rodríguez, 1987).

Los fitoseidos generalistas son:

*Euseius stipulatus*. Se trata del fitoseido más abundante en los cítricos españoles (McMurtry, 1977; Ferragut et al., 1983; García-Marí et al., 1985; Ferragut et al., 1988; Abad-Moyano et al., 2009a; Aguilar-Fenollosa et al., 2011a,b). Es capaz de alimentarse de *T. urticae* pero está especializado en polen (Zhao y McMurtry, 1990; Pina et al., 2012a). Suele encontrarse en aquellos huertos donde hay presencia de *P. citri*, del cual es un importante enemigo natural. En verano, las poblaciones de *E. stipulatus* se ven afectadas negativamente por las elevadas temperaturas y humedades relativas bajas (Ferragut et al., 1988). En el agroecosistema de los cítricos se considera un depredador intragremial superior con respecto a otros fitoseidos que controlan mejor a la araña roja. Esto, según Abad-Moyano y colaboradores (2010), podría ser la razón por la cual hay abundancia de este fitoseido en los clementinos y a la vez un control deficiente de *T. urticae*.

*Neoseiulus californicus*. Este es un depredador polífago que tiene preferencia por los ácaros tetraníquidos (McMurtry y Croft, 1997) y que también puede sobrevivir alimentándose de polen (Escudero y Ferragut, 1996), aunque es incapaz de

incrementar mucho sus poblaciones solo con este recurso (Pina et al., 2012a). Esto unido a que tolera las altas temperaturas, y algunos acaricidas, puede hacer que contribuya junto con otros depredadores a obtener un buen control biológico (Castagnoli y Simoni, 2003).

*Thyphlodromus phialatus*. Es un depredador generalista capaz de alimentarse de tetránquidos, tanto *T. urticae* como *P. citri* (Ferragut et al., 1987) aunque su capacidad depredadora es escasa. También puede alimentarse de otros microartrópodos (Juan-Blasco et al., 2008) y de polen. *Typhlodromus phialatus* es susceptible a los plaguicidas, pero tiene como ventaja que tolera las altas temperaturas. En los cítricos españoles se encuentra en abundancia pero no está clara su importancia como agente de control biológico (García-Marí et al., 1986b; Abad-Moyano et al., 2009a; Aguilar-Fenollosa et al., 2011b).

Hay otros depredadores generalistas que pueden complementarse y reducir las poblaciones de *T. urticae*, como son: *Stethorus punctillum* Weise (Coleoptera: Coccinellidae), *Feltiella acarisuga* (Vallot) (Diptera: Cecidomyiidae) y *Scolothrips longicornis* Priesner (Thysanoptera: Thripidae), frecuentes en plantas muy atacadas por la araña roja en nuestros campos de cítricos y otros depredadores polívoros que se alimentan de tetránquidos como es el caso de *Chrysoperla carnea* (Stephens) y *C. septempunctata* Wesmael (Neuroptera: Chrysopidae), *Conwentzia psociformis* (Curtis) (Neuroptera: Coniopterygidae) y *Hemerobius* sp. (Neuroptera: Hemerobiidae) (Abad-Moyano et al., 2009a).

### 1.2.7.3 Control cultural

Hay varios factores que se piensa que están relacionados con el potencial de daño que provoca *T. urticae* en los cítricos en general y en especial en clementino, como son los factores relacionados con el estrés de la planta: estrés hídrico, térmico y osmótico, así como algunas prácticas agronómicas, como la gestión de las malas hierbas y fertilización (University of California, 1991; Ripollés et al., 1995; Quirós-González, 2000; Aucejo et al., 2003, Aucejo-Romero et al., 2004; Aguilar-Fenollosa., 2011a,b).

Los campos de cítricos requieren una cantidad anual de agua entre los 750-1200 mm (Agustí, 2000), por lo que en el Este de España, donde se concentra la mayor producción de cítricos, la cantidad de lluvia no llega a ser la suficiente (440 mm anuales), lo que convierte al riego en un factor limitante del crecimiento vegetativo del



árbol. El riego puede jugar un papel fundamental en la dinámica poblacional de *T. urticae* ya que el estrés hídrico en los cítricos a finales de verano altera la brotación (Urbaneja et al., 2000). En España, los clementinos presentan una brotación principal de unos 400 brotes por m<sup>2</sup> en marzo y otra secundaria de 20-30 brotes por m<sup>2</sup> en agosto-octubre (Urbaneja et al., 2000). La araña roja se alimenta de los brotes tiernos, principalmente de la brotación secundaria ya que ocurre cuando la población de *T. urticae* es más elevada. De esta manera un riego abundante que produce un crecimiento vegetativo normal podría tener una relación con la cantidad de daño en el fruto.

Así mismo se han desarrollado estudios sobre cómo influye el estado nutricional y fisiológico de los clementinos en la aparición de *T. urticae* y el daño que produce. Dentro de este marco hay un estudio donde se evaluó la influencia del efecto de la salinidad por NaCl del agua de riego en el crecimiento poblacional de la araña roja. Una irrigación con agua moderadamente salina (< 10 mM NaCl) se sabe que favorece el incremento poblacional de la araña roja en clementinos (Aucejo-Romero et al., 2004).

La gestión de las cubiertas vegetales (Barbosa, 1998) es otra práctica cultural a tener en cuenta ya que podría ser clave para controlar a *T. urticae* (Aguilar-Fenollosa et al., 2008, 2011a,b). Hay algunos estudios realizados que han demostrado que las plantas Poáceas son huéspedes pobres para *T. urticae* (Flexner et al., 1991; Alston, 1994; Aucejo et al., 2003). Concretamente en el cultivo de los cítricos se ha demostrado que las poblaciones de *T. urticae* se encuentran mejor reguladas cuando la cubierta vegetal de los cítricos está compuesta solo por *Festuca arundinacea* Schreber (Poaceae), en comparación con las parcelas que tienen cubierta espontánea o suelo desnudo (Aguilar-Fenollosa et al., 2008, 2011a,b,d). La dinámica de los fitoseidos también puede verse afectada por la gestión de la cubierta vegetal. Además, se piensa que los fitoseidos depredadores especialistas, como es el caso de *P. persimilis*, se encuentran favorecidos al tener menor presión por parte del omnívoro *E. stipulatus*, que es un importante depredador intragremial, y para el que el polen de *F. arundinacea* no es un polen de buena calidad que le permita explotar, como ocurre con otros tipos de polen (Aguilar-Fenollosa et al., 2011b; Pina et al., 2012a). Por lo tanto, el control biológico por conservación por medio de las cubiertas vegetales ofrece una alternativa interesante al control químico de *T. urticae* (Aguilar-Fenollosa et al., 2011d).

### 1.3 Los marcadores moleculares en la gestión integrada de plagas

La biología molecular se han convertido en los últimos años en un instrumento indispensable para muchos estudios dentro del campo de la entomología, ya que ha conseguido resolver problemas que no estaban al alcance de las técnicas entomológicas clásicas (Roderick, 1996). Es por ello que estas técnicas están siendo muy utilizadas en entomología y en concreto en el control de plagas (Loxdale y Lushai, 1988; Hurtado et al., 2008a).

Cualquier carácter de un ser vivo está definido por genes, de forma que las diferencias morfológicas y de comportamiento pueden identificarse por medio de diferencias a nivel molecular. El genoma de un artrópodo está constituido por ADN nuclear, mitocondrial y procedente de sus simbioses (Hurtado et al., 2008a).

- 1- El ADN nuclear se hereda del padre y de la madre mediante la reproducción sexual y posterior recombinación de su ADN. Esta parte del ADN proporciona una de las herramientas más completas para los estudios moleculares (Navajas y Fenton, 2000). Está compuesto por: (a) ADN no repetitivo: son genes de copia única; (b) ADN moderadamente repetitivo: compuesto por familias génicas o genes repetidos. De entre el ADN moderadamente repetitivo, el ADN nuclear ribosomal es el más utilizado en los estudios filogenéticos y de diferenciación de especies de artrópodos; y (c) ADN altamente repetitivo: son agrupaciones de genes dispuestos en tándem, muy comunes en insectos y ácaros. Pueden llegar a formar parte del 90% del genoma repitiéndose, dependiendo de la especie, de cientos a millones de veces (Hurtado et al., 2008a).
- 2- El ADN mitocondrial es de naturaleza haploide, herencia materna, tiene una elevada tasa de mutación y ausencia de recombinación. Estas características lo hacen especialmente interesante para estudios filogenéticos, ya que permiten seguir los linajes hasta un antepasado común. Además, su elevada tasa de mutación lo convierte en un marcador muy polimórfico.
- 3- El ADN procedente de los simbioses de algunos insectos o ácaros es generalmente de origen bacteriano. Estos simbioses son dependientes de los hospedadores y en algunos casos son imprescindibles para la supervivencia y reproducción de éstos (Schwemmler, 1989; Werren, 1997).

### **1.3.1 Marcadores moleculares y secuenciación**

Los marcadores moleculares, constituyen una herramienta muy útil en estudios de biología de insectos (Hoy, 2003) y otros artrópodos. Estos marcadores han contribuido al desarrollo de estudios filogenéticos, evolución, ecología y dinámicas poblacionales (Symondson y Liddell, 1996).

Los primeros marcadores moleculares utilizados fueron los marcadores de proteínas, llamados isoenzimas (Avisé, 1994). En la actualidad han sido sustituidos por marcadores basados en técnicas de ADN como RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, en inglés), RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*, en inglés), AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, en inglés), SCARs (*Sequence-Characterized Amplified Region*, en inglés) o SSRs (*Simple Sequence Repeats*, en inglés). Los marcadores moleculares basados en el ADN se han convertido en los más utilizados para medir diferencias genéticas tanto inter como intraespecíficas (Behura, 2006).

#### **1.3.1.1 Isoenzimas**

Las isoenzimas son variantes de una misma enzima que desempeñan una función igual o parecida dentro del organismo, pero tienen diferente carga eléctrica y peso molecular (Hurtado et al., 2008a). Las isoenzimas son específicas e independientes del medio, lo cual es una ventaja en estudios taxonómicos. Sin embargo, presentan importantes limitaciones, ya que el material biológico a emplear ha de estar vivo o congelado hasta su uso. Además, para un *locus* determinado, esta técnica revela solo una fracción de la variación genética y se ve limitada en estudios con individuos de pequeño tamaño.

Esta técnica ha sido sustituida por los marcadores basados en ADN. Estos marcadores son más estables en el tiempo que las proteínas (Behura, 2006) y presentan un mayor polimorfismo (Richardson et al., 1986).

#### **1.3.1.2 RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Son fragmentos de distinta longitud de ADN que tienen un tamaño y número característico según al organismo al cual pertenecen y a la enzima o enzimas endonucleasas de restricción que se hayan utilizado para cortarlo (Dowling et al., 1996). El número de fragmentos que se obtienen con este marcador indica la

frecuencia con la que aparece la secuencia repetida en el ADN y la longitud de cada uno de ellos indica la distancia entre cada uno de los sitios de reconocimiento de la enzima. Cada endonucleasa de restricción reconoce una secuencia de bases concreta y esto convierte a los RFLPs en unos marcadores específicos. Esta técnica se ha utilizado para la diferenciación de especies sin la necesidad de utilizar la taxonomía clásica y también en detección de variabilidad genética entre poblaciones. Los RFLPs tienen algunos inconvenientes: requieren del conocimiento de la secuencia utilizada como sonda, el polimorfismo detectado es menor que en otros marcadores y las especies bajo estudio no pueden ser de pequeño tamaño, ya que se necesita una cantidad de ADN mínima para obtener resultados.

#### **1.3.1.3 RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA)**

Es un marcador molecular que utiliza la PCR para conseguir la amplificación de secuencias de dispersas en el genoma mediante un único cebador de secuencia corta (8-10 pb) que puede unirse en varios lugares (Williams et al., 1990). Además estos marcadores se obtienen de forma rápida y fácil. Sin embargo, su principal desventaja es su baja reproducibilidad (Black, 1993), que hace difícil la transferencia de resultados de unos laboratorios a otros. Aunque precisan de menos cantidad de ADN que los RFLPs, su aplicación a individuos de pequeño tamaño sigue sin resultar muy adecuada por la necesidad de disponer de una cierta cantidad de ADN. Los RAPDs son dominantes y ello hace que se dificulte la identificación de individuos heterocigotos. Además, con ellos se pueden amplificar bandas del mismo peso molecular pero pertenecientes a distintos loci imposibles de distinguir, con la consiguiente pérdida de información (Weeden et al., 1992). Pese a sus limitaciones, esta técnica se ha utilizado en estudios poblacionales (Navajas y Fenton, 2000) y ha permitido la diferenciación de poblaciones surgidas de la selección genética bajo diferentes condiciones ambientales o como resultado de la deriva genética (Subod et al., 2010).

#### **1.3.1.4 AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism)**

Se trata de una técnica basada en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción de ADN (Vos et al., 1995). Combina la restricción y la amplificación por PCR. Por cada amplificación se generan múltiples bandas que contienen marcadores de ADN de origen aleatorio. La digestión del ADN genómico tiene lugar por medio de dos enzimas: *EcoRI* y *MseI*. Uno de ellos, *MseI*, tiene muchos puntos de

reconocimiento en el genoma, por lo que dará lugar a fragmentos de pequeño tamaño. Para obtener fragmentos de tamaño adecuado se utiliza la enzima de restricción *EcoRI*, que al tener menos puntos de reconocimiento, da lugar a fragmentos mayores. Una vez realizada la digestión tiene lugar una ligación con adaptadores específicos de *EcoRI* y *MseI*. Seguidamente se realiza una preamplificación que pretende generar muchas copias de los fragmentos obtenidos. El cebador específico correspondiente a la enzima *EcoRI* se marca radioactivamente o con un fluoróforo para la realización de una amplificación selectiva, cuya misión es seleccionar sólo los fragmentos en cuyos extremos encontramos los cortes de ambas enzimas, *EcoRI* y *MseI*. Los AFLPs dan acceso a un número muy elevado de marcadores genéticos de origen aleatorio, con lo que esta técnica es adecuada para la identificación de genotipos que son próximos genéticamente. Los marcadores obtenidos tienen una elevada resolución y son altamente repetitivos. Sin embargo tienen el inconveniente de que son caros y la técnica es costosa. Al igual que en los RAPDs, se necesita una cantidad de ADN mínima, por lo que su utilización está limitada en individuos de pequeño tamaño. Al ser marcadores mayoritariamente dominantes no distinguen entre los genotipos heterocigotos de los homocigotos, lo cual limita el uso de los AFLPs para estudios genéticos poblacionales.

#### **1.3.1.5 SCARs (Sequence-Characterized Amplified Region)**

Son marcadores moleculares derivados de los marcadores RAPDs pero sin el inconveniente de ser dominantes, lo que los convierte en más informativos. Se obtienen a partir de la secuenciación de las bandas polimórficas obtenidas en la amplificación de los RAPDs. Las secuencias obtenidas sirven de base para el diseño de nuevos cebadores. Estos cebadores originan un fragmento que es característico del *locus* RAPD del que provienen, haciéndolos más específicos. Con esta técnica se puede llegar a conocer el origen geográfico de una especie, realizar estudios poblacionales y detectar depredación (Agustí et al., 1999; Agustí et al., 2000; Zhang et al., 2007).

#### **1.3.1.6 SSRs o Microsatélites (Simple Sequence Repeats)**

Este tipo de marcadores están presentes en todos los genomas de eucariotas (Hamada y Kakunaga., 1982). Están formados por secuencias polimórficas con repeticiones nucleotídicas generalmente de 2 o 3 pares de bases que se repiten  $n$  veces en tándem (Litt y Luty, 1989). Cada individuo tiene en su genoma un número

distinto de estas repeticiones y esto es lo que confiere a los microsatélites el polimorfismo necesario para poder diferenciar entre especies, poblaciones, razas e incluso entre individuos de una misma población. Los marcadores microsatélites tienen la ventaja de ser codominantes, tienen un alto grado de polimorfismo y no están sometidos a los efectos de la selección, de forma que son marcadores neutros. Además se pueden utilizar con especies próximas a la especie para la que se han desarrollado, ya que por proximidad comparten estas regiones o loci caracterizadas (Wilson et al. 2004). Los marcadores basados en SSRs tienen una mayor resolución y permiten detectar bajas concentraciones de ADN (Loxdale y Lushai, 1988), lo cual facilita la aplicación de estas técnicas en organismos de pequeño tamaño. Estas características hacen de este marcador uno de los más utilizados en estudios poblacionales de artrópodos (Hurtado et al., 2008a).

### **1.3.1.7 Secuenciación**

El gran avance de las técnicas de secuenciación automática ha hecho que muchos estudios genéticos pasen directamente a la secuenciación de regiones del ADN, tanto codificantes como no codificantes. Incluso en muchos casos la tendencia es la secuenciación total del genoma, de forma que en la actualidad están secuenciados los genomas de 8 especies de artrópodos y 35 especies más están en proceso. En la actualidad la iniciativa i5k pretende obtener el genoma de hasta 5000 especies de artrópodos en los próximos 5 años (Robinson et al., 2011).

La primera generación de secuenciación corresponde al método de Sanger (Sanger et al., 1977) basado en la incorporación de dideoxynucleotidos a la cadena de DNA en crecimiento, lo que impide que esta cadena pueda continuar elongándose. Inicialmente la visualización de las secuencias requería la utilización de geles de acrilamida, de modo que esta metodología requería una gran cantidad de ADN, espacio de laboratorio e infraestructura. Esta problemática se solucionó en los años 80 con la aplicación de equipos de electroforesis capilar (Smith et al., 1985, 1986). Los avances en este campo llevaron al desarrollo de una segunda generación de secuenciadores (454 pirosecuenciación, Illumina, SOLiD) que permiten la obtención a escala nanomolecular de cientos de miles de secuencias (McLean et al., 2009; Sonoda et al., 2011). En la actualidad nos encontramos ya en la tercera generación de secuenciadores basadas en la lectura del ADN dispuesto sobre un soporte sólido, utilizando la microscopía electrónica, de forma que la secuencia de ADN se lee directamente sobre la imagen (Pennisi et al., 2012). Hasta ahora la secuenciación de

ADN se aplicaba en varios campos de la biología molecular entre los que se incluyen estudios de evolución genética de los organismos, la variación geográfica, deriva, migración genética e hibridación (Hillis et al., 1996). La secuenciación de regiones del genoma también permitía la reconstrucción filogenética de las especies relacionadas entre sí y documentar la variación genética dentro de poblaciones. La obtención de genomas completos en diferentes especies permitirá en un futuro conocer mejor las familias genéticas, las regiones repetitivas del genoma y la función de los elementos reguladores, entre otros, lo que en definitiva llevará al desarrollo de marcadores moleculares más precisos. Esta técnica tiene muchas aplicaciones y ventajas pero como todas, tiene sus inconvenientes: el gen seleccionado como objeto de estudio ha de ser apropiado para responder las cuestiones biológicas planteadas inicialmente, por tanto, hay que esquivar aquellos genes que no son informativos (Mallet y Willmott, 2003). Hoy por hoy las técnicas de secuenciación más actuales y novedosas todavía resultan caras, de forma que su uso está limitado a grupos de investigación potentes que trabajan en especies de interés económico. Sin embargo, su aplicación en organismos de interés agrícola se está extendiendo y se puede decir que sus posibilidades y utilización no han hecho más que comenzar.

### **1.3.2 Aplicaciones de los marcadores moleculares a la Gestión Integrada de Plagas**

#### **1.3.2.1 Taxonomía y Filogenia**

En general se considera que dos individuos pertenecen a una misma especie cuando son capaces de obtener descendencia fértil, aunque en la actualidad el concepto de especie está siendo redefinido. Gracias a estas técnicas moleculares se están resolviendo problemas filogenéticos difíciles de abordar utilizando la taxonomía clásica (Frohlich et al., 1999). Sin embargo, en este campo no hay reglas fijas que establezcan que nivel de variación que debe existir entre dos individuos para considerarlos especies distintas. Los límites entre especies deben de ser el resultado de una suma de observaciones entre las que además de las diferencias taxonómicas y genéticas se encuentran las geográficas, morfológicas y de comportamiento (Behura, 2006).

La tendencia de los distintos genes de una familia génica es a evolucionar conjuntamente dentro de una misma especie y a diferenciarse por mutación de otras especies. Esto se denomina evolución concertada y estas mutaciones ocurren

normalmente en los espacios entre los genes. En el caso del ADN nuclear ribosomal (ADNnr), se ha comprobado que los genes que codifican para el ARN ribosomal (ARNr) están muy conservados, ya que tienen una función básica en la célula. Sin embargo, las regiones intergénicas, llamadas en inglés *Internal Transcribed Spacer* (ITS) están sometidas a evolución concertada (Osakabe et al., 2002) y su tasa de mutación permite establecer la diferenciación entre especies relacionadas (Paskewitz et al., 1993). Incluso estas diferencias pueden observarse a nivel intraespecífico, de modo que estas regiones pueden ser utilizadas también en la diferenciación de poblaciones (Fritz et al., 1994).

La taxonomía molecular está extendiéndose a nivel mundial con el desarrollo de iniciativas como la del proyecto del Árbol de la Vida (Tree of life Project, 1995-2004) que pretende identificar todas las especies del planeta. Este proyecto se encontró con el problema de que muchas especies clasificadas como diferentes eran morfológicamente iguales (Maddison et al., 2007). Para solucionar este problema se creó la iniciativa “Barcoding of life” (CBOL, 2003). Se propuso la utilización de un marcador de ADN para ser utilizado como un carácter más en taxonomía (Herbert et al., 2003). El gen de la Citocromo Oxidasa Mitocondrial (COI) fue elegido para que sirviera como código de barras identificativo de cada especie. Sin embargo, en los últimos años se ha puesto en entredicho la utilización de una única región del ADN como carácter identificativo de especie, ya que no se considera apropiada para muchos invertebrados, y en concreto, para las especies de Tetraníquidos (Ros y Breeuwer, 2007; de Mendonça et al., 2011).

Los estudios filogenéticos pueden servir también para averiguar el origen y los procesos de colonización de las plagas y sus enemigos naturales (Roderick y Navajas, 2003). Un fitófago en su origen es difícil que pueda convertirse en plaga si está en equilibrio con el medio. Conociendo el origen de la plaga se pueden buscar también sus enemigos naturales (Roderick, 2004; Hurtado et al., 2008a; Nichols et al., 2010) y diferenciarlos de otros que pueden tener una menor especificidad para el control de la plaga, aunque morfológicamente sean aparentemente iguales (Pina et al., 2012).

### **1.3.2.2 Variabilidad en la estructura poblacional**

Las especies de artrópodos se encuentran prácticamente en todos los ecosistemas dada su inmensa capacidad de adaptación ecológica. Este éxito biológico se atribuye a su diversidad en tamaño y estructura, sus estrategias de reproducción y su inmensa capacidad de adaptación a distintos tipos de alimentación y comportamiento. Estas



razones hacen que exista una elevada variabilidad entre especies y dentro de especies, observable tanto a nivel morfológico como genético y que se atribuye a su compleja interacción con el medio (Dempster y McLean 1999). Los estudios ecológicos y poblacionales permiten llegar a entender la evolución y diversificación de estas especies y su influencia sobre el hábitat en el que se encuentran (Speight et al., 2008). En el pasado los avances en el estudio de la diversidad genética y la ecología de los artrópodos se realizaban mediante el uso de los principios de la genética clásica, utilizando los caracteres morfológicos visibles. En la actualidad las limitaciones que presentan este tipo de caracteres pueden salvarse mediante el uso de los marcadores moleculares (Behura, 2006). Esto permite de una manera directa medir y cuantificar la variación genética entre y dentro de las poblaciones.

Como ya se ha comentado, el gen de Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) del ADN mitocondrial, es uno de los más utilizados para el establecimiento de relaciones filogenéticas de artrópodos y ha sido también muy utilizado para estudios de variabilidad genética en diferentes poblaciones de artrópodos (Black y Piesman, 1994; Navajas et al., 1996, 1998, 1999; Black et al., 1997; Norris et al., 1999; Avise 2000, 2004; Söller et al., 2001; Smith et al., 2002; Ishiwata et al., 2011).

Los microsatélites son por sus características unos excelentes marcadores moleculares (Jarne y Lagoda, 1996; Goldstein y Schötterer, 1999). En los últimos años ha aumentado el número de estudios poblacionales con estos marcadores (Wilson et al., 2004; Augustinos et al., 2008; Bech et al., 2010; Telles et al., 2011; Sun et al., 2012; Boubou et al. 2012), ya que permiten determinar la existencia de diversidad genética y la estructura poblacional como resultado de procesos de selección naturales o artificiales.

Los estudios filogenéticos o de variabilidad de poblaciones también pueden ayudar de una forma más directa en el control biológico de una plaga por medio de la selección del enemigo natural más adecuado. Como ya se ha comentado, la búsqueda de los enemigos naturales de una plaga se suele realizar en el origen geográfico de ésta, donde se espera que tanto la plaga como sus enemigos naturales tengan elevados niveles de variabilidad genética (Jervis, 2005). Para realizar las sueltas, se debe seleccionar el enemigo natural que mejor se adapte a nuestras condiciones. La medición de la variabilidad genética por medio de marcadores también puede ser útil en los procesos de cría del enemigo natural, producción a gran escala y posterior liberación en el campo, y permiten el seguimiento de las poblaciones para minimizar los niveles de consanguinidad y determinar después de las sueltas los genotipos que

han prevalecido y las características que contribuyen a la eficiencia de su control (Roderick y Navajas 2003; Hurtado et al., 2008a).

### 1.3.2.3 Relaciones tróficas

Los estudios de las relaciones tróficas depredador-presa se realizaban tradicionalmente diseccionando al depredador e identificando su contenido estomacal (Agarwala et al., 1987; Sunderland et al., 1987; Breene et al., 1990). En el caso de depredadores chupadores sus presas son imposibles de detectar a simple vista por este procedimiento y había que buscar sus exoesqueletos. Muchas veces los depredadores son de pequeño tamaño, lo que dificulta cualquier tipo de identificación. Las técnicas moleculares permiten la detección de la presa y el depredador independientemente del tamaño y del estadio de desarrollo en el que se encuentren, ya que se basan en la detección del ADN (Zaidi et al. 1999; Agustí et al., 1999; 2000). Para ello se selecciona una región del genoma, que suelen ser regiones multicopia, como la de los genes mitocondriales COI y COII (Agustí et al., 2003a,b; Chen et al., 2000), o la de los ITS en el ADNnr (Hoogendoorn y Heimpel, 2001; Pina et al., 2010; Pérez-Sayas et al., 2011) y se diseñan cebadores específicos. La secuencia de estas regiones está disponible en las bases de datos para muchas especies de artrópodos. Esta técnica ha sido utilizada con éxito en pequeños depredadores como los fitoseidos para la detección de sus tetraníquidos presa. La utilización de la PCR multiplex permite además identificar varios depredadores y sus presas con una única amplificación (Pina et al., 2010; Pérez-Sayas et al., 2011).

### 1.3.2.4 Relaciones simbióticas

La mayoría de los artrópodos tienen una flora bacteriana en su interior que en muchos casos es una simbiosis estricta (Schwemmler, 1989). Una de las bacterias sobre las que más estudios se han realizado es la  $\alpha$ -proteobacteria *Wolbachia*, un grupo de bacterias intracelulares que manipula la reproducción de los artrópodos huéspedes en los que se encuentra y que causa incompatibilidad reproductiva (Breeuwer et al., 1992; O'Neill et al., 1992; Rousset et al., 1992; Stouthamer et al., 1993; Werren et al., 1995a; Werren et al., 1995b). La bacteria se sitúa en los tejidos del aparato reproductor de los artrópodos y se transmite de la madre al citoplasma de los huevos, creando incompatibilidad citoplasmática entre especies (Brewer y Werren, 1990; Brewer et al., 1992) e incluso dentro de una misma especie (Clancy y Hoffmann, 1996), induciendo la partenogénesis (Stouthamer y et al., 1993) y la feminización de los

machos (Rousset et al., 1992). *Wolbachia* se encuentra ampliamente distribuida entre los insectos (Werren et al., 1995) y también se ha encontrado entre los ácaros (Johanowwicz y Hoy., 1995; Breeuwer, 1997), entre ellos en *T. urticae* (Brewer y Jacobs, 1996; Tsagakakou et al., 1996).

### **1.3.2.5 Resistencias a insectidas**

La seguridad alimentaria se ha convertido en un factor clave en el siglo XXI. El uso indiscriminado de pesticidas conduce en muchas ocasiones a la aparición de resistencias, además de generar residuos que pueden afectar al medio ambiente, a los enemigos naturales y producir efectos nocivos sobre la salud humana. Los sistemas de gestión integrada de plagas promueven la aplicación más racional de estos productos y el desarrollo de materias activas cada vez más selectivas. Para ello es necesario conocer los mecanismos de acción de los pesticidas. La mayoría de los pesticidas comerciales suelen actuar sobre unas pocas dianas moleculares (acetilcolinesterasas, canales de sodio, receptores de la acetilcolina, etc). Gracias a las técnicas biotecnológicas se ha conseguido descubrir de forma más precisa el modo de acción de muchos pesticidas (Field et al., 1988; Magaña et al., 2007, 2008), permitiendo el desarrollo de materias activas más específicas. Sin embargo, todavía existe el riesgo de aparición de resistencias cruzadas con la utilización de pesticidas que actúan sobre dianas moleculares similares (IRAC, 2012).

La secuenciación del genoma y el transcriptoma de muchas especies de artrópodos está permitiendo el estudio de nuevas dianas para los pesticidas y los mecanismos de resistencia implicados, gracias a de la utilización estrategias conjuntas (Pauchet et al., 2009; Lucas, 2010). Una de las técnicas moleculares más novedosas para el control de plagas es el uso del RNA de interferencia (RNAi), que ha permitido por medio del silenciamiento génico, no sólo desvelar los secretos de los principales mecanismos de resistencia (Revuelta et al., 2009; Belles, 2010) sino también su utilidad como pesticida (Revuelta, 2010; Wang et al., 2011).

## **1.4 Aplicaciones de los marcadores moleculares a la mejora del control de *T. urticae***

Al igual que en el resto de especies de artrópodos, las técnicas moleculares se están utilizando en estudios de los ácaros (Navajas y Fenton, 2000; Hurtado et al., 2008a) Éstas nos dan información sobre las dinámicas de la plaga, patrones de dispersión,

estructura poblacional, preferencias alimenticias y además pueden explicar las proliferaciones que se observan en los distintos sistemas productivos. La gestión de *T. urticae* puede verse beneficiada por el uso de estas técnicas, no sólo por su aplicación a los estudios de esta plaga sino también a sus principales agentes de control biológico: los ácaros fitoseidos (Navajas et al., 1999; Hurtado et al., 2008a).

Los primeros marcadores utilizados en las especies de tetraníquidos fueron los isoenzimas. Tsagkarakou y colaboradores (1997, 1998) utilizaron el polimorfismo de las isoenzimas para estudiar la estructura poblacional de *T. urticae* en Creta (Grecia). No se encontró diferenciación genética entre las muestras de poblaciones recogidas en diferentes hospedadores, entre ellos los cítricos, sin embargo se encontró diferenciación genética en función de la distancia geográfica en campo e invernadero (Tsagkarakou et al., 1998). La estructura poblacional se vio además afectada por la densidad del ácaro y la distancia entre las plantas. La utilización de los mismos marcadores en poblaciones de *T. urticae* en invernaderos del sur de Francia llevó a conclusiones similares (Tsagkarakou et al., 1999).

Los primeros estudios en fitoseidos se realizaron con los marcadores RAPDs, para discriminar entre 3 especies de fitoseidos depredadores del ácaro verde en papaya, *Manihoti esculenta* Crantz: *Typhlodromus limonicus* (Garman y McGregor), *T. manihoti* (de Moraes) y *T. tenuiscutus* (McMurtry y de Moraes) (Edwards et al., 1997). Yli-Mattila y colaboradores (2001) utilizaron también estos marcadores conjuntamente con los ITS para estudiar su eficacia en la identificación del fitoseido *Euseius finlandicus* (Oudemans) y para su posterior control y seguimiento de las sueltas en explotaciones comerciales de manzano.

En acarología las secuencias del ADN nuclear ribosomal (ADNnr) y en concreto las regiones ITS (*Internal Transcribed Spacers*) se han utilizado también en estudios filogenéticos y de identificación de especies (Hillis y Dixon, 1991, Navajas et al., 1999; Navajas y Boursot, 2003; Ben-David et al., 2007, Hurtado et al, 2008b). Este tipo de marcadores también se ha utilizado para resolver algunos problemas taxonómicos (Navajas et al., 1999). La técnica de RFPL-PCR de la región del ITS2 fue utilizada por Navajas y colaboradores (1992) para estudiar las relaciones filogenéticas entre especies de Tetraníquidos de importancia económica. Este estudio mostró que las relaciones filogenéticas interespecíficas en el género *Tetranychus* concuerdan con los datos morfológicos. En un estudio similar Hurtado y col (2008b) estudiaron las secuencias ITS1 e ITS2 de los ácaros tetraníquidos presentes en los campos de clementino de la Comunidad Valenciana, confirmando que la región ITS2 es un buen

marcador para diferenciar especies, mientras que la región ITS1 podría ser interesante en estudios de diferenciación poblacional. Las secuencias del ITS2 han demostrado ser una herramienta efectiva para la identificación de las especies de tetraníquidos y pueden ser aplicables como una herramienta de diagnóstico de tetraníquidos en cuarentenas, control de plagas y toma de decisiones (Osakabe et al., 2002; Ben-David et al., 2007).

Navajas y colaboradores (1999b) también utilizaron los ITS para estudiar la variabilidad de las secuencias en las especies *N. californicus*, *Neoseiulus fallacis* (Garman), *Euseius concordis* (Chant), *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt), *Typhlodromus pyri* Scheuten y *P. persimilis*. Disponer de estas secuencias permite también la realización de estudios sobre las relaciones tróficas presa-depredador. Pérez-Sayas y colaboradores (2009), con la finalidad de conocer las relaciones tróficas de la acarofauna de cítricos, desarrollaron una PCR multiplex basada en la región ITS que permite identificar a los principales fitoseidos depredadores (*E. stipulatus*, *P. persimilis*, *T. phialatus*, *N. californicus* y *Neoseiulus barkeri* Hughes) y las principales especies de tetraníquidos plaga (*T. urticae* y *P. citri*).

Conocer la secuencia del genoma mitocondrial (mt) de los artrópodos puede ampliar el abanico de las técnicas moleculares actualmente aplicadas en estos organismos (Dermauw et al., 2010). En los últimos años se ha secuenciado el genoma mitocondrial de bastantes artrópodos (Boore, 2006). Como ya se ha comentado anteriormente, el ADN mitocondrial (ADN mt) es una de las regiones del genoma más interesantes para el establecimiento de linajes. En Tetraníquidos han sido secuenciados los genomas mitocondriales de *T. urticae*, *Panonychus ulmi* Koch y *P. citri* (Yuan et al., 2010). Navajas et al., 1998a utilizaron el gen de la Citocromo Oxidasa I para estudiar origen y la procedencia de *T. urticae* en diferentes regiones de Europa y Asia. Gracias a este marcador se sabe que hubo una colonización inicial en la cuenca mediterránea y posteriormente estas poblaciones colonizaron regiones más septentrionales de Europa y Asia, distinguiendo dos linajes principales. Básándose en los resultados de Navajas y colaboradores (1998a), Hinomoto y colaboradores 2001 analizaron las relaciones filogenéticas existentes entre formas rojas y verdes de *T. urticae* de poblaciones japonesas, volviendo a encontrar dos linajes principales. Xie y colaboradores (2006) repitieron el estudio en poblaciones chinas aisladas geográficamente obteniendo resultados similares. Este mismo gen mitocondrial ha sido utilizado para el estudio del origen de la especie invasora *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard, que ha sido localizada recientemente en Norteamérica, Europa y África (Migeon et al. 2009).

Boubou, y colaboradores (2010) estudiaron especímenes procedentes de todas las regiones del mundo. La gran diversidad genética encontrada en la región COI de las poblaciones sudamericanas corrobora la procedencia de *T. evansi* de dicho continente. La región COI ha sido también utilizada para el establecimiento de correlaciones entre las características morfológicas y genéticas de dos ácaros tetraníquidos *T. evansi* y *Tetranychus takafuji* Ehara and Ohashi (Gotoh et al., 2009).

La variación y evolución del ADNmt puede estar influenciado por los endosimbiontes (Heddi et al., 2001). El marcador COI se utilizó para estudiar los efectos de la bacteria simbiótica *Wolbachia* en diferentes poblaciones de araña roja (Yu et al., 2011), sugiriendo que *Wolbachia* puede reducir en una gran medida los haplotipos y la variabilidad del ADN mt en sus huéspedes. Se sabe además que las mutaciones que ocurren en el genoma mitocondrial de *T. urticae* son las responsables de su resistencia a los plaguicidas (van Leeuwen et al., 2008).

Los genes mitocondriales 12S ARNr y Cytb han sido utilizados en estudios de identificación de fitoseidos (Jeyaprakash y Hoy, 2002; Okassa et al., 2010) o para discriminar entre diferentes comportamientos de depredación de estos ácaros (Tixier et al., 2010). Hoy en día se conoce el genoma completo del ADN mitocondrial de *M. occidentalis* (Jeyaprakash y Hoy, 2007) y *P. persimilis* (Dermauw et al., 2009).

Al igual que en el resto de los artrópodos, los marcadores microsatélites se consideran muy adecuados para la realización de estudios poblacionales en ácaros. En *T. urticae*, sin embargo, se sabe que la representación de éstos en el genoma es limitada (Navajas et al., 1998b; Grbić et al., 2011). Muchos de los *loci* microsatélites que se han desarrollado en los últimos años (Navajas et al., 1998b; Navajas et al., 2002; Uesugi y Osakabe, 2007) han demostrado tener un elevado número de alelos por cada *locus* (Navajas et al., 1998b), sin embargo, el polimorfismo observado es bajo. Los primeros marcadores microsatélites desarrollados en *T. urticae* (Navajas et al., 1998b) permitieron determinar la diversidad genética de la araña roja en invernaderos de berenjena y su estructura genética, determinando su dinámica de infestación (Navajas et al., 2002). De forma simultánea a la realización de esta tesis, Uesugi y Osakabe (2007) diseñaron nuevos microsatélites en *T. urticae* que utilizaron posteriormente para estudiar el efecto de la dispersión sobre la estructura genética de la araña roja en invernaderos comerciales de rosales (Uesugi et al., 2009a). La baja dispersión de la araña hace que apenas exista flujo genético entre poblaciones y sólo se produzca entre colonias vecinas. Los mismos autores realizaron un estudio similar en campos de manzano (Uesugi et al., 2009b), observando que altas tasas de infestación del

ácaro promovían la migración de la araña dentro del mismo árbol a distancias comprendidas entre 10 y 24 metros, mientras que la dispersión aérea era capaz de transportar los ácaros a distancias de hasta 100 m.

Además de determinar la estructura genética de las poblaciones, los marcadores microsatélites también han sido utilizados para resolver dilemas taxonómicos. Existe mucha controversia sobre la asignación a dos especies diferentes, *T. urticae* y *T. cinnabarinus*, de las formas rojas y verdes de estos tetraníquidos presentes en China. Ros y Breeuwer, 2007 y Bolland y colaboradores 1998 presentan argumentos a favor de que se trate de la misma especie. Li y colaboradores (2009), y más recientemente, Sun y colaboradores (2012) utilizaron marcadores microsatélites en poblaciones de *T. urticae* y *T. cinnabarinus* procedentes de lugares distantes de China. En ambos casos el análisis genético separó ambas poblaciones, sin que esta diferenciación tuviera que ver con la distancia geográfica. Estos resultados no son del todo concluyentes, ya que existen en estos ácaros otros factores que favorecen el mantenimiento de una fuerte diferenciación poblacional, como son sus bajos niveles de diversidad genética, el limitado flujo genético entre poblaciones, el aislamiento por distancia (Sun et al., 2012) y la presencia de diferentes razas de *Wolbachia* (Tsagkarakou et al., 1996).

En la actualidad sólo han sido desarrollados marcadores microsatélites para una especie de fitoseido, *Neoseiulus womersleyi* (Schicha), (Hinomoto y Maeda, 2005; Hinomoto et al., 2011), obteniendo un número excesivo de alelos por marcador. Esto dificulta la asignación de alelos a *loci* concretos, limitando su utilización en estudios poblacionales. El bajo número de marcadores disponible para este importante grupo de ácaros hace imprescindible la transferencia a estas especies de marcadores microsatélites desarrollados en especies próximas.

Los estudios genéticos poblacionales realizados por nuestro grupo comenzaron con la diferenciación de poblaciones de araña roja en campos comerciales de clementino situados a lo largo de todo el litoral valenciano, con la finalidad de demostrar que la araña está formada por una mezcla razas especializadas en diferentes huéspedes. Se utilizaron los 5 *loci* microsatélites que habían sido desarrollados previamente para la araña roja (Navajas et al., 1998; 2002). Estos primeros marcadores microsatélites sólo permitieron establecer diferencias filogeográficas, pero no diferenciaban las poblaciones de araña presentes en el árbol de las poblaciones de araña encontradas en la cubierta espontánea (Hurtado et al., 2008c). Esto llevó a la necesidad de buscar nuevos marcadores microsatélites, ya que un mayor número de *loci* aumenta las posibilidades de encontrar las diferencias entre las poblaciones (Boecklen y Howard,

1997; Rannala y Mountain, 1997). Los marcadores desarrollados por Uesugi y Osakabe (2007) también podían ser utilizados en nuestros estudios poblacionales. La diferenciación de razas adaptadas a diferentes hospedadores sigue siendo una prioridad para nuestro grupo. La utilización de una cubierta vegetal de la gramínea *F. arundinacea* en los campos de cítricos permite una mejor regulación de las poblaciones de *T. urticae*, en comparación con otras técnicas de mantenimiento del suelo, como el suelo desnudo o la cubierta vegetal espontánea (Aguilar-Fenollosa et al., 2011c). Por medio de la combinación del trasplante recíproco y el uso de los marcadores moleculares microsatélites disponibles para esta especie y especies próximas (Navajas et al., 1998; Nishimura et al., 2003; Uesugi y Osakabe, 2007), se compararon poblaciones recolectadas sobre festuca y clementino, encontrándose indicios de adaptación local de la araña roja a ambos hospedadores (Aguilar-Fenollosa et al., 2012).

Durante la realización de la presente tesis se produjo un hito importante en el avance de las herramientas biotecnológicas para *T. urticae*. Se consiguió secuenciar y anotar en su totalidad el genoma de *T. urticae* (Grbić et al., 2011). La araña roja fue elegida como organismo pionero dentro del grupo de los quelicerados, debido al reducido tamaño de su genoma (90Mb), su rápido desarrollo y la facilidad de mantenimiento de las crías en el laboratorio (Grbić et al., 2008). La anotación del genoma completo de *T. urticae* está disponible en la página web de BOGAS (BOGAS, 2011). Disponer del genoma completo de *T. urticae* y otras especies de artrópodos permitirá incrementar nuestros conocimientos sobre su evolución. Además proporciona unas oportunidades únicas para el desarrollo de estrategias de protección de cultivos, ya que se han localizado familias de genes asociados con la alimentación y la detoxificación, importantes para el estudio de las interacciones planta-artrópodo. De hecho, ya se están utilizando estas secuencias para el diseño de microarrays expresión para esta especie. El conocimiento aportado por el genoma abrirá nuevas perspectivas a la investigación de la araña roja.

## **1.5 Objetivos**

Los tratamientos químicos que hoy día se siguen aplicando para el control de *T. urticae* en clementino provocan efectos no deseados que dificultan la adopción de estrategias de GIP en este cultivo. Con la finalidad de mejorar estas estrategias en clementinos, se plantearon los siguientes objetivos:



1. Determinar la influencia de la brotación estival y otoñal de los clementinos en el daño provocado por *T. urticae* en la fruta.
2. Desarrollar los umbrales de intervención, Umbral Económico de Daño (UED) y Umbral Económico (UE), de *T. urticae* en clementino. Para ello se han de conocer previamente las dinámicas poblacionales tanto de la plaga como de sus principales enemigos naturales: los fitoseidos, y sus relaciones con el daño. Hay que determinar qué parámetros pueden utilizarse para optimizar la estimación de la densidad de *T. urticae* que idealmente no habría que rebasar.
3. Desarrollar técnicas moleculares aplicables al estudio de la variabilidad genética de las poblaciones de *T. urticae*. Con este fin, se aislarán y caracterizarán nuevos marcadores microsatélites, que se incluirán en PCRs multiplex para su aplicación a *T. urticae* y posiblemente a especies próximas.



2. Can summer and fall vegetative growth regulate the incidence of *Tetranychus urticae* Koch on clementine fruit?



Una versión de este capítulo está publicada: Can summer and fall vegetative growth regulate the incidence of *Tetranychus urticae* Koch on clementine fruit? **Crop protection**, 27: 459-464.



## 2. Can summer and fall vegetative growth regulate the incidence of *Tetranychus urticae* Koch on clementine fruit?

### Abstract

Fruit scarring caused by *Tetranychus urticae* is one of the main pest problems faced by Spanish clementine growers as it can completely downgrade the quality of the fruit completely. *Tetranychus urticae* infestations concentrate on fruit at the end of summer. This study assessed the influence of vegetative growth of clementine trees during summer and fall on the damage caused by *T. urticae*. Damage significantly increased in trees in which summer and fall flushes were mechanically removed. This indicates that summer and fall leaf growth is a key factor limiting mite damage on fruit. Cultural and crop protection practices which promote abundant normal summer and fall vegetative growth seem to be critical for minimizing the impact of *T. urticae* populations on fruit quality.

**Key words:** citrus, *Phyllocnistis citrella*, citrus aphids, mite movement.

### 2.1 Introduction

The highly polyphagous two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), is a major pest of citrus in Spain (Aucejo et al., 2004), and in other citrus growing areas (Talhok, 1975; McMurtry, 1985; Smith et al., 1997; University of California, 1991). Lemon (*Citrus limon* L.Burm.) and clementine (*Citrus clementina* Tanaka) trees are especially sensitive to outbreaks of this mite in Mediterranean climates. *Tetranychus urticae* is one of the main pests of citrus in the region of La Plana (39° 59'N; 00° 02'W), the center of Spanish clementine production. Mite infestations result in chlorotic spots on leaves which can drop prematurely and, more importantly, in fruit scarring. Spain is the largest exporter of citrus for the fresh market (Anon, 2000, FAOSTAT 2012) and injured fruit have no commercial value.

Reasons for *T. urticae* infestations in citrus are poorly understood. Stress factors, such as water stress, heat and salinity, and some cultural practices, such as pesticide use, weed management, or fertilization, are related to damage potential (Anon, 1991; Ripollés et al., 1995; Quirós-González, 2000; Aucejo et al., 2003, 2004).

A critical time for managing *T. urticae* on clementines occurs toward the end of summer, when mites migrate from leaves to fruit. Small populations can result in severe fruit damage. The reason for this migration is not clear, but recent leaf flushes could be crucial. Citrus orchards require 750 to 1200 mm of water annually (Agustí, 2000). Mean annual rainfall in La Plana is 442 mm unevenly distributed during the year (Anon, 2006), and irrigation is necessary. Water stress is common in citrus orchards toward the end of summer, and this phenomenon alters typical citrus vegetative growth. In Spain, citrus present one main period of vegetative growth around March when up to 400 new shoots per m<sup>2</sup> are produced and two secondary peaks between August and October (when 20-30 new shoots per m<sup>2</sup> can appear) (Urbaneja et al., 2000). A deficient water supply during the summer-fall vegetative growth period can reduce the amount of leaves formed (Urbaneja et al., 2000). Furthermore, summer pests attacking young leaves, such as the citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) or citrus aphids [mainly *Aphis spiraecola* Pagenstecher and *Aphis gossypii* (Glover)] can also reduce the amount of healthy new leaves in citrus. If insufficient new leaves are available for *T. urticae*, mites can migrate from leaves and concentrate on fruit. Therefore we hypothesize that fruit damage could increase in years when citrus vegetative growth is altered. The aim of this study was to assess the influence of leaf flush during summer and fall on the damage caused by *T. urticae* on clementine fruit.

## 2.2 Material and Methods

The assay was carried out at Les Alqueries (39°54'N, 0°06'W, 23 m alt.), in a 0.6 ha orchard consisting of 15-year-old *C. clementina* 'Clementina de Nules' (INIASEL 22) grafted on Carrizo Citrange rootstock [*Poncirus trifoliata* (L.) Rafinesque-Schmaltz x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. The orchard had received no pesticide treatments since 2003 and was drip-irrigated on bare soil. Two separate assays were carried out in two consecutive years: 2005 and 2006.

### 2.2.1 Assay in 2005

Four separate plots (A, B, C and D) each consisting of four adjacent trees forming a square, were selected within the orchard. Selected trees were lightly pruned at the end of July to ensure that there was no contact between trees. Each tree was considered a replicate. Two plots (A and B) were artificially infested with *T. urticae*. All summer and fall vegetative growth was removed in plots A and C.

On August 1, plots A and B were artificially infested with *T. urticae*. Mites were obtained from a colony established in 2001 (Aucejo et al., 2004). In order to obtain enough individuals for the infestation, young potted clementine plants were infested in a greenhouse at the Universitat Jaume I, Castelló. When the selected plots were infested, the young plants were cut, their infested canopies placed in a plastic bag, transported to the orchard, and tied to the branches of the trees. The process was repeated until mite establishment was observed on the 8 selected trees on August 14. Beginning in August 1, any vegetative growth appearing in trees from one of the infested plots (A) and one of the uninfested ones (C) was removed. Trees were inspected weekly and flush removal continued until harvest on December 18. At that time fruit from every tree in the four plots was weighed and individually inspected for presence of mites and mite damage. Mite damage was rated according to a 6-class scale (Table 2.1). A damage index was obtained for every tree by multiplying the percentage of each fruit class within a tree by the respective class number (0-5).

### **2.2.2 Assay in 2006**

Only three plots (A, B and D) analogous to those used the previous year were selected in this case. Similarly, selected trees were pruned at the end of July. Plots A and B were artificially infested with *T. urticae* from August 1, and summer and fall vegetative flushes were removed in plot A only. Mite population was monitored weekly. At each visit, the number of female adult mites on (1) six randomly selected leaves, (2) up to twelve symptomatic leaves, if available, and (3) six randomly selected fruit per tree were counted (Martínez-Ferrer et al., 2006a). Based on these data, mite-day values were calculated for each substrate. Trees in plot D received two acaricide treatments of Comanche 0.035% [a.i. Tebufenpyrad 20% WP (w/w), BASF Española, SA] to maintain mite populations as close to zero as possible. The first treatment was applied on July 31 and the second on September 8. On November 27 fruit was harvested and classed as above.

Results from 2005 were subjected to 2-way ANOVA at  $P < 0.05$  (factors were: mite infestation and flush removal), whereas those from 2006 were subjected to 1-way ANOVA at  $P < 0.05$  (STSC, 1987). If necessary, data were arcsin-transformed prior to analyses. Mean separation was performed using Duncan's test ( $P < 0.05$ ). The relationship between mite population and damage was investigated in 2006 by regression analysis using the same software package.

### 2.3 Results

No significant differences were observed for fruit production ( $33.3 \pm 3.3$  kg, mean and standard error), number of fruit per tree ( $286.8 \pm 32.9$  fruit), fruit weight ( $119.8 \pm 5.8$  g) and percentage of mite-occupied fruit ( $14.8 \pm 1.3\%$ ) in 2005 (Table 2.2.a). However, both the percentage of unblemished fruit and the damage index were significantly affected by the artificial mite infestation and the removal of summer and fall vegetative growth. Significantly lower damage values were obtained for those trees whose leaf flushes were left undisturbed (B and D) and for those where no mites were introduced (C and D) (Figure 2.1.a). A similar pattern was observed in 2006 (Table 2.2.b). No significant differences were observed for fruit production ( $35.3 \pm 3.4$  kg) and the number of fruit per tree ( $345.6 \pm 39.0$ ). However, the percentage of mite-infested fruit, the percentage of unblemished fruit and the damage index were significantly affected by the treatments. Control trees, where chemical control was applied, showed the lowest damage values, followed by infested trees where new leaves were left intact and then by infested trees with no new leaves (Figure 2.1.1b). In general, damage values in 2006 were lower than those in 2005 and the percentage of female-occupied fruit at harvest ranged from 12 to 18% in 2005, whereas it barely exceeded 3.5% in 2006. During 2006 mite populations were low during the whole experiment except for the first month, after the artificial infestation of plots A and B (Figure 2.2). Mite days (MD) accumulated during this period on leaves and fruit represented more than 80% of MD accumulated during the entire experimental period (Table 2.3).

Regression analyses showed that MD accumulated on either symptomatic or random leaves was significantly related to both the percentage of blemish-free fruit and the damage index (Table 2.4). Significance was highest for random leaves when only the first month after infestation was considered.

### 2.4 Discussion

The lack of effect of *T. urticae* populations on the different production parameters considered (Table 2.2) was expected because of the short period of interaction between mites and fruit. Such an effect might be observed either after successive years of sustained presence on a tree, or if infestation took place earlier during fruit set.

The removal of summer and fall new vegetative growth without any addition of mites in 2005 resulted in an 83.5% increase of damaged fruit and 144.0% increase in the



damage index (plot C versus plot D). Lower values (24.8% increase in damaged fruit and 20.0% increase in the damage index) were obtained when examining the effect of flush removal in artificially infested plots (plot A versus plot B). Although mites were artificially added to trees only in plots A and B in 2005, at the end of the assay mites could be found on all trees and the percentage of mite-infested fruit was not significantly different among treatments. However, the damage caused by mites was much more conspicuous in artificially infested trees than in control (up to 152.9% increase of damaged fruit and 264.8% increase in the damage index). These results may be attributed to the different MD values accumulated in artificially-infested (A and B) versus control (D) trees. Therefore, when the assay was repeated in 2006, we counted mite populations on both fruit and leaves weekly. We also chemically controlled *T. urticae* on control trees; as a consequence, the (C) treatment (no mites, no flush) was not repeated. These chemical applications kept mite populations lower than in untreated trees (Table 2.3). The percentage of female-occupied fruit at harvest was more than 1000% lower in control than in infested trees and, as a result, the percentage of unblemished fruit and the damage index were 44.6 and 144.1% lower than in infested trees. When new vegetative growth availability was considered, the percentage of unblemished fruit decreased by 39.7% and the damage index increased by 50.8% (plot A versus B), and this should be attributed exclusively to removal of new vegetative growth.

Additionally, it appears that the presence of mites on trees in August is enough to downgrade fruit (as was observed in 2006) and populations occurring later during the season do not necessarily imply increased damage (as was observed in 2005). Mite populations on leaves, expressed as accumulated mite days, were strongly related to damage, and relationship was strongest when only the first month (August) was considered (Table 2.3).

Quirós-González (2000) studied the effect of a 6-week period without irrigation on the dynamics of three different mite species (*Phyllocoptruta oleivora* [Ashmead], *Tetranychus mexicanus* [McGregor] and *Brevipalpus phoenicis* [Geijskes]) on Tahiti lime, *Citrus latifolia* Tanaka, in Venezuela. She observed that *T. mexicanus* was the only species that immediately infested new leaves formed as soon as water supply was re-established. The occurrence of a similar phenomenon could account for the migration to fruit observed in *T. urticae* when new leaves are not available. This migration could also be triggered by the increased reproduction observed for *T. urticae* on plants subjected to low saline stress (Aucejo et al., 2004), which could appear in

orchards under suboptimal irrigation. Furthermore, even when normal vegetative growth occurs, new leaves can be destroyed by pests specialized for this kind of substrate, i.e., the citrus leafminer or aphids. Both the leafminer and aphids are not considered important pests for adult trees and are therefore not specifically treated in Spain. The citrus leafminer regularly affects around 100% of new summer and fall vegetative growth under Mediterranean climates (Urbaneja et al., 2000) and this destruction could also trigger mite movement to fruit. Aphids, especially *A. spiraecola*, deform citrus leaves, and the high populations on these leaves after a short time (Hermoso de Mendoza et al., 2006) could also force *T. urticae* to migrate to fruit.

Our results indicate that the occurrence of normal summer and fall vegetative growth flushes limit the amount of mite damage on fruit, especially when *T. urticae* populations are low. Therefore, cultural practices (mainly a proper irrigation program) and the control of pests attacking new leaves (*P. citrella* and aphids) to ensure the presence of abundant summer and fall vegetative growth seem to be crucial for minimizing the impact of *T. urticae* populations on fruit quality and consequently on the amount of fruit discarded at harvest. Moreover, the influence of new vegetative growth on mite damage should not be ignored when establishing action thresholds against this pest.

### Acknowledgments

The authors thank J.E. Peña and R. E. Litz (TREC-UFL, Homestead, USA) and A. Urbaneja (IVIA, Montcada, Spain) for critical comments on an earlier version of this manuscript, A. Benajes (COCALNI, Les Alqueries) for providing the study orchard and P. López and L. Zaragoza (UJI) for their assistance during the counting. This work was partially funded by the Ministerio de Educación y Ciencia (projects AGL2004-07464-C03-01 and AGL2005-07155-C03) and the Fundació Bancaixa – Caixa de Castelló (project P1.1B2003-06). S. Pascual-Ruiz was recipient of a grant from MEC.

**Table 2.1.** Fruit damage classes (0-6 scale) used in this study.

Damage class	Description
--------------	-------------

## Vegetative growth

---

0	Unblemished
1	small scar close to stylar or peduncular areas
2	scar covering less than 12% fruit rind
3	scar covering between 13 and 25 % fruit rind
4	scar covering between 26 and 50 % fruit rind
5	scar covering more than 50 % fruit rind

---

**Table 2.2.a.** Production and damage parameters of the four different treatments in 2005: artificially infested pruned plot (A), artificially infested plot (B), pruned plot (C) and control plot (D). Mean (m) and standard error (se).

Treatment (plot)	Blemish-free fruit (%)		Mite-occupied fruit (%)*		Damage index (0-5 scale)		Production (kg per tree)		No. of fruit per tree		Fruit weight (g)		
	M	Se	m	se	M	se	M	se	m	se	m	se	
<b>No flush + mites (A)</b>	10.2	1.6	14.2	1.7	2.301	0.251	33.8	4.3	337.5	46.4	104.7	9.9	
<b>Flush + mites (B)</b>	28.0	5.4	15.9	3.5	1.917	0.271	38.0	3.8	306.0	31.9	124.1	7.3	
<b>No flush (C)</b>	34.2	3.0	17.2	2.2	1.539	0.164	38.5	12.2	318.5	122.5	124.4	6.9	
<b>Control (D)</b>	64.5	9.8	11.9	1.1	0.631	0.274	22.8	1.7	185.0	10.0	125.8	7.2	
<b>ANOVA- P</b>	<b>Spider mite</b>	0.0001		0.8275		0.0004		0.4135		0.2831		0.1503	
	<b>Flush removal</b>	0.0005		0.3511		0.0102		0.3676		0.2100		0.1503	
	<b>Interaction</b>	0.2438		0.1126		0.2411		0.1309		0.4289		0.2124	

\* Data were asin(sqrt)-transformed for analysis.  
Degrees of freedom were 1, 12 in all cases

**Table 2.2.b.** Production and damage parameters of the three different treatments in 2006: artificially infested pruned plot (A), artificially infested plot (B) and control plot (D). Mean (m) and standard error (se).

Treatment (plot)	Blemish-free fruit (%)		Mite-occupied fruit (%) <sup>*</sup>		Damage index (0-5 scale)		Production (kg per tree)		No. of fruit per tree	
	m	se	M	se	m	se	m	se	m	se
<b>No flush + mites (A)</b>	39.7 <sup>b</sup>	3.2	3.6 <sup>a</sup>	1.1	1.084 <sup>a</sup>	0.076	35.4 <sup>a</sup>	6.2	329.3 <sup>a</sup>	89.9
<b>Flush + mites (B)</b>	56.8 <sup>ab</sup>	7.1	2.4 <sup>ab</sup>	1.0	0.719 <sup>ab</sup>	0.165	45.1 <sup>a</sup>	1.8	467.0 <sup>a</sup>	65.5
<b>Control (D)</b>	71.5 <sup>a</sup>	12.6	0.2 <sup>b</sup>	0.2	0.444 <sup>b</sup>	0.227	30.0 <sup>a</sup>	10.2	294.8 <sup>a</sup>	90.4
<b>ANOVA-P</b>	0.0416		0.0296		0.0364		0.2513		0.2513	

Degrees of freedom were 2, 11 in all cases.

Within a column, data followed by the same letters are not significantly different ( $P < 0.05$ ; Duncan test).

<sup>\*</sup> Data were asin(sqrt)-transformed for analysis.

**Table 2.3.** Mean mite days accumulated from August 1 on the three experimental plots in 2006.

Treatment (plot)	Accumulated mite days					
	Symptomatic leaves		Random leaves		Fruit	
	1 <sup>st</sup> month	Whole period	1 <sup>st</sup> month	Whole period	1 <sup>st</sup> month	Whole period
<b>Control (D)</b>	10.6 <sup>b</sup>	14.2 <sup>b</sup>	13.3	16.9	0.0	0.0
<b>Flush + mites (B)</b>	33.8 <sup>a</sup>	40.7 <sup>a</sup>	50.4	57.5	1.3	2.0
<b>No flush + mites (A)</b>	30.0 <sup>a</sup>	33.2 <sup>a</sup>	47.8	51.9	1.5	1.5
<b>ANOVA-P</b>	0.0029	0.0036	0.1488	0.1310	0.4113	0.2857

Degrees of freedom were 2, 11 in all cases.

Within a column, data followed by the same letters are not significantly different ( $P < 0.05$ ; Duncan test).

Vegetative growth

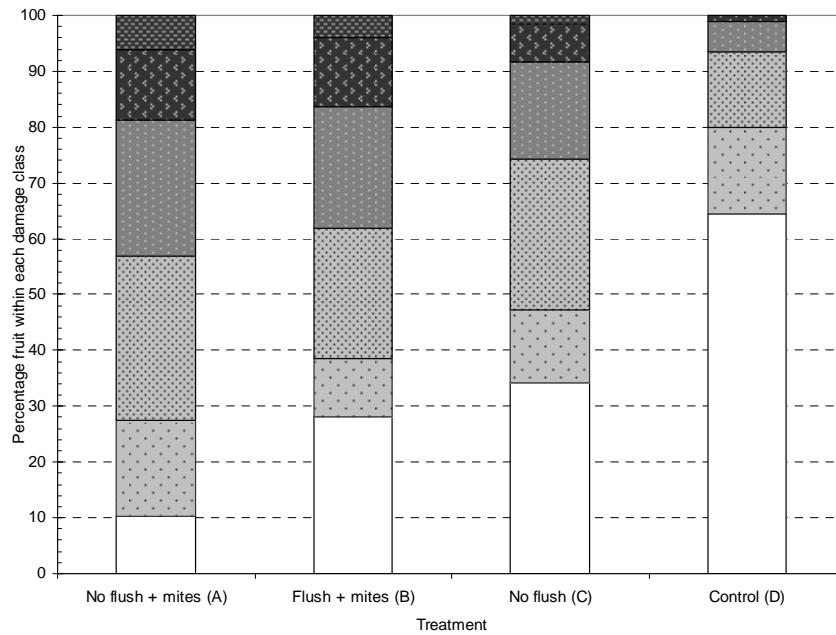
**Table 2.4.** Relationship between Accumulated Mite Days (AMD) on different substrates (x) and the percentage of blemish-free fruit and the damage index recorded at harvest (y) in 2006.

x (AMD)		y	
		Percentage of blemish-free fruit	Damage index
<b>symptomatic leaves</b>	<b>First</b>	$P = 0.0328; r = -0.5188$	$P = 0.0548; r = 0.4737$
	<b>month</b>	$y = 91.297 - 6.454 x^{1/2}$	$y^{1/2} = 0.474 + 0.011 x$
	<b>Whole</b>	$P = 0.0333; r = -0.5178$	$P = 0.0520; r = 0.4785$
	<b>period</b>	$y = 90.123 - 6.734 x^{1/2}$	$y^{1/2} = 0.477 + 0.013 x$
<b>random leaves</b>	<b>First</b>	$P = 0.0049; r = -0.6482$	$P = 0.0078; r = 0.6207$
	<b>month</b>	$y = 88.227 - 5.638 x^{1/2}$	$y = 0.147 + 0.106 x^{1/2}$
	<b>Whole</b>	$P = 0.0094; r = -0.6092$	$P = 0.0153; r = 0.5770$
	<b>period</b>	$y = 87.757 - 5.128 x^{1/2}$	$y = 0.162 + 0.095 x^{1/2}$
<b>On fruit</b>	<b>First</b>	$P = 0.1467$	$P = 0.2434$
	<b>month</b>		
	<b>Whole</b>	$P = 0.1701$	$P = 0.2132$
	<b>period</b>		

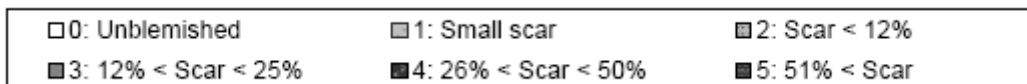
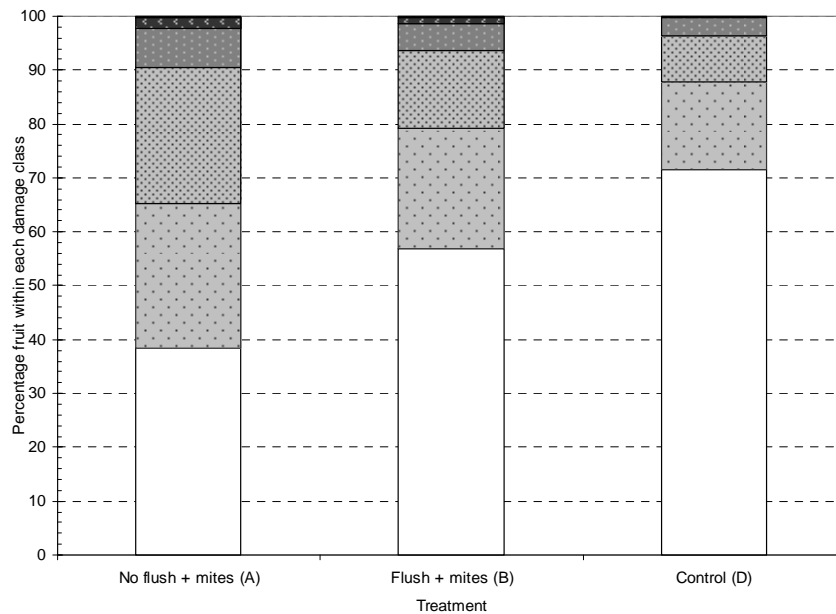
Degrees of freedom were 1, 15 in all cases.

Vegetative growth

**Figure 2.1.** Percentage of fruit within each damage class (0-5 scale, see Table 1) for the different treatments included in this study: four in 2005 (a) and three in 2006 (b).  
**Fig. 2.1.a.**



**Fig. 2.1.b.**



**Figure 2.2.** Mean *T. urticae* female counts on different substrates: a. Symptomatic leaves; b. Random outer leaves; c. Fruit, from August 1 until harvest (November 27) for



Vegetative growth

the three different treatments in 2006: control plot (control), artificially infested plot (mite), and artificially infested and pruned plot (mite no flush).

Figure 2.2.a.

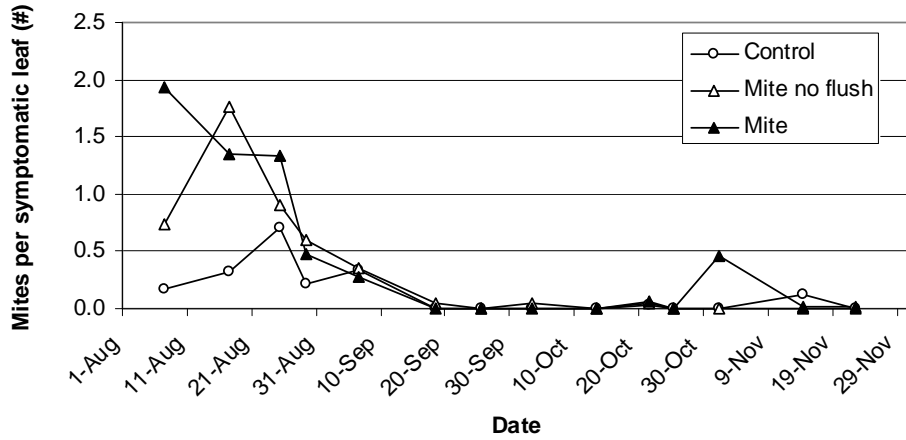


Figure 2.2.b.

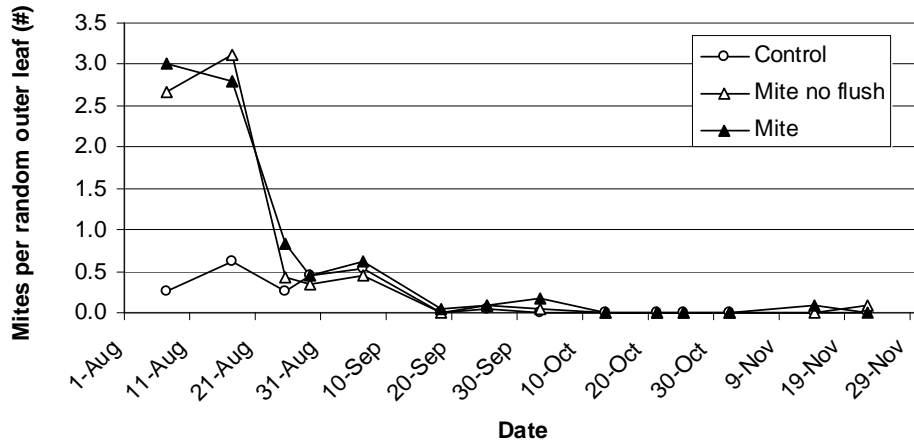
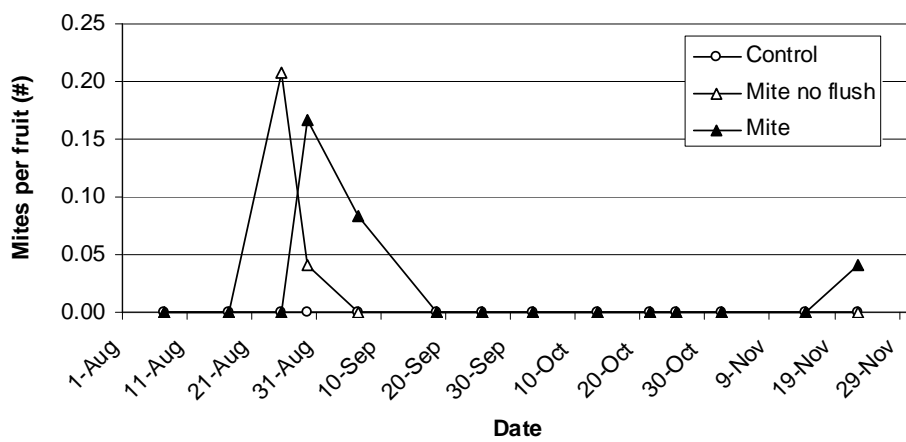
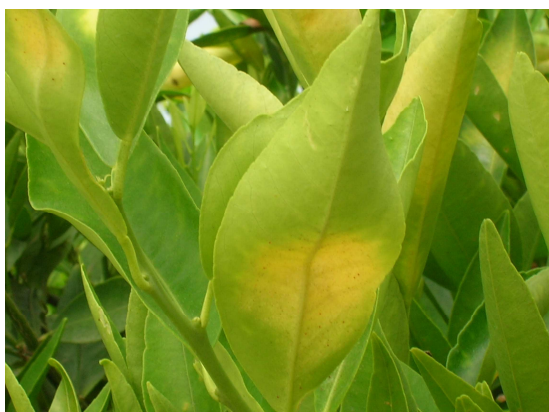


Figure 2.2.c.





### 3. Economic Threshold for *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) in *Citrus clementina*.



Una versión de este capítulo se ha preparado para su publicación. Economic Threshold for *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) in *Citrus clementina*.



### 3 Economic Threshold for *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) in *Citrus clementina*

#### Abstract

*Tetranychus urticae* is a citrus key pest in Spain, especially in mandarins. The effects of this mite on fruit production were assessed in 24 clementine trees for three years. Trees were visited weekly and spider mite, phytoseiid mite populations and leaf flush patterns were estimated. At the end of the season trees were harvested, fruit was weighed and mite damage (scarring on the fruit) for each tree was characterized.

A negative relationship between spider mite infestation and yield (kg tree<sup>-1</sup>) was found. However, when fruit damage was related to the different spider mite sampling estimators, stronger relationships could be fitted. The multivariate regressions for research purposes highlighted the key role of phytoseiid mites and leaf flush patterns, which were negatively related to fruit damage. The shortest sampling period that satisfactorily predicted fruit damage at harvest extended from August to mid October.

For IPM purposes, an economic injury level of 31.14 mites m<sup>-2</sup> symptomatic leaf was estimated. Taking into account the spider mite dynamics, the economic threshold ranged from 10 to 15 mites m<sup>-2</sup>. Should this threshold be exceeded, growers would have a one-week window to apply whatever technologies they may choose against *T. urticae*.

**Key words:** IPM, spider mites, fruit damage, cosmetic threshold, economic injury level, Phytoseiidae, citrus.

#### 3.1 Introduction

In 2009, the European Union endorsed a directive on the sustainable use of pesticides, establishing implementation of the principles of Integrated Pest Management (IPM) as compulsory for the Union (OJEU, 2009). These principles include the establishment of threshold values as economic injury level (EIL) and economic threshold (ET) (Stern et al., 1959), as basis for decision making to address the question of when action against pests is justified. EIL is the lowest pest population density that will cause enough economic damage to justify the cost of using technologies against the pest. ET, which is a direct function of the EIL, is the density at which control measures should be taken

to prevent an increasing pest population from reaching the EIL (Pedigo et al., 1986). These thresholds reflect economic (cost/benefit) considerations. Furthermore, in some instances, decisions may also reflect aesthetic risk (Peterson and Higley, 2002). This is the case for most fresh market commodities, as fresh fruit, where quality is associated with appearance. In this situation, the level of pest control should consider cosmetic standards (Pedigo et al., 1986). Although the EIL represents the critical level of damage, the operable decision criterion is the ET. Ideally, several ETs would exist because ET depends on the one hand on the control tactic chosen and on the other, on the actual pest population dynamics. Each control tactic (e.g. chemical control, augmentative biological control) is characterized by a series of time delays: a) decision delay, b) implementation delay and c) suppression delay (Pedigo et al., 1986). To accurately establish ETs relative to EILs, some calculation (estimation) must be made to determine an overall time delay based on the sum of individual delays. However, this delay cannot extend beyond the period required for the target pest population to increase from ET to EIL. As a consequence, ETs have to be established to ensure that an increasing pest population does not reach EIL during the time delay of the control tactic chosen.

Spain, with an annual production around 5.5 million tons of citrus in 2010, mainly oranges, mandarins and lemons, is the fourth world producer and the first for fresh market of this commodity (FAOSTAT, 2012). Therefore, citrus pests which directly damage the fruit are subjected to cosmetic thresholds (Jacas and Urbaneja, 2010), which are commonly very low (Hare, 1994). *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) is one of the key pests of citrus in Spain, especially in clementine mandarins (*Citrus clementina* Tanaka (Rutaceae)) (Aguilar-Fenollosa et al., 2011a). This mite causes damage to plant cells resulting in chlorotic spots in leaves. When high infestations coincide with water stress, sudden defoliations can occur. However, the most important damage caused by this mite is a characteristic fruit scarring which downgrades mandarins. This cosmetic damage greatly affects market price. Ansaloni et al. (2008) rated fruit scarring according to a 0-5 scale (Figure 3.1). Fruit rated higher than 1, which is equivalent to a small scar close to stylar or peduncular areas, is not accepted for fresh consumption by dealers. As a consequence, this value constitutes the threshold for this particular pest in clementines. Although several empirical indices expressing thresholds for *T. urticae* have been used in Spain, none of them has been developed based on this cosmetic threshold. Some of these indices are based on randomly sampling leaves and establishing their occupation by *T. urticae* (MAGRAMA, 2004; Martínez-Ferrer et al., 2006b; Generalitat Valenciana, 2008), others directly sample leaves exhibiting chlorotic spots (Martínez-Ferrer et al., 2004, 2006a,b;

Urbaneja et al., 2012), and finally some are based on counting mite numbers on fruit (MAGRAMA, 2004; Generalitat Valenciana, 2008; Martínez-Ferrer et al., 2006a; Ripollés et al., 1995). There is no agreement on when to sample: Ripollés et al. (1995) recommended sampling from August to October, the critical period when *T. urticae* typically invades citrus fruits (Ansaloni et al., 2008). However, other authors extended this period from July to September (Urbaneja et al., 2012) or from May to October (Generalitat Valenciana, 2008; MAGRAMA, 2004). This lack of agreement prompted us to explore the feasibility of establishing a scientifically based threshold for *T. urticae* in clementine mandarins.

## **3.2 Experimental methods**

### **3.2.1 Experimental orchard**

Experiments were carried out in a 1 ha commercial orchard located in Les Alqueries (39° 54' N; 00° 06' W). Trees were Clemenules mandarins grafted on citrange Carrizo, (*Poncirus trifoliata* (L.) Rafinesque × *Citrus sinensis* (L.) Osbeck), and were 2-yr old when planted in 2000 with 6 × 4 m spacing. Trees were drip-irrigated on bare soil. When necessary, weeds were killed by use of herbicides (Table 3.1). Twenty four adjacent trees in two consecutive rows (twelve trees per row) were selected in spring 2005 and individually enclosed in an aluminium structure (4 × 4 × 4 m) covered with a nylon rigid mesh (10 × 14 threads cm<sup>-2</sup>). Production was scored during two consecutive seasons (2005 and 2006). Six trees were randomly selected and further considered as the control group. Total yield (kg tree<sup>-1</sup>) per tree was compared with the remaining 18 trees by ANOVA to make sure that there were no differences between the two groups.

### **3.2.2 *Tetranychus urticae* stock colony**

The colony of *T. urticae* used in our assays was established from mites collected in a clementine orchard in August 2001 in Onda, Castelló, Spain (39° 53'N, 00° 16'W, 200 m altitude). Mites were maintained on lemons kept in a climatic chamber (27°C; 16:8 L:D photoperiod) at Universitat Jaume I, Castelló de la Plana, Spain (39°59'N, 0°03'W; 30 m altitude). Each colony consisted of 8-10 lemons which were replaced weekly in groups of four.

### 3.2.3 Mite management

In spring 2007, 2008 and 2009, 50 *T. urticae* adult females obtained from the laboratory stock colony maintained at UJI were introduced on every single tree except for the six control trees. Mites were transferred with a fine brush from infested lemons to different leaves around the canopy. These initial populations were allowed to develop with no further management until harvest (around the first week of December), when trees were pruned and treated with different acaricides (Table 3.1) to reduce mite infestations as close as possible to zero. Control trees were permanently maintained to a pest level as close as possible to zero with pesticides (Table 3.1). During the assay, sometimes, other pests appeared. If possible, they were mechanically removed [e.g. the Egyptian grasshopper *Anacridium aegypticum* (L.) (Orthoptera: Acrididae)]. Otherwise, mite selective pesticides were applied (Table 3.1). These pests were the citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae), citrus aphids, *Aphis gossypii* (Glover) and *A. spiraecola* Pagenstecher (Hemiptera: Aphididae) and the woolly whitefly, *Aleurotrixus floccosus* Maskell (Hemiptera: Aleyrodidae). Control of these pests was especially important as they can seriously affect the availability of new leaf flushes during the critical period for managing *T. urticae* in clementines toward the end of the summer and leaf flushing abundance can modulate mite damage in fruit (Ansaloni et al., 2008).

### 3.2.4 Sampling

For three consecutive years, from spring 2007 (after first artificial infestation) to November 2009 (harvest of the third year studied), trees were inspected weekly. The only exception was the period extending from harvest (late fall) to the spring artificial infestation the following year (March), when trees were sampled fortnightly. Sampling was based on the method proposed by Martínez-Ferrer et al. (2006a) and took into account the importance of the existence of leaf flushes on mite damage (Ansaloni et al., 2008). It consisted of counting on each tree: a) the numbers of *T. urticae* adult females and phytoseiid mites on twelve leaves randomly selected around the tree canopy (MRL and PRL, respectively); b) the number of symptomatic leaves (sl, those exhibiting chlorotic spots) within a ring (56 cm in diameter) randomly thrown four times on the tree canopy; c) the numbers of *T. urticae* females and phytoseiids on up to six symptomatic leaves per ring (msl and psl, respectively); d) the number of tender leaf flushes within the ring (lf); and, when available, e) the numbers of *T. urticae* females and phytoseiids on ten randomly selected fruits (MF and PF, respectively). All these parameters were further used when relating mite population and damage (see below).



In the case of sl and lf, results were expressed per square meter by dividing by the area of the ring used (0.2463 m<sup>2</sup>) and were called SL and LF, respectively. Similarly, in the case of *T. urticae* and phytoseiid mites per symptomatic leaf, data were corrected according to the number of symptomatic leaves found in a ring and the area of the ring and were called MSL and PSL, respectively.

At the end of the season, for the three years considered (from 2007 to 2009), the production of each individual tree was harvested and weighed (same as in 2005 and 2006). Additionally, all fruits were individually inspected for mite damage. Mite damage was rated according to a 0-5 class scale (Figure 3.1) (Ansaloni et al., 2008), and a damage index (DI) was obtained for every tree by adding the results of multiplying the percentage of each fruit class within a tree by the respective class number (0–5). Finally, 100 fruits randomly taken from each tree were individually weighed and their equatorial diameter measured using a digital caliper.

### **3.2.5 Mite species composition**

From 2007 to 2009, once a month, 100 leaves (ca. 100 g) were randomly taken from the control group (16 – 17 leaves per tree) as well as from the *T. urticae*-infested group (5 – 6 leaves per tree) of trees. These samples were transported to the laboratory in a plastic bag in a cooler for microarthropod extraction using Berlese funnels. Extracted arthropods were preserved in 70 % ethanol. Mites were later separated using a binocular microscope. Subsequently, they were digested in lactic acid (65 %) and mounted for phase contrast microscope observation in Hoyer's medium (Gutiérrez, 1985). Tetranychid mites were determined to the species level based on the morphology of the male edeagus (Ferragut and Santonja, 1989). Phytoseiid mites were also determined to the species level based on the number, length and position of setae on dorsal and ventral plates, their morphology and that of the spermatheca for females (Ferragut et al., 2010). Tetranychid and phytoseiid immature specimens were proportionally distributed according to adult numbers at each sampling date. All other mite specimens were determined to family level only.

### **3.2.6 Data processing and analysis**

Data collected from 2007 to 2009 were used to determine the economic threshold (ET). Possible effects of mites on production and fruit quality were studied by analysis of variance (ANOVA). The following variables were considered: a) total yield per tree, b) mean number of fruit per tree, c) mean fruit weight per tree, d) mean fruit diameter per

tree and e) DI per tree. When significant differences were found between control and *T. urticae*-infested trees, simple regression models were used to relate significant variables to mite number estimators during the critical period August-October as recommended in the Spanish citrus IPM guidelines (Ripollés et al., 1995). The best variable was chosen based on  $R^2$ -values and further compared to the different estimators of *T. urticae* (SL, MRL, MSL and MF) and phytoseiid population densities (PSL, PRL and PF) and to leaf flushing (LF) using multiple regression models. A backward and forward stepwise regression procedure identified the model which included the set of variables having a significant effect on the response and producing the lowest value of Akaike's information criterion (AIC). To establish the shortest sampling period which could be representative of the whole season, mean values for different time periods were considered (Table 3.2). These periods were chosen based on the phenology of the tree (harvest, flushing, fruit set) and *T. urticae* fruit-infestation behavior. The best model was chosen based on AIC,  $R^2$ -values and residuals. Because our ultimate goal was to develop an ET usable by growers, for the shortest period identified, we further used simple regression models to relate variables significantly affected by the presence of *T. urticae* to mite number estimators. Finally,  $\alpha$  and  $\beta$  error rates (false positives and false negatives, respectively) were calculated and used to select the best model. Simple regressions were performed using IBM® SPSS® statistics, version 19.0.0 (Armonk, NY, USA). The software 'R' version 2.14.1 (R Development Core Team, 2011) and its package 'MASS' (Venables, 2002) were used to fit the multiple regression models and to perform the stepwise regression procedure.

### 3.3 Results and Discussion

For the first two years of the study (2005 and 2006), no significant differences were observed for yield between the control group and the remaining 18 trees randomly established in 2005 (Table 3.3).

Figures 3.2.a-3.2.g show mite dynamics from 2007 to 2009 based on the different types of count considered (SL, MSL, MRL, MF, PSL, PRL and PF) and Figure 3.2.e flushing patterns during the same period. The mean MSL values in *T. urticae*-infested trees varied from 3.81 to 98.53 in 2007, from 1.06 to 32.19 in 2008 and from 2.64 to 34.38 in 2009. This naturally occurring variation provided a wide range of values that was good for the establishment of thresholds.

When mean production parameters (same as in 2005 and 2006 plus fruit diameter and number of fruits per tree) and damage index (DI) from 2007 to 2009 were studied

(Table 3.4), we found significant differences among years for all of them except DI, and between control and *T. urticae*-infested trees (treatment) for yield, fruit diameter and DI. Yield and fruit diameter were negatively affected by *T. urticae* presence. The interaction between year and treatment group (control and *T. urticae*-infested trees) was not significant in any case and there were annual patterns of variation in the production parameters studied, which typically appear in mandarins (Agustí et al., 1992).

As in previous studies (Ansaloni et al., 2008), DI values were positively affected by *T. urticae* presence (control versus *T. urticae*-infested trees). However, there were no differences among years and the interaction between these two factors was not significant (Table 3.4). Simple regressions relating yield loss (expressed as percentage relative to yield in control trees), fruit diameter, and DI to mite number estimators (SL, MSL, MRL, MF, PSL, PRL and PF) and to LF during the critical period August-October (Ripollés et al., 1995) were estimated (Table 3.5). These regressions were non-significant ( $P < 0.05$ ) for fruit diameter. In the case of yield loss, only regressions using SL and MRL were significant. However, these regressions explained less than 10.4 % variation in yield ( $R^2$ ). In the case of DI, all regressions were significant and explained up to 61.8 and 53.2 % variation for MF and MSL, respectively. Ansaloni et al., (2008) found a lack of effect of *T. urticae* populations on the same production parameters in their study on clementine mandarins. Their results were attributed to the short period of interaction between mites and fruit (from mid-summer to harvest). Our results show that a longer presence of mite populations in the trees had a stronger impact on production. To decide whether yield and DI had to be taken into account when establishing the new threshold, we explored the relationship between both yield loss and DI with SL, which according to Martínez-Ferrer et al. (2006a) could be taken as representative of mite populations, and showed significant relationships with both yield loss and DI (Table 3.5). We based our calculations on a DI set at 1, which is a value that could be accepted by both growers and fruit dealers. This value resulted in a SL value of 34.47 symptomatic leaves  $m^{-2}$  ( $SL = 34.483 * \sqrt{DI} - 0.013$ ;  $P = 0.0001$ ;  $R^2 = 44.2$  %). When this value was substituted in the equation relating yield loss and SL ( $yield\ loss = 6.622 * \ln(SL) + 2.021$ ;  $P = 0.0057$ ;  $R^2 = 10.4$  %), a 5.6 % yield loss was obtained. Although both regressions were significant, SL barely explained 10 % variation in yield compared to more than 40 % in the case of DI. Furthermore, the percentage of yield loss corresponding to  $DI = 1$  was considerably lower than the variation observed within control trees ( $\pm 11.1$  % yield). As a result, we decided not to take into account yield to further establish the threshold and to focus exclusively on DI.

Multiple regressions between DI and the different spider mite estimators (SL, MSL, MRL, MF), phytoseiid mite estimators (PSL, PRL, PF) and leaf flush patterns (LF) for the time-frames considered (Table 3.2) were fitted (Table 3.6). The best combination of low AIC-value and high  $R^2$  corresponded to the time frame extending from August 1 to October 15 (Table 3.6). This sampling period was closely followed by August 1 to October 31, August 10 to harvest, and August 1 to September 30. Therefore, we decided to focus our study on these four periods. These selected time-frames coincide with the critical period already defined by Ansaloni et al. (2008) and roughly with that proposed by Ripollés et al. (1995), which extends from August to October. These periods, though, are much shorter than those recommended by other guidelines in use in Spain (MAGRAMA, 2004; Martínez-Ferrer et al., 2006b; Generalitat Valenciana, 2008), which suggest monitoring *T. urticae* from May to October. Our results show such a long sampling period would actually reduce the accuracy of predictions (Table 3.6). Furthermore, because mite populations in spring explain very little mite damage at harvest ( $R^2$ -values of 16.7 % for the period fruit setting to August 1), no sampling and, more importantly, no action against *T. urticae* would be recommended at this time of the year. Especially if we take into account results shown in table 3.7, that reveal the tremendous impact of chemical control on the communities of *T. urticae* natural enemies, and the fact that natural enemies in symptomatic leaves (PSL) were indeed negatively correlated to DI (Table 3.6). Phytoseiids in random leaves (PRL), though, were positively correlated with DI. According to Abad-Moyano et al. (2009a), most efficient *T. urticae* predators (*P. persimilis* and *N. californicus*) are systematically found in infested citrus leaves, whereas the generalist *E. stipulatus* is not. Our results support the key role of these specialist predators in mandarins that should be conserved as much as possible in citrus (Aguilar-Fenollosa et al., 2011b). Interestingly, LF was also negatively related to DI (Table 3.6) and this result supports the conclusions of Ansaloni et al. (2008) that the occurrence of normal summer and fall vegetative growth flushes limits the amount of mite damage on fruit.

The four selected sampling periods could be used for scientific purposes. However, such an intensive sampling is very labor-demanding and therefore not suitable for IPM purposes. To explore whether we could simplify sampling for growers, the signification and contribution of the different parameters considered in our models for the selected sampling periods were calculated (Table 3.8). The longest period considered, August 10 to harvest, yielded the worst results. Therefore, this period was discarded. For the remaining three sampling periods, MF was the best estimator of DI ( $R^2 = 62.3$  to  $62.5$  %), closely followed by MSL ( $R^2 = 52.2$  to  $53.8$  %) and MRL ( $R^2 = 43.1$  to  $45.2$  %). Phytoseiid mite counts (PSL and PRL) explained between 24.6 and 37.1 % of DI

variation. Remarkably, LF never explained more than 10.8 % of this variation. According to Martínez-Ferrer et al. (2006a), SL is the simplest and fastest estimator of mite numbers. However, the decision scheme developed by the same authors (Martínez-Ferrer et al., 2006b) finally based action on MSL because quite often SL are empty, especially as the season progresses. Because in our case the best results were obtained for MF and MSL, we decided to focus on these estimators. MF was discarded as estimator of damage because *T. urticae* dynamics on fruit are explosive (Figure 3.2.d). As a consequence, EIL and ET would be too close and almost no time for intervention would be left. Consequently, we finally chose MSL to establish the action threshold for growers. The last criterion used to select the best time frame was the minimizing of  $\alpha$  and  $\beta$  error rates (false negatives and false positives, respectively). From the IPM point of view,  $\alpha$  error rates are that of greatest concern because the model would indicate no action although it would be actually needed.  $\beta$  error rates were greater than  $\alpha$  error rates in all cases and did not change with the time-frame considered. The highest  $\alpha$  error rate was obtained for the August 1 to September 30 sampling period and there were no differences for the other two sampling periods (Figure 3.3). Based on these results, the August 1 to October 15 period was eventually selected for IPM purposes (Table 3.8). Using this model, no action would be inadequately chosen in 4.2 % of the cases only. By contrast, unnecessary action would be taken in 13.9 % of the cases. Therefore, the right decision would be taken in more than 88 % of the cases. This success rate is considered good for IPM purposes. Using this model, and based on the aforementioned threshold  $DI = 1$ , the EIL was established in 31.14 mites  $m^{-2}$  in the period August 1 to October 15. Comparison of the dynamics of MSL (Figure 3.2.b) and that of MF (Figure 3.2.d) during the three years included in our study shows that increases in the former always started at least two weeks before increases were detected in MF.

To establish ET as a function of EIL, we first looked at the theoretical dynamics of *T. urticae* based on its intrinsic rate of increase ( $r_m$ ). According to Aucejo-Romero et al. (2004)  $r_m$  for *T. urticae* in clementines ranges from 0.110 to 0.165 females per female and day. That means that one week before reaching EIL (this would coincide with the proposed sampling plan), mite densities would range from 15 to 10 mites per  $m^2$  symptomatic leaf. These densities should be taken as ETs. These estimates can be considered as conservative because they are based on  $r_m$ , which reflects growing under optimal conditions. Therefore, when the threshold of 10-15 MSL is exceeded, growers would have a one-week window to apply whatever technologies they choose against *T. urticae*. For a short-delay tactic such as chemical control, growers could go for the 15 MSL ET. However, for tactics requiring longer time to act, such as

augmentative releases of phytoseiid mites, it would be wise to go for the lower ET. According to actual MSL dynamics observed during this study (Figure 3.2.b), the proposed ETs would have resulted in one intervention during the first half of August. Whether this action would have been enough to further maintain mite populations below EIL during the rest of the sampling period deserves additional research.

### 3.4 Conclusions

Based on the results obtained by Martínez Ferrer et al. (2006a), when defining a sampling method for *T. urticae* in clementines, growers willing to use our ETs should start sampling for *T. urticae* on August 1. From that date and until mid-October, perform a sampling every week. The sampling would consist of selecting up to 20 trees per hectare (or per smaller homogeneous area), throw a 56 cm in diameter ring twice per tree, count the number of symptomatic leaves within the ring ( $Y$ ) and the number of adult females ( $x$ ) on up to six of these symptomatic leaves ( $n$ ), if present. Subsequently, the mean number of mites per symptomatic leaf ( $X = \sum x / n$ ) should be expressed as mites per  $m^2$  symptomatic leaf by applying the following conversion factor:

$$\frac{X \text{ mites}}{\text{symptomatic leaf}} \times \frac{Y \text{ symptomatic leaves}}{1 \text{ ring}} \times \frac{1 \text{ ring}}{0.2463 \text{ m}^2} = \text{MSL}$$

The mean value of MSL for the 20 trees should be compared to the threshold. As soon as MSL reaches 10-15, action should be taken. Although phytoseiid mites are not included in this action threshold, their important contribution to DI, as pointed out in the multivariate regressions (Table 3.6) makes necessary to take into account any side-effect of the action selected (especially if an acaricidal treatment is applied) on *P. persimilis* and *N. californicus* (Urbaneja et al., 2008, 2009). If possible, selectivity for other relevant natural enemies occurring in citrus should be also considered (Jacas and García-Marí, 2001; Urbaneja et al., 2009).

### Acknowledgements

The authors thank A. Benajes and M.J. Garcés (COCALNI, Les Alqueries) for providing the study orchard, O. Dembilio (UJI), P. López (UJ), C. Pérez-Sayas, P. Pérez (UJI), T. Pina (UJI) and L. Zaragoza (UJI) for helping with the samplings. This work was partially

#### Economic threshold

funded by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (projects AGL2004-07464-C03-01, AGL2005-07155-C03, AGL2008-05287-C04-03/AGR and AGL2011-30538-C03-01). S.P.R. and E.A.F. were recipients of a predoctoral grant from MICINN and UJI, respectively.

**Table 3.1.** Pesticides used in the experimental orchard during the assay, active ingredient, used doses, target pest, date of use and comments on their use when they were not homogeneously applied to the 24 experimental trees.

Date	Active ingredient	Dose	Target	Comments	
1	Mineral oil + Chlorpyrifos	(830 g l <sup>-1</sup> EC)+ (480 g l <sup>-1</sup> EC)	45 l ha <sup>-1</sup> + 6 l ha <sup>-1</sup>	Aphids, scales and Mites	
2	Terbutryne + Simazine MCPA	(400 g l <sup>-1</sup> SC)+ (100 g l <sup>-1</sup> SC)+ (600 g l <sup>-1</sup> SL)+	2 l ha <sup>-1</sup> + 0.5 l ha <sup>-1</sup> + 1.5 l ha <sup>-1</sup>	Weeds	
3	Mineral oil + Chlorpyrifos	(830 g l <sup>-1</sup> EC) + (480 g l <sup>-1</sup> EC)	45 l ha <sup>-1</sup> + 6 l ha <sup>-1</sup>	Aphids, scales white fly, mites and grasshoppers	
4	Tebufenpyrad	(200 g l <sup>-1</sup> WP)	1.2 Kg ha <sup>-1</sup>	Mites	Only in control trees
5	Imidacloprid	(350 g l <sup>-1</sup> SC)	4 ml tree <sup>-1</sup>	Aphids, citrus life miner and white fly	
6	Mineral oil + Chlorpyrifos	(830 g l <sup>-1</sup> EC)+ (480 g l <sup>-1</sup> EC)	45 l ha <sup>-1</sup> + 6 l ha <sup>-1</sup>	Aphids, scales white fly and mites	Only in control trees
7	Etoazole	(110 g l <sup>-1</sup> SC)	0.6 l ha <sup>-1</sup>	Aphids and mites	Only in control trees

	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
2006												1,2
2007				3						2		
2008	2,3		4	5		5				2,6		
2009					2,5		7			2		



**Table 3.2.** Time periods considered for establishing the best sampling period to predict *T. urticae* damage at harvest.

	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
Total	From harvest (H) to H the following year											
FS-H	Fruit-set (FS) to H											
FS-A1	FS to Aug 1											
FS-A31	FS to Aug 31											
FS-S30	FS to Sep 30											
FS-O31	FS to Oct 31											
A10-H	Aug 10 to H											
O10-H	Oct 10 to H											
D1-FS	Dec 1 to FS											
D1-A1	Dec 1 to Aug 1											
J1-A1	1											
A1-A15	2											
A1-A31	3											
A1-S15	Aug 1 to Sep 15											
A1-S30	Aug 1 to Sep 30											
A1-O15	Aug 1 to Oct 15											
A1-O31	Aug 1 to Oct 31											
SVG1-H	Beginning of summer vegetative growth (SVG1) to H											
FS-SVG2	FS to end of summer vegetative growth (SVG2)											
SVG2-H	SVG2 to H											

1, Jul 1 to Aug 1; 2, Aug 1 to Aug 15; 3, Aug 1 to Aug 30; **SVG1**: Aug 22 2007; Aug 18 2008; Aug 17 2009; **SVG2**: Sep 18 2007; Sep 8 2008; Oct 2 2009.

**Table 3.3.** Mean ( $\pm$  SE) values for total yield per tree and fruit weight (2005 and 2006). Two-way ANOVA for the considered parameters comparing the group of future control trees and the remaining 18 trees (*T. urticae*-infested).

	2005		2006	
	Control	<i>T. urticae</i> -infested	Control	<i>T. urticae</i> -infested
Yield (Kg per tree)	15.46 $\pm$ 3.05	19.25 $\pm$ 2.26	19.02 $\pm$ 4.33	28.09 $\pm$ 1.89
Weight (g per fruit)	99.69 $\pm$ 3.68	90.37 $\pm$ 4.16	96.98 $\pm$ 8.17	100.70 $\pm$ 4.69
ANOVA results ( <i>F</i> ; <i>P</i> ) <sup>*</sup>				
Factor	Treatment	Year	Interaction	
Yield	3.60; 0.064	3.30; 0.076	1.50; 0.228	
Weight	0.46; 0.502	0.20; 0.658	1.71; 0.198	

<sup>\*</sup>*df* were 1, 47 in all cases

**Table 3.4.** Mean ( $\pm$  SE) values for 2007 to 2009 for each parameter considered (yield, weight, fruit diameter, number of fruits and damage index). Two-way ANOVA for parameters considered comparing the group of control trees and the remaining 18 trees (*T. urticae*-infested).

	2007		2008		2009	
	Control	<i>T. urticae</i> -infested	Control	<i>T. urticae</i> -infested	Control	<i>T. urticae</i> -infested
Yield (Kg per tree)	18.48 $\pm$ 3.34	13.61 $\pm$ 1.65	73.03 $\pm$ 3.45	65.12 $\pm$ 4.48	97.32 $\pm$ 8.69	80.92 $\pm$ 5.98
Weight (g per fruit)	128.53 $\pm$ 6.18	111.72 $\pm$ 5.35	104.71 $\pm$ 5.26	99.13 $\pm$ 2.68	124.04 $\pm$ 7.24	129.11 $\pm$ 4.53
Fruit diameter (cm)	65.58 $\pm$ 1.23	63.16 $\pm$ 0.68	61.25 $\pm$ 1.08	59.73 $\pm$ 0.60	64.90 $\pm$ 1.40	65.70 $\pm$ 0.77
No of fruits per tree	176.17 $\pm$ 32.37	146.50 $\pm$ 16.37	754.33 $\pm$ 47.51	685.17 $\pm$ 50.95	616.83 $\pm$ 60.55	581.72 $\pm$ 62.25
Damage index	0.56 $\pm$ 0.23	1.04 $\pm$ 0.15	0.42 $\pm$ 0.31	0.89 $\pm$ 0.15	0.27 $\pm$ 0.26	0.89 $\pm$ 0.14
ANOVA results ( <i>df, F, P</i> )						
Factor	Treatment		Year		Interaction	
Yield (Kg per tree)	1, 71; 6.78; 0.011		2, 71; 93.95; <0.001		2, 71; 1.70; 0.191	
Weight (g per fruit)	1, 71; 2.85; 0.096		2, 71; 9.05; 0.001		2, 71; 1.40; 0.254	
Fruit diameter (cm)	1, 71; 4.46; 0.039		2, 71; 13.06; <0.001		2, 71; 1.40; 0.253	
No of fruits per tree	1, 71; 1.15; 0.287		2, 71; 52.55; <0.001		2, 71; 0.25; 0.777	
Damage index	1, 71; 28.64; <0.001		2, 71; 0.93; 0.399		2, 71; 0.14; 0.866	

**Table 3.5.** Simple regression relating yield, fruit diameter, and damage index to mite number estimators during the critical period August-October (A1-O31) as recommended in the Spanish citrus IPM guidelines (Linear and alternative models: exponential, reciprocal x, reciprocal y, double reciprocal, logarithmic x, multiplicative, square root x, square root y, S-curve, logistic, log probit).

	% Yield loss				Fruit diameter				DI			
	F	P	r	R <sup>2</sup>	F	P	r	R <sup>2</sup>	F	P	r	R <sup>2</sup>
SL	8.14	0.0057	0.32	10.42	1.74	0.1912	0.16	1.03	55.34	<0.0001	0.66	43.36
MSL	3.38	0.0704	0.22	4.60	0.07	0.7992	0.03	-1.33	31.70	<0.0001	0.73	53.20
MRL	4.05	0.0479	0.23	5.48	2.18	0.1442	-0.17	1.64	54.20	<0.0001	0.66	42.83
MF	0.57	0.4536	0.09	0.80	0.03	0.8690	-0.02	-1.39	115.76	<0.0001	0.79	61.78
PSL	0.58	0.4473	0.09	0.82	0.54	0.4650	-0.09	-0.65	41.32	<0.0001	0.61	36.22
PRL	63.43	0.0681	0.22	4.67	0.01	0.9152	-0.01	-1.41	26.72	<0.0001	0.52	26.59
PF	0.19	0.6617	-0.05	0.27	0.28	0.6007	-0.06	-1.03	21.12	<0.0001	0.48	22.08
LF	0.08	0.7729	-0.03	0.12	0.50	0.4822	0.08	-0.71	8.50	0.0048	0.33	9.54

*df* 1, 71 in all cases

**Table 3.6.** Multiple regressions relating DI with mite estimators (SL, MSL, MRL, MF, PSL, PRL, and PF) and LF of different period times for the 24 trees studied.

Time period	Coefficients of explicative variables								AIC	P	R <sup>2</sup>	
	Intercept	SL	MSL	MRL	MF	PSL	PRL	PF				LF
Total	0.063±0.014	0.036±0.014			1.806±0.400	-0.090±0.045	5.874±3.115	9.460±4.392	0.004±0.002	86.60	<0.0001	56.38
FS - H	0.154±0.087		0.013±0.003			-0.039±0.023	8.243±2.393	11.403±4.494	0.007±0.002	91.75	<0.0001	52.55
FS - A1	0.532±0.086		0.002±0.001				2.474±0.771			129.44	<0.0001	16.73
FS - A31	0.467±0.083		0.004±0.001				4.670±1.389			120.30	<0.0001	26.65
FS - S30	0.241±0.120		0.467±0.083				4.833±1.982	7.308±3.424	0.013±0.009	110.41	<0.0001	37.73
FS - O31	0.274±0.118	-0.019±0.008	0.004±0.002				8.764±2.212	8.561±4.120	0.022±0.010	101.14	<0.0001	45.95
A10 - H	0.132±0.087	-0.013±0.008	0.015±0.003	1.771±0.531			5.191±2.127	7.890±3.709	0.012±0.005	75.89	<0.0001	62.41
O10 - H	0.285±0.075		0.041±0.015	1.808±0.880		0.133±0.023	2.867±1.588			90.83	<0.0001	52.56
D1 - FS	0.212±0.147			2.729±1.124			7.428±2.242		0.003±0.002	127.00	0.0011	20.57
D1 - A1	0.010±0.171	0.023±0.016		3.944±1.878	-3.170±1.865		3.816±2.242	3.485±2.006	0.006±0.003	124.79	0.0002	25.86
J1 - A1	0.548±0.088		0.001±0.001				1.996±0.705			131.36	0.0017	14.49
A1 - A15	0.651±0.089	-0.012±0.008	0.009±0.002			-0.038±0.015				124.16	<0.0001	23.64
A1 - A31	0.465±0.087		0.010±0.002			-0.038±0.015	3.484±1.686			108.52	<0.0001	38.55
A1 - S15	0.373±0.073		0.009±0.002			-0.037±0.014	7.355±2.497	4.009±2.401		100.69	<0.0001	45.59
A1 - S30	0.324±0.078	0.021±0.009		0.818±0.314	1.402±0.249	-0.031±0.014			-0.009±0.004	78.24	<0.0001	60.67
A1 - O15	0.222±0.079	0.024±0.008		0.524±0.372	1.421±0.263	-0.036±0.017	4.166±1.904		-0.007±0.004	70.46	<0.0001	65.14
A1 - O31	0.254±0.080	0.026±0.008		0.725±0.404	1.554±0.301	-0.027±0.018			-0.008±0.005	74.28	<0.0001	62.77
SGV1 - H	0.064±0.091		0.012±0.003	1.375±0.488	-0.804±0.405		4.684±2.240	8.924±3.384	0.021±0.005	83.29	<0.0001	58.34
FS - SGV2	0.331±0.090			1.884±0.702	1.570±0.402	-0.039±0.021	4.631±2.033			106.72	<0.0001	40.84
SVG2 - H	0.155±0.081			1.878±0.423		0.107±0.022	3.320±1.680		0.043±0.011	82.57	<0.0001	57.70

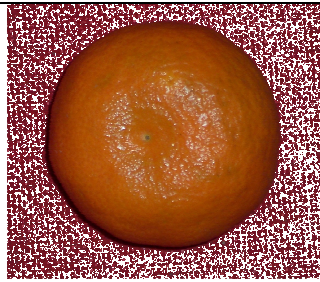
**Table 3.7.** Mite species composition from 2007 to 2009. Number of mites collected by monthly Berlese funnels and its percentage (respect total mites belonging to that family).

Family	Species	2007		2008		2009		Total	
		Control	<i>T. urticae</i> -infested	Control	<i>T. urticae</i> -infested	Control	<i>T. urticae</i> -infested	Control	<i>T. urticae</i> -infested
	<i>Tetranychus urticae</i>	28 (87.5%)	179 (87.3%)	9 (81.8%)	138 (93.9%)	16 (69.6%)	57 (68.7%)	53 (80.3%)	374 (86.0%)
	<i>Panonychus citri</i>	4 (12.5%)	26 (12.7%)	2 (18.2%)	9 (6.1%)	7 (30.4%)	26 (31.3%)	13 (19.7%)	61 (14.0%)
	Tetranychidae	32	205	11	147	23	83	66	435
	<i>Euseius stipulatus</i>	7 (77.8%)	73 (64.6%)	11 (100%)	31 (72.1%)	3 (100%)	9 (50.0%)	12 (85.7%)	113 (64.9%)
	<i>Neoseiulus californicus</i>	0	14 (12.4%)	0	0	0	0	0	13 (7.5%)
	<i>Typhlodromus phialatus</i>	2 (22.2%)	5 (4.4%)	0	0	0	1 (6.2%)	2 (14.3%)	7 (4.0%)
	<i>Phytoseiulus persimilis</i>	0	21 (18.6%)	0	12 (27.9%)	0	8 (43.8%)	0	41 (23.6%)
	Phytoseiidae	9	113	2	43	3	18	14	174
	Other taxa	10	16	0	8	1	0	11	24
	Ratio Tetranychidae/ Phytoseiidae	3.56	1.81	5.50	3.42	7.67	4.61	4.71	2.50

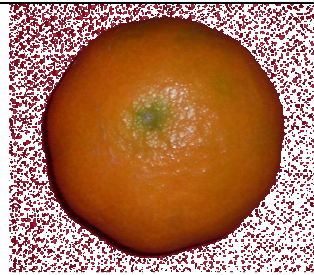
**Table 3.8.** For time periods which AIC < 80 -> Simple regressions (df 1,71; P < 0.01 in all cases) y = DI

x	A10 - H				A1 - S30				A1 - O15				A1 - O31			
	Model	F	r	R <sup>2</sup>	Model	F	r	R <sup>2</sup>	Model	F	r	R <sup>2</sup>	Model	F	r	R <sup>2</sup>
SL	y = (0.475 + 0.022x) <sup>2</sup>	25.96	0.52	27.05	y = (0.484 + 0.029x) <sup>2</sup>	42.37	0.61	37.70	y = (0.458 + 0.029x) <sup>2</sup>	49.44	0.64	41.39	y = (0.443 + 0.030x) <sup>2</sup>	55.34	0.66	43.36
MSL	y = 0.160 + 0.185√x	64.99	0.69	48.14	y = 0.163 + 0.138√x	76.36	0.72	52.17	y = 0.141 + 0.154√x	80.63	0.73	53.53	y = 0.135 + 0.165√x	81.70	0.73	53.86
MRL	y = (0.478 + 1.978x) <sup>2</sup>	37.37	0.59	34.80	y = 0.051 + 1.734√x	52.99	0.66	43.08	y = 0.008 + 1.935√x	57.78	0.67	45.22	y = -0.003 + 2.024√x	54.20	0.66	43.64
MF	y = 0.259 + 1.711√x	38.23	0.59	35.23	y = 0.244 + 1.641√x	116.74	0.79	62.51	y = 0.233 + 1.728√x	115.79	0.79	62.32	y = 0.221 + 1.814√x	115.76	0.79	62.32
PSL	y = 0.318 + 0.371√x	46.83	0.63	40.09	y = 0.395 + 0.271√x	29.72	0.55	29.80	y = 0.336 + 0.326√x	40.53	0.61	36.67	y = 0.335 + 0.335√x	41.32	0.61	37.12
PRL	y = 0.163 + 4.250√x	38.66	0.59	35.58	y = 0.320 + 3.233√x	22.87	0.49	24.62	y = 0.220 + 3.846√x	37.43	0.59	34.84	y = 0.259 + 3.574√x	26.72	0.53	27.63
PF	y = 0.561 + 4.163√x	20.01	0.47	22.23	y = 0.555 + 3.698√x	20.77	0.48	22.88	y = 0.545 + 3.732√x	20.89	0.48	22.99	y = 0.555 + 3.964√x	21.12	0.48	23.17
LF	y = 0.442 + 0.191ln(x)	11.23	0.37	13.83	y = (0.662 + 0.008x) <sup>2</sup>	6.26	0.29	8.21	y = 0.474 + 0.154ln(x)	7.03	0.30	9.13	y = 0.463 + 0.168ln(x)	8.50	0.33	10.82

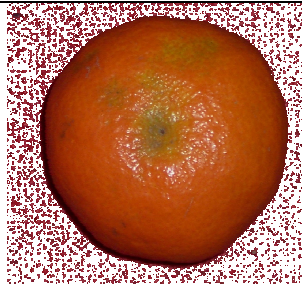
**Figure 3.1.** Fruit damage classes (0-6 scale) used in this study (Ansaloni et al., 2008).



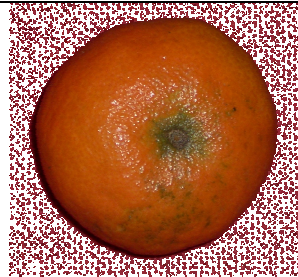
**0:** unblemished



**1:** small scar



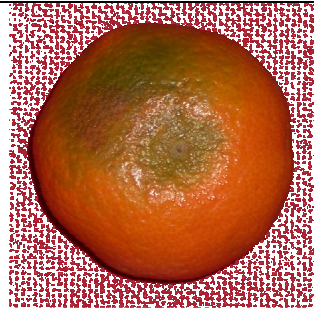
**2:** scar covering less than 12%  
fruit rind



**3:** scar covering between 13 and 25 %  
fruit rind



**4:** scar covering between 26 and 50 %  
fruit rind



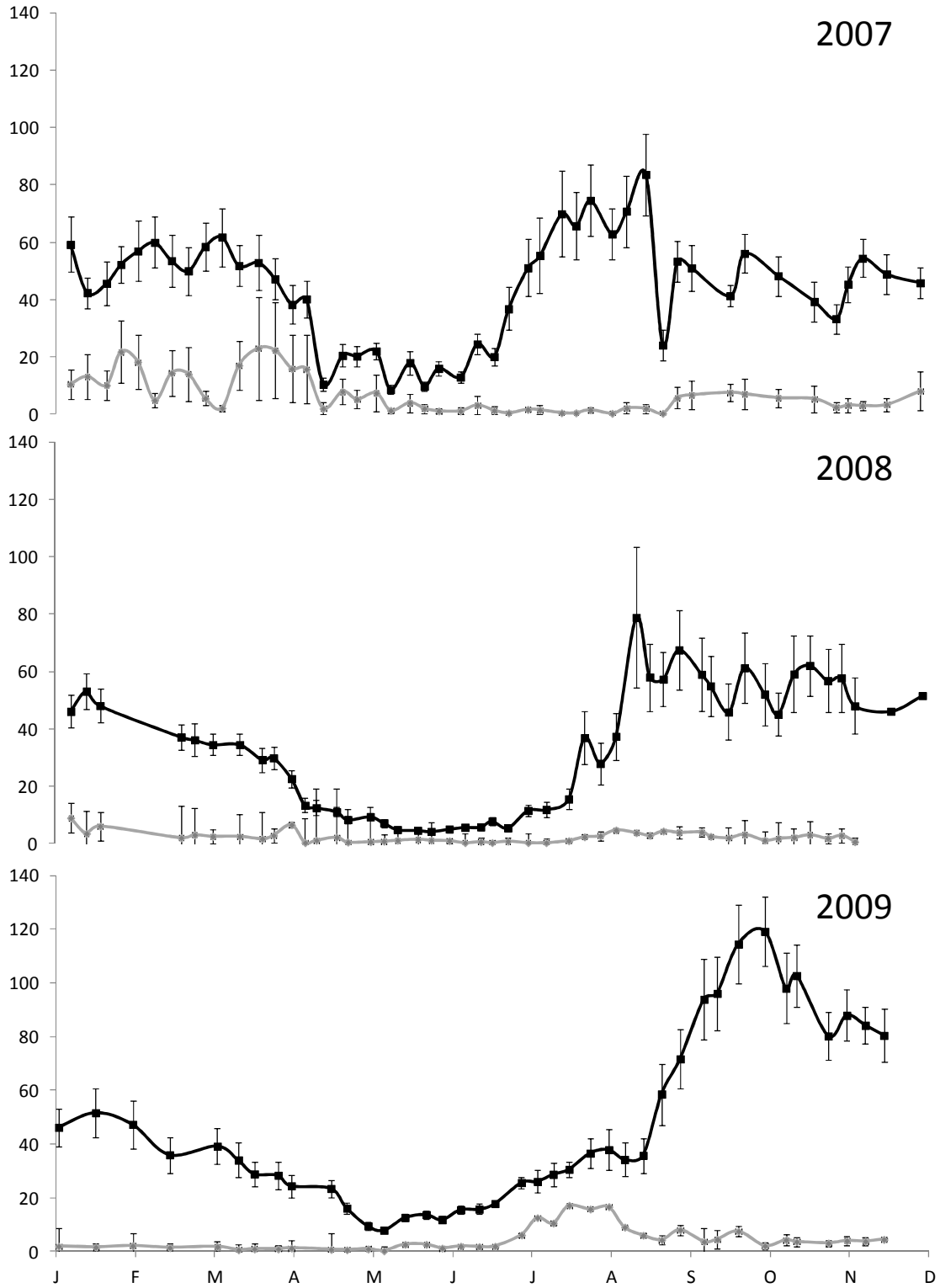
**5:** scar covering more than 50 %  
fruit rind

---

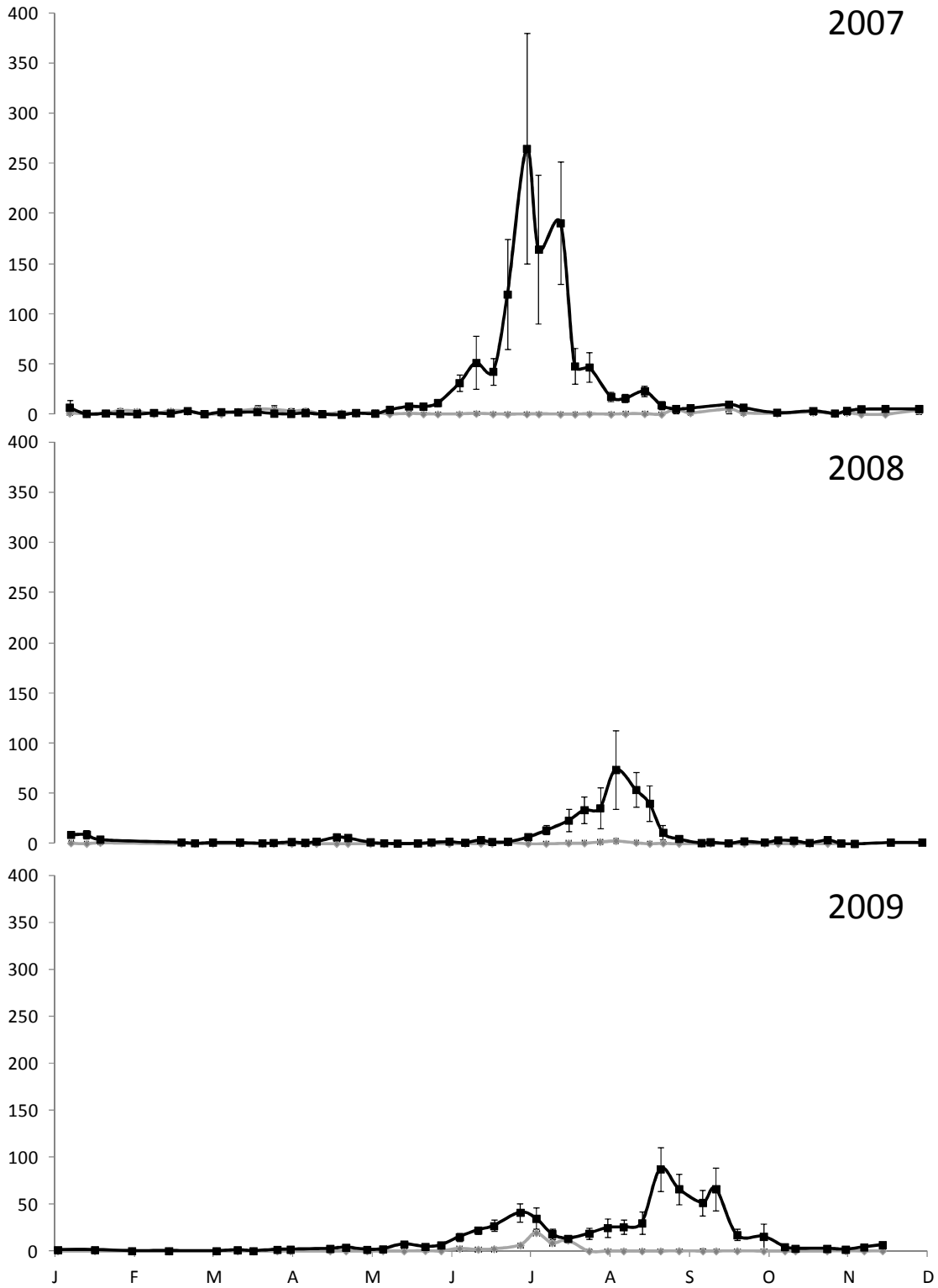


Economic threshold

**Figure 3.2.a.** Symptomatic leaves (SL) (# SL m<sup>-2</sup>) from 2007 to 2009 in control (—◆—) and *T. urticae*-infested (—■—) trees.

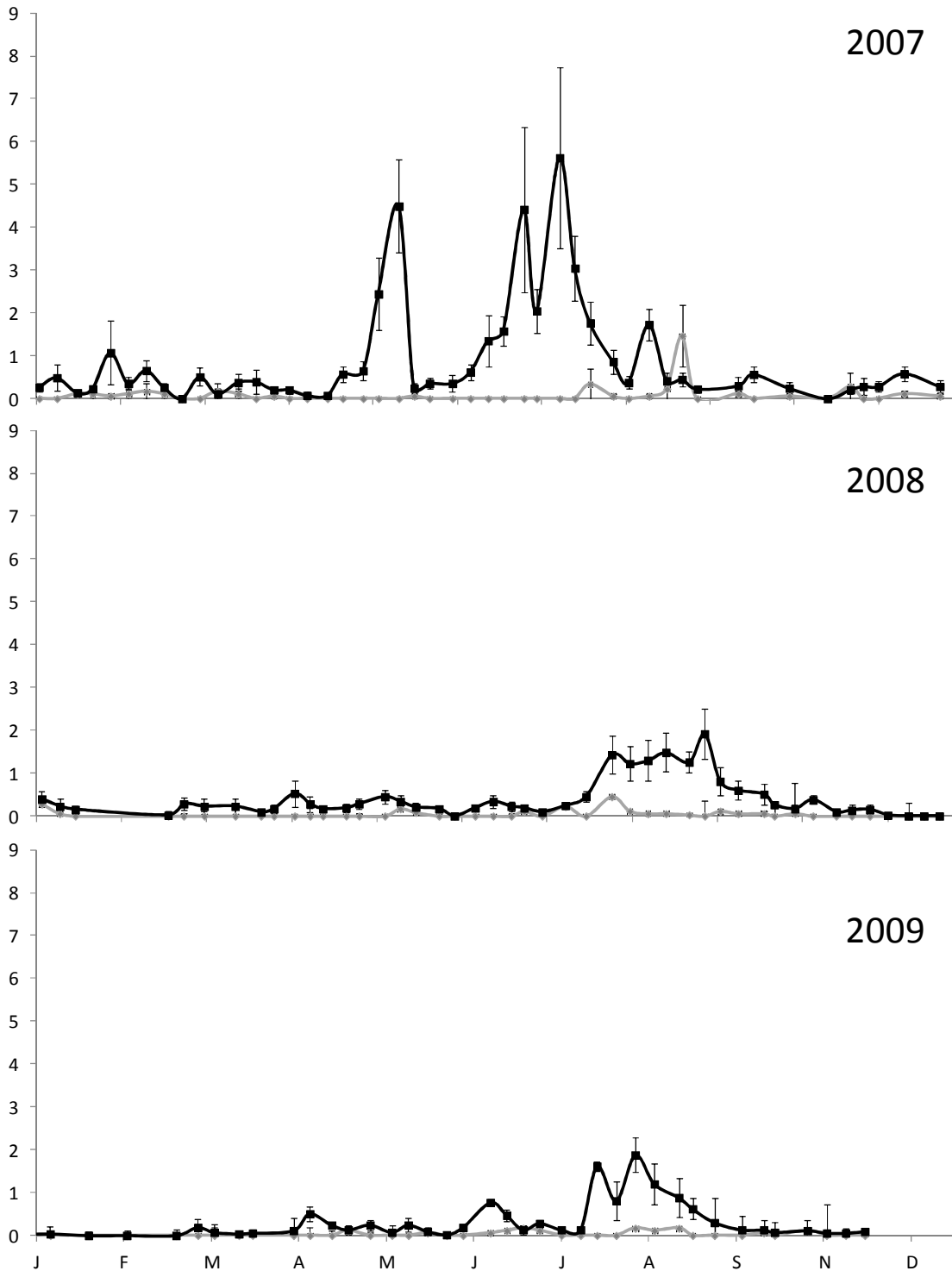


**Figure 3.2.b.** *Tetranychus urticae* per symptomatic leaf (MSL) (# MSL m<sup>-2</sup>) from 2007 to 2009 in control (—◆—) and *T. urticae*-infested (—■—) trees.

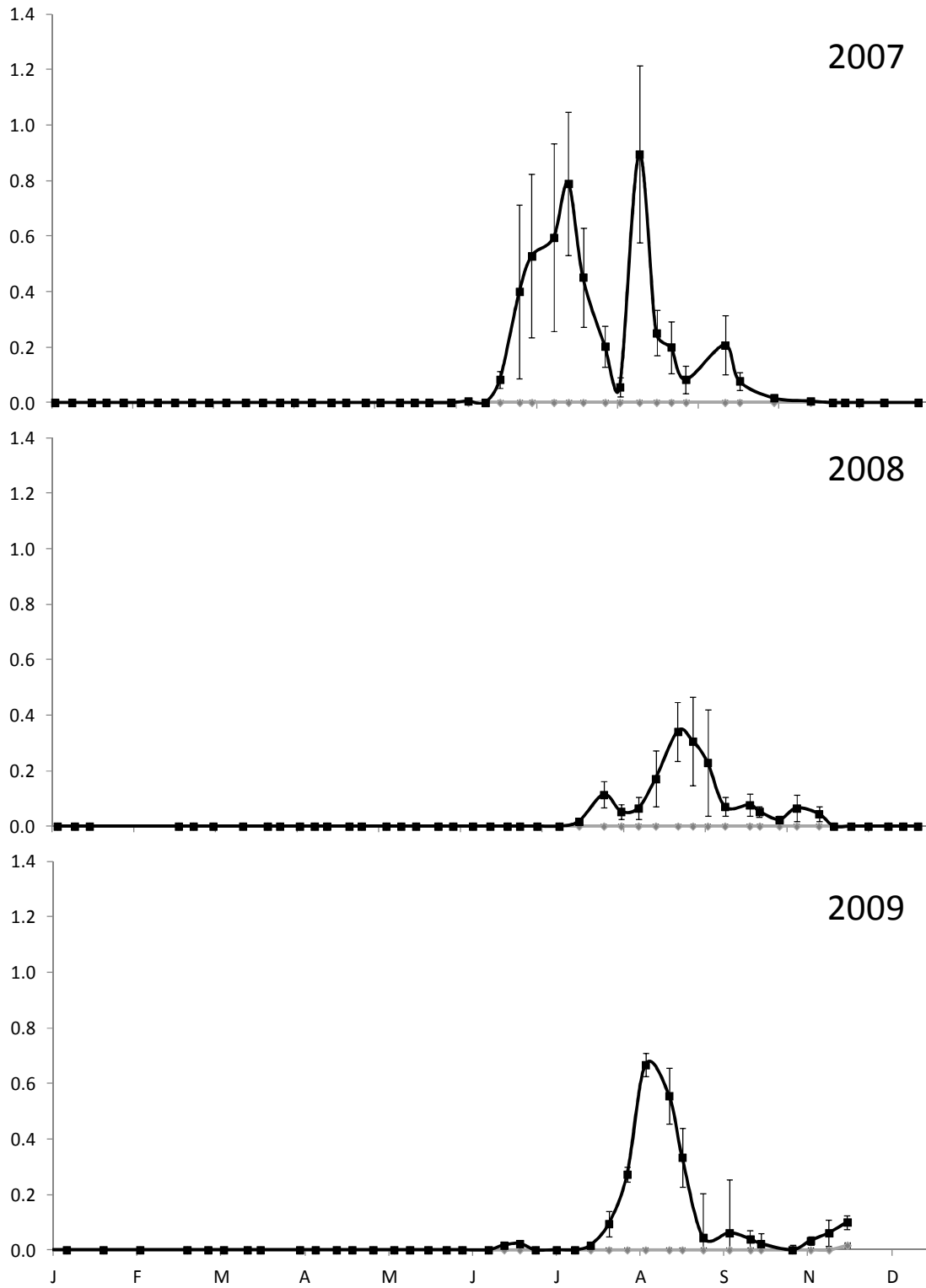


Economic threshold

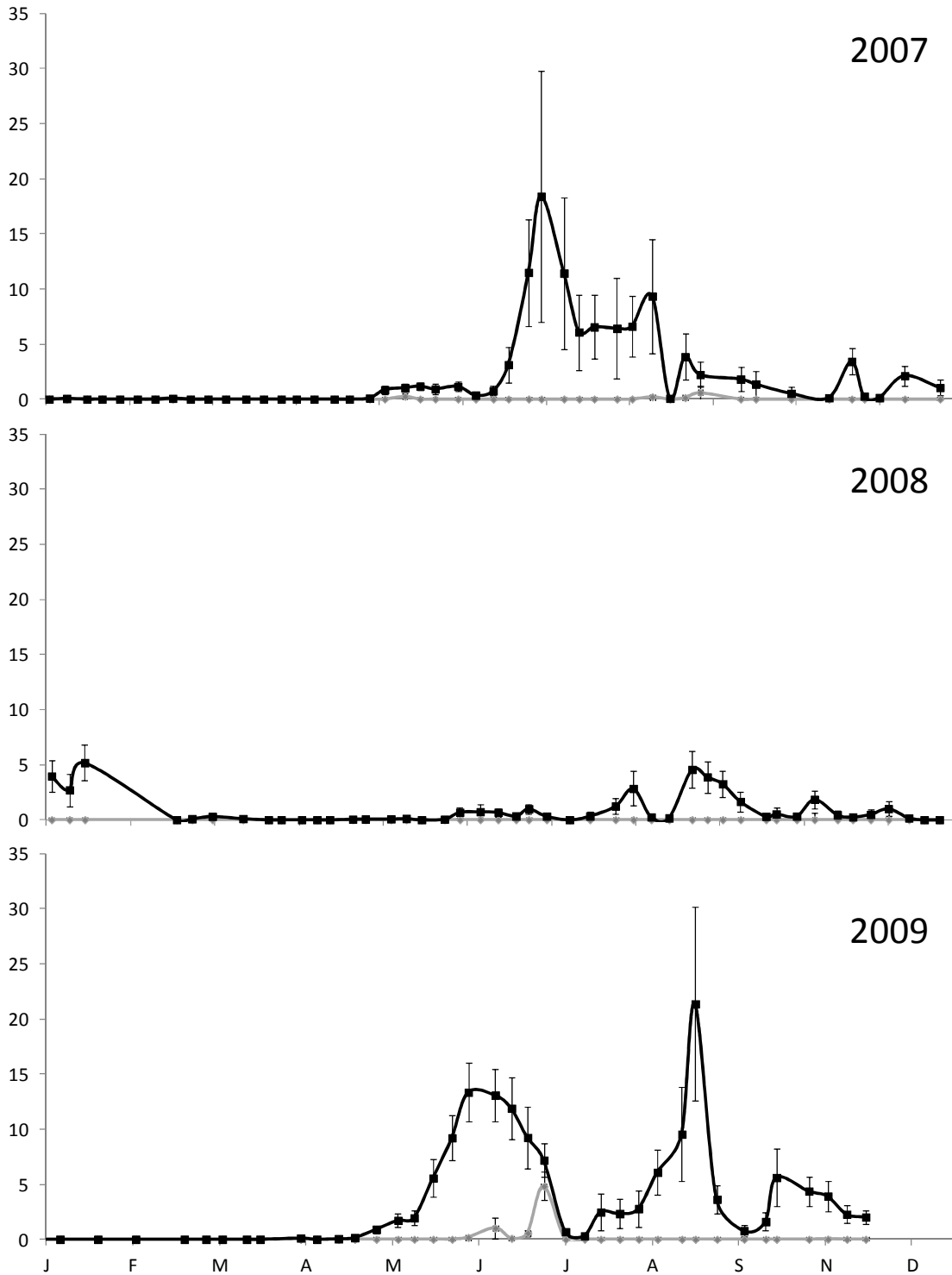
**Figure 3.2.c.** *Tetranychus urticae* per random leaf (MRL) (# MRL) from 2007 to 2009 in control (—◆—) and *T. urticae*-infested (—■—) trees.



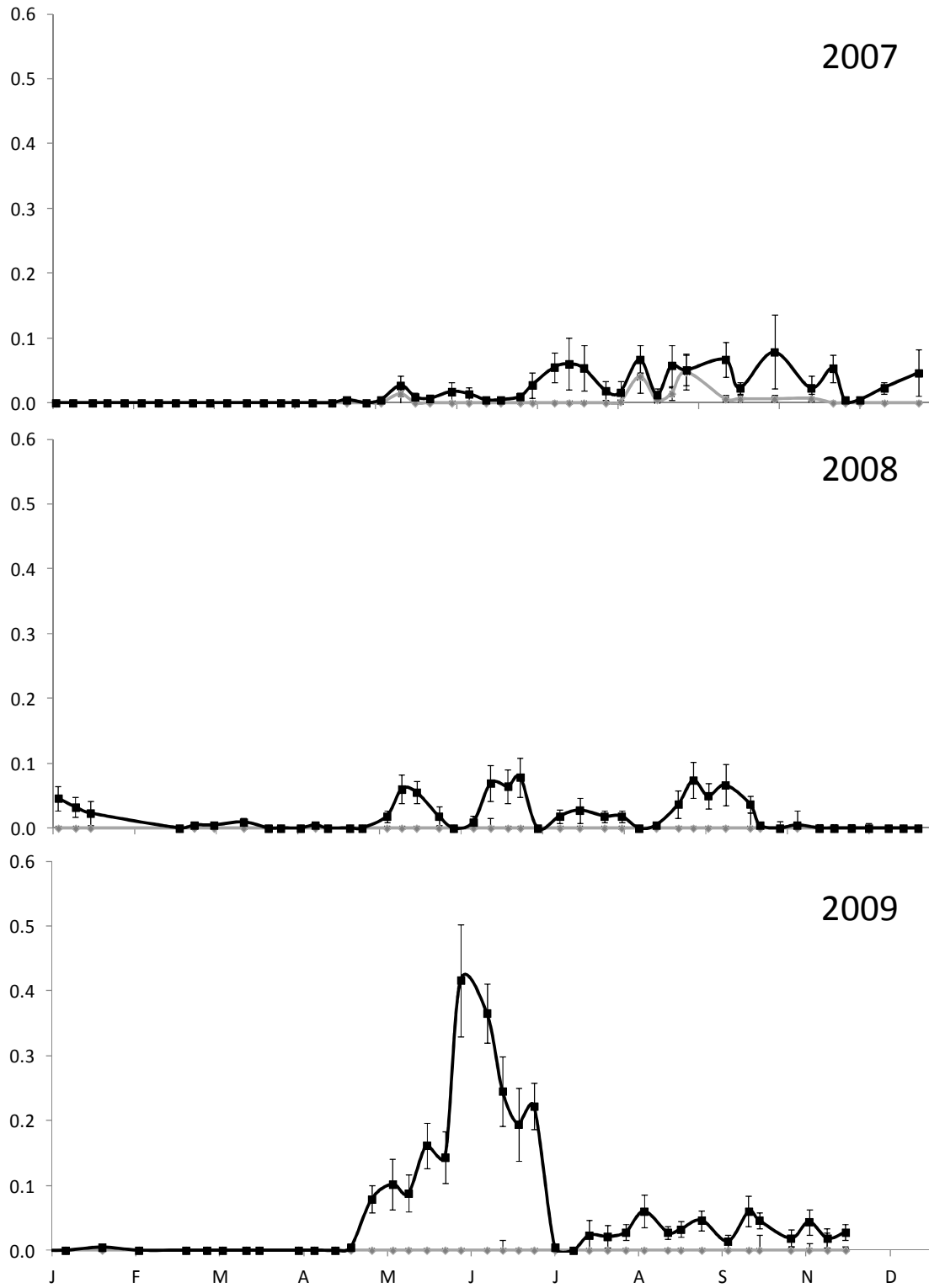
**Figure 3.2.d.** *Tetranychus urticae* per fruit (MF) (# MF) from 2007 to 2009 in control (—◇—) and *T. urticae*-infested (—■—) trees.



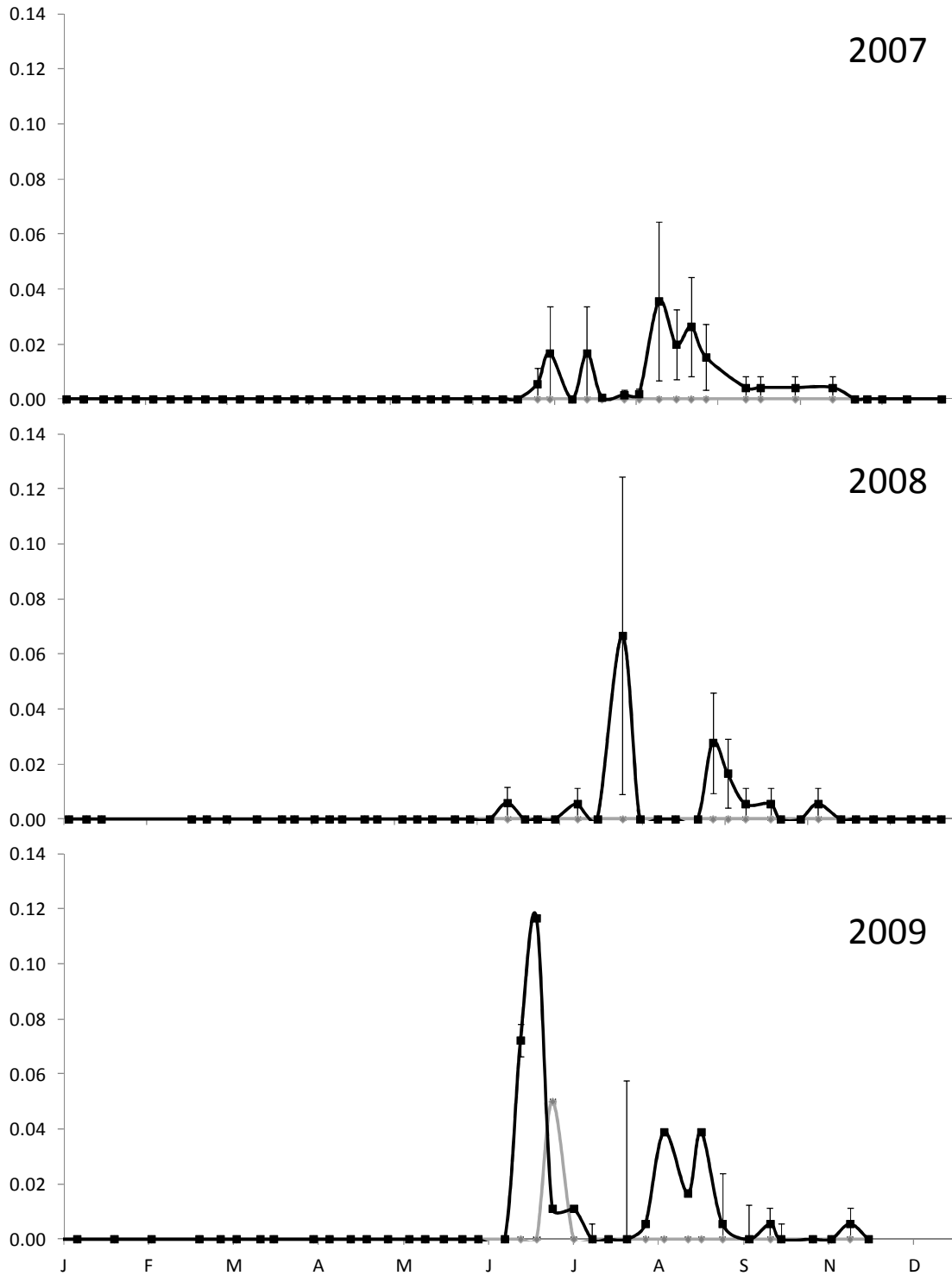
**Figure 3.2.e.** Phytoseiidae mites per symptomatic leaf (PSL) (# PSL m<sup>-2</sup>) from 2007 to 2009 in control (—◆—) and *T. urticae*-infested (—■—) trees.



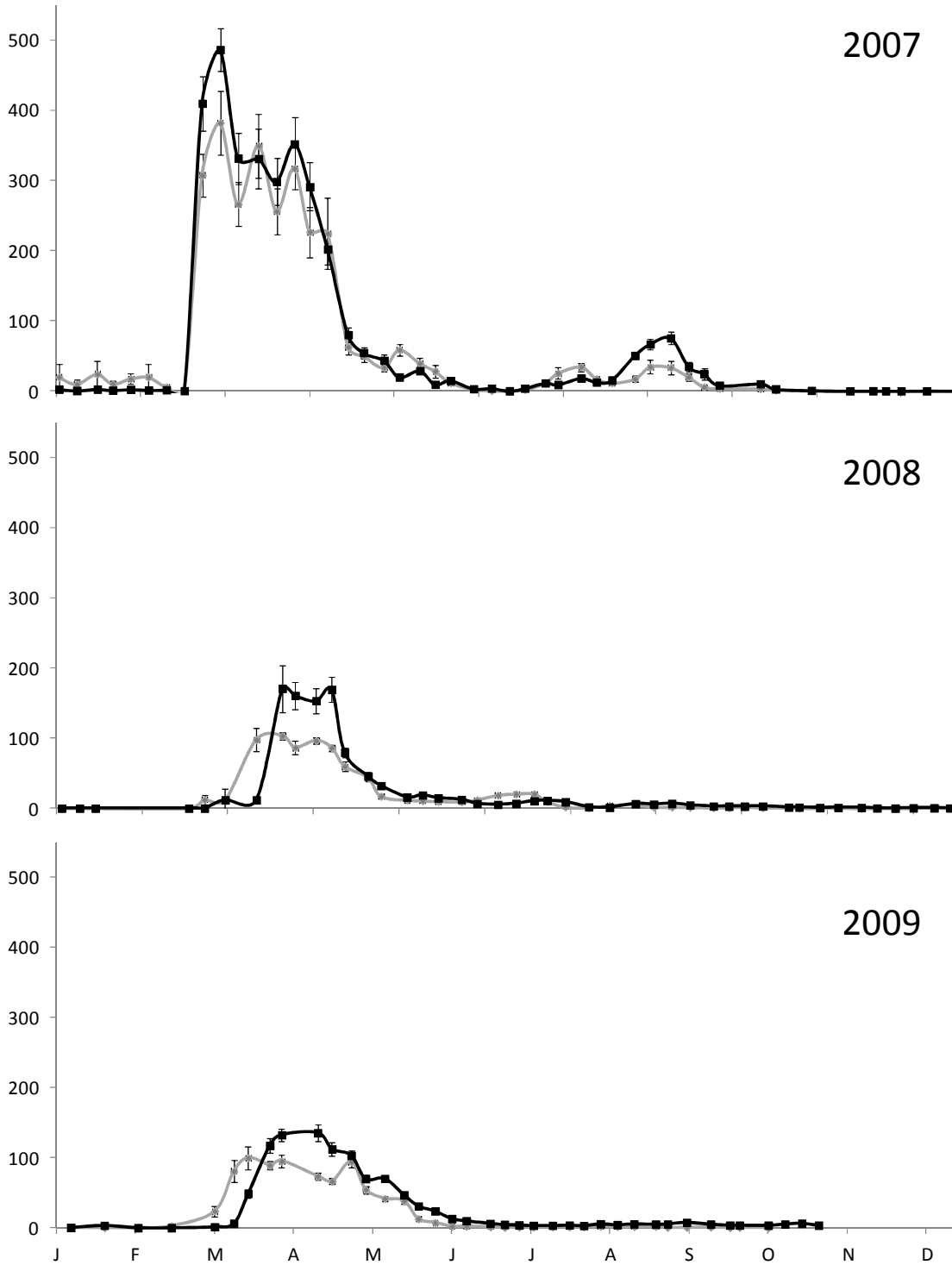
**Figure 3.2.f.** Phytoseiidae mites per random leaf (PRL) (# PRL) from 2003 to 2009 in control (—◆—) and *T. urticae*-infested (—■—) trees.



**Figure 3.2.g.** Phytoseiidae mites per fruit (PF) (# PF) from 2007 to 2009 in control (—◇—) and *T. urticae*-infested (—■—) trees.

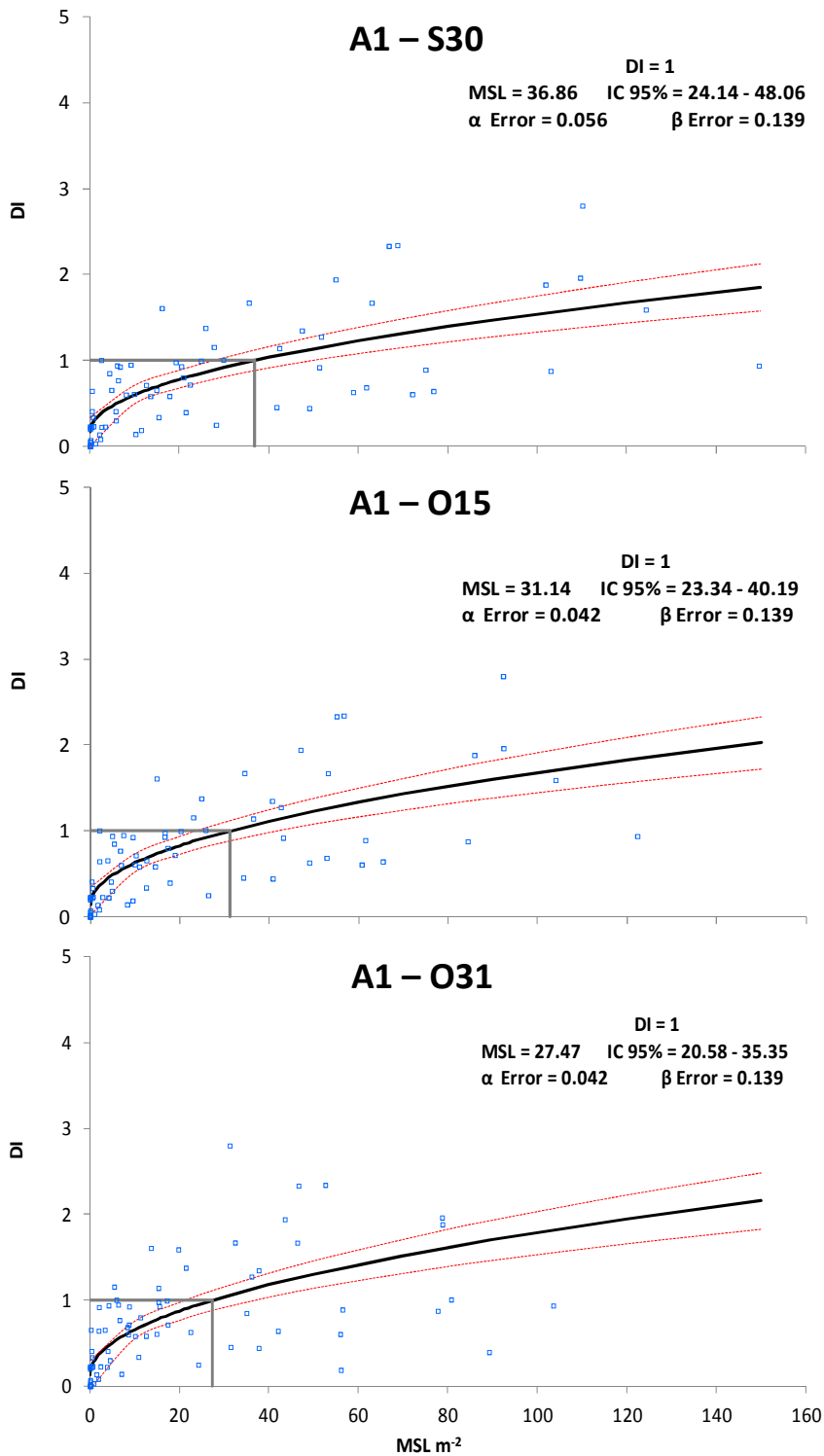


**Figure 3.2.h.** Leaf flushing (LF) (# LF m<sup>-2</sup>) from 2007 to 2009 in control (—◆—) and *T. urticae*-infested (—■—) trees.





**Figure 3.3.** Observed values ( $\square$ ) and fitted simple regression (—), and their 95 % confidence intervals (---) relating DI and MSL for the selected periods. Estimated threshold for DI = 1 (—) and  $\alpha$  and  $\beta$  errors (false negatives and false positives respectively).





**4. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Tetranychus urticae* and cross amplification in other Tetranychidae and Phytoseiidae species of economical importance.**



Una versión de este capítulo está publicada: Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Tetranychus urticae* and cross amplification in other Tetranychidae and Phytoseiidae species of economical importance. **Experimental and Applied Acarology**, 57 (1): 37-51.



#### **4. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Tetranychus urticae* and cross amplification in other Tetranychidae and Phytoseiidae species of economical importance**

##### **Abstract**

*Tetranychus urticae* Koch is a cosmopolitan phytophagous mite considered as the most polyphagous species among spider mites. Population genetic studies using molecular markers such as microsatellites have proven to be extremely informative to address questions about population structure, phylogeography and host preferences. The aim of this study was to increase the available molecular tools to gain insight into the genetic structure of *T. urticae* populations occurring in citrus orchards, which might help in their management. Five microsatellite DNA libraries were developed using probes with the motifs CT, CTT, GT and CAC following the FIASCO protocol. Positive clones, those that included the insert with the microsatellite, were detected using the PIMA-PCR technique.

Combinations of primers were designed on 22 out of 32 new microsatellites loci and their polymorphism was tested in four populations sampled along the eastern coast of Spain. Eleven successful amplifications were obtained. Cross amplification was tested in the tetranychids *Aphlonobia histricina*, *Eutetranychus banksi*, *E. orientalis*, *Oligonychus perseae*, *Panonychus citri*, *Tetranychus evansi*, *T. okinawanus* and *T. turkestani*, and the phytoseiids *Amblyseius swirskii*, *A. cucumeris*, *A. andersoni*, *Euseius stipulatus*, *Neoseiulus barkeri*, *N. californicus*, *Phytoseiulus persimilis* and *Typhlodromus phialatus*. Eight successful cross amplifications were obtained.

**Keywords:** *Citrus clementina*, microsatellites, SSRs, IPM

##### **4.1 Introduction**

*Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) is an important pest of citrus in Spain (Aucejo-Romero et al., 2004; Ansaloni et al., 2007; Aguilar-Fenollosa et al., 2011a) as well as in some citrus growing areas, especially in mandarins under Mediterranean climate (Bodenheimer, 1951; Talhouk, 1975; Swirski, 1977; McMurtry, 1985; Vacante, 1986; Hmimina et al., 1995; Souliotis et al., 1997). This mite constitutes the key pest of

Clementine mandarins, *Citrus clementina* Hort. ex Tan., in the region of La Plana, the area around the city of Castelló de la Plana (39° 59'N; 00° 02'W), where Spanish Clementine production concentrates (around 1.5 10<sup>6</sup> tons; 60 10<sup>3</sup> ha). Mite infestations in Clementine varieties result in chlorotic spots on leaves, but more importantly, in fruit scarring, which decreases its commercial value. Our main goal is to study the genetic variation of this important pest in terms of host specialization, adaptation to different production systems (organic vs IPM), and phylogenetic relationships. The study of the genetic structure of populations of *T. urticae* in citrus groves appears as a powerful approach to estimate gene flow among mites infesting different plants in the agroecosystem. Different molecular techniques, such as microsatellite markers, isolated in *T. urticae* and other related mite species (Navajas et al., 1998b, 2000; Nishimura et al., 2003; Uesugi and Osakabe, 2007, Abercrombie et al., 2009; Hinomoto et al., 2011), and the sequence of mitochondrial DNA gene coding for cytochrome oxidase I (COI) have already been used in tetranychid mites to study both inter- and intraspecific variation among populations (Navajas, 1998; Navajas et al., 1998a, 1999, 2000; Navajas and Fenton 2000; Hinomoto and Takafuji, 2001; Tixier et al., 2006a,b; Bailly et al., 2004; Xie et al., 2006; Ben-David et al., 2007; Carbonelle et al., 2007; Uesugi et al., 2009a,b; Li et al., 2009). Microsatellite markers have become one of the most popular genetic markers and they have been chosen in ecological studies because of their high polymorphism.

The enormous adaptability of *T. urticae* to different host plants (Gould, 1979; Fry, 1989, 1992; Agrawal, 2000), and the fact that in the citrus agrosystem, this mite can be found feeding on many plant species (Aucejo et al., 2003; Aguilar-Fenollosa et al., 2011a,b), have stirred our interest in determining the existence of host races of this species. Using the microsatellites developed by Navajas et al. (2002) in *T. urticae* populations of citrus orchards from Eastern Spain, we have found a low level of polymorphism in these populations. Only phylogeographic differences have been established in our populations (Hurtado et al., 2008a), with two *T. urticae* metapopulations: inland and coastal populations. The massive use of acaricides in commercial citrus orchards may explain these results, which would result in genetic bottlenecks in founder populations and reduced genetic variability in the populations. The development of new microsatellites for *T. urticae* will increase the number of tools for genetic differentiation of mite populations, which may help in refining the management of this pest species. Moreover, these new microsatellite loci could prove useful in other economically important mite species like Phytoseiidae and other Tetranychidae. Bailly et al. (2004) used the *T. urticae* microsatellites developed by Navajas et al. (2002) in a closely

related species, *Tetranychus turkestanii* Ugarov and Nikolski (Acari: Tetranychidae), and found geographical differences in this case, as well. Li et al. (2009) studied the genetic differences between *T. urticae* and *T. cinnabarinus* using the microsatellites developed by Navajas et al. (2002) and Uesugi and Osakabe (2007). The latter did not prove successful in this case. These authors have attempted to transfer microsatellite loci to closely related mite species. Recent studies have increased our knowledge about mite species composition and dynamics in citrus orchards (Abad-Moyano, 2009; Aguilar-Fenollosa et al., 2011a,b; Aucejo et al., 2003). However, the relationships among these species remain largely unknown. Molecular markers such as microsatellites could help us understanding the relationships among mites occurring in a specific agroecosystem. This would allow us to develop in the future more sound control strategies against phytophagous mites. Therefore, the aim of this study has been to increase the available molecular tools to gain insight into the genetic structure of *T. urticae* populations, which might help in their management.

## **4.2 Materials and Methods**

Unless otherwise indicated, all molecular techniques and solutions were performed as described by Sambrook et al. (1989).

### **4.2.1 Biological material**

*Tetranychus urticae* were collected from a laboratory colony maintained at the Entomology unit of IVIA (Valencia, Spain) which originated from the stock colony of Universitat Jaume I (UJI). This colony was started in 2001 from field collected material in the Castelló area. Other mites (Table 4.1) were field collected at different locations, individualized in eppendorf tubes and stored at -20°C till DNA extraction.

### **4.2.2 DNA extraction**

*Tetranychus urticae* total DNA was isolated following 'Salting out' protocol (Sunnucks and Hales, 1996) from a pool of 100 individuals (both sexes) for the generation of enriched libraries.

To test the markers in all species considered in this study (Table 4.1), individualized extractions were performed following the same 'Salting out' protocol. At least 10 individualized females of each species were used.

### 4.2.3 Enriched library

*Tetranychus urticae* total DNA was enriched for microsatellite motifs CT, CTT, GT and CAC following the FIASCO protocol (Zane et al., 2002) using *MseI* and *AluI* as restriction enzymes for the genome fractionation. Enriched DNA fractions were cloned into pGEM-T easy (Promega Biotech Ibérica SL., Madrid, Spain) and transformed into DH5 $\alpha$  electrocompetent *E. coli* cells (Invitrogen S.A., Barcelona, Spain) to obtain the libraries.

### 4.2.4 Library screening

Each library was plated on selective LB agar plates, white colonies were transferred to v-well plates containing 150  $\mu$ l of liquid TB-glycerol medium with 50 $\mu$ g/ml ampiciline. Cultures were set at 37°C, overnight without agitation. Cultured plates were stored at -80°C till used. Plates were subjected to colony PCR (Sabater-Muñoz et al., 2006) and PIMA-PCR technique (Lunt et al., 1999) to select clones with microsatellite motif (Figure 4.1). Positive clones, those that has included the insert with the microsatellite, were reamplified with M13 universal primers (M13 -20: 50-gTA AAA CgA Cgg CCA gTg-30 and M13 reverse: 50-ggA AAC AgC TAT gAC CAT g-30), purified with Sephadex G-50 superfine (GE-Amersham Healthcare, Chalfont St. Giles, UK), and verified by gel electrophoresis on a 2% agarose gel (Pronadisa, Sumilab, Madrid, Spain). Purified PCR products were directly sequenced at Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) at Universitat de València using BigDye® v3.1 chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with primers T7 and SP6 in 1/16 of the recommended reaction volume.

### 4.2.5 Microsatellite markers design

Electropherograms were checked and assembled into consensus sequences by using Staden package software (Staden et al., 2003) for each clone. Each consensus sequence was compared to GenBank by blast using blastN as implemented in NCBI web page to compare with other mite sequences. The sequences reported in this work have been deposited into GenBank at NCBI (National Center for Biotechnology Information) under accession numbers GU339354 to GU339386.

After these comparisons, primers were designed in conserved regions of 21 microsatellite loci using Oligo software version v4.0 (Rychlik, 1992), amplification



conditions were set up for each marker. Final successful conditions were 1x Taq pol buffer (Roche, Applied Science, Mannheim Germany), dNTPs, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 μM primers, 1 u. Taq pol (Roche, Applied Science, Mannheim Germany) and 1μl of DNA template. Microsatellite makers were tested with ten individuals of the following populations: (1) the original *T. urticae* colony (2) Lliria (inland population; 39°38'N 0°36'W), (3) Callosa d'En Sarrià (coastal population; 38°39'05"N, 0°07'22"W), (4) Vinaròs (coastal population; 40°28'N 0°29'E) and (5) Inca (Mallorca Island; 39°43'N 2°54'E), as well as with 10 individuals from each of the species listed in Table 4.1. Thermal profile was: a first denaturation at 94°C for 2 min, 40 cycles at 94°C for 15 sec, 55-50°C for 15 sec, and 72°C for 15 sec, followed by a last cycle at 72°C for 1 min, and a hold step at 4°C. Amplification was performed in a PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA). Several other manufactures (PCR reagents and thermocyclers) have been also tested positively.

Amplification was verified either by acrylamide gel electrophoresis with silver staining or, when forward primer was labelled with FAM-6 analyzed in an ABI/PE 3130 GeneAnalyzer (Applied Biosystems). Genotyping was performed using Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems, 2006).

#### 4.2.6 Microsatellite analysis

Individual genotype was determined in at least ten individuals from the Vinaròs population of *T. urticae* with all new microsatellite loci (Table 4.2). Null genotype (no amplifying at a locus) was declared only after at least three amplifications failed (marked as no amplification (-) in Tables 4.2 and 4.3). The genetic variability was examined in terms of average observed heterozygosity (HO), the average expected heterozygosity (HE), the average frequency of null alleles (An) and mean inbreeding coefficient (FIS) (Table 4.2). These parameters were estimated using GENETIX version 4.05.2 (Belkhir et al., 2004) and GENEPOP version 4.1.1 software (Rousset, 2008). The frequency of null alleles (An) was calculated as  $[(HE-HO)/(HE+1)]$  (Brookfield, 1996).

## 4.3 Results

### 4.3.1 Microsatellite markers design

The FIASCO enrichment performed resulted in a total of 1,786 independent clones isolated from the six cDNA libraries, from which 407 clones were PIMA-PCR selected and single-pass sequenced. After sequence confirmation of microsatellite presence, bidirectional sequencing was performed for 34 clones. Only 2 out of the 34 selected clones by PIMA methodology did not contain a microsatellite sequence (but contained several bi or tri-repeats of the motifs which could not be set as a real microsatellite), which means that this methodology is a 95% successful in microsatellite detection. Microsatellite distribution in libraries was 40 % and 34 % from CAC and CTT libraries, respectively. The remaining 26% corresponded to CT and GT libraries.

Blast comparisons showed that none of the clones obtained were already present in the data base. Only one clone produced a significant blast similarity with a mite sequence, corresponding to a small microsatellite found in the 18S rDNA gene from *Hypochothonius rufulus* Koch (Acari: Oribatida). From the remaining 32 clones, 17 contained a perfect microsatellite motif and 15 contained imperfect motifs. Microsatellite loci names, motif and designed primers are listed in Tables 4.2 and 4.5.

### 4.3.2 Amplification mismatches and other amplification patterns

Three loci yielded amplicons larger than expected. These amplicons were directly sequenced with the corresponding primers. The sequence comparison revealed that the amplicon corresponded to different microsatellite loci amplified under suboptimal conditions for the designed locus.

The forward primer designed for locus m14E02 was also found in other sequences of the loci described in this work, specifically in locus m11C09. Both loci were discarded as they showed a multiple polymorphic band amplification pattern. Other loci with the same banding amplification pattern are listed in Table 4.5.

### 4.3.3 Polymorphism detection on microsatellite markers

The number of alleles for each microsatellite loci tested varied from 1 to 6, and these loci are listed in Tables 4.2 and 4.3 for tetranychidae, and in Table 4.4 for phytoseiidae species, respectively. Designed markers were tested against the species listed in Table 4.1 for crossamplification. Amplification conditions were the same as for the marker development and no effort was undertaken to optimize amplification for unsuccessful or multiple banding pattern cross-amplifications. Tables 4.3 and 4.4 summarize this cross reactivity per species, including size and allele number of each marker. In summary, eight loci successfully crossamplified in other tetranychidae species, and seven in phytoseiidae (Table 4.6).

## 4.4 Discussion

Eleven new microsatellite loci for the characterization of two spotted spider mite populations have been developed. These new loci have been sorted out from a library enrichment which resulted in 95% successful microsatellite identification, an extremely high percentage, higher than that obtained by other authors (Navajas et al., 1998b, 2002; Nishimura et al., 2003; Uesugi and Osakabe, 2007). Our results are in agreement with another work in which CT and GT motifs were less represented (Navajas et al., 1998b) than other repetitions. Interestingly, while our assays were carried out, 16 new microsatellite loci for the same species were developed based on CT and GT motifs (Uesugi and Osakabe, 2007). In another closely related species, *Tetranychus kanzawai* Kishida, the motifs CT and GT were also the targets for microsatellite characterization (Nishimura et al., 2003).

We have obtained a similar rate of loci discarding as other authors (Navajas et al., 2002; Nishimura et al., 2003; Uesugi and Osakabe, 2007). We were able to design 22 combinations of primers from the 32 microsatellite clones obtained. However, after amplification only 11 microsatellite markers were selected. Li et al. (2009) used in their studies the microsatellites developed by Uesugi and Osakabe (2007) which proved unsuccessful. Remarkably, we tested some of them (TuCA12, TuCA25, TuCA72, TuCA83, TuCA96, TuCT04, TuCT17, TuCT18, TuCT26, TuCT73 and TkMS015) in our populations (Table 4.2) and obtained successful amplifications with at least two different alleles each. We also included a population from Florida (USA), which showed no amplification with our loci. However, this population successfully amplified 9 out of the 11 Japanese loci tested (Nishimura et al., 2003; Uesugi and Osakabe, 2007) despite the samples were subjected to the same experimental protocol which includes

the same extraction protocol and PCR conditions (PCR reagents, thermocyclers and amplification profiles) (data not shown). These results raise questions about the difficulty in transferring *T. urticae* microsatellite markers between continents and/or laboratories (different extraction practices and PCRs). Despite that Japan and Spain belong to the Palearctic Region, whereas USA belongs to the Nearctic Region, the results obtained with these primers show a closer relationship between Japanese and USA *T. urticae* populations than between those in the same biogeographical region. This question appeared also when ITS (Hurtado et al., 2008b) and COI gene (Hinamoto et al., 2001; Navajas et al., 1998b) sequences were analyzed and it deserves further research.

Microsatellite markers in *T. urticae* are hard to obtain. In the present study microsatellites were not only isolated, but also characterized and tested in populations of *T. urticae* originating from different areas of the Western shore of the Mediterranean Basin, as well as in other mite species of economic importance, such as predatory Phytoseiidae mites. The transfer of markers to other species is a key point, since they can be useful for population studies, including detection of the origin of invasive species such as *Eutetranychus banksi* (McGregor), *E. orientalis* (Klein), or *Olygonychus perseae* Tuttle, Baker & Abbatiello, which have been recently introduced into Spain. The transference of microsatellites from the source species to closely related species is a subject of interest due to the difficulties and economic investment needed irrespective of the taxons studied (Bech et al., 2010; Canales-Aguirre et al., 2010; Olivatti et al., 2011; Telles et al., 2011). In tephritid flies, a species group of economic interest as the mites used in this study, microsatellites are transferable between species with variable degree of relatedness, ranging from 49 to 24% when species belong to a different genus from the one of the source species (Augustinos et al., 2008). These authors reported a locus size mean difference of less than 50 bp, estimated by agarose gel electrophoresis, between species when considering the same locus. This degree of PCR product size conservation was variable and also linked to the relatedness of species. Although we obtained similar results of cross-species transferability, if we take into account the percentage of functional primers and the expected size, our results are not indicative of the phylogenetic history of the mite species, as proposed for Tephritidae. We obtained a similar percentage of cross amplification in phytophagous and entomophagous mites, which have far phylogenetic relationships (Navajas et al., 1998a, 1999). This close “clustering” of cross amplification may be related to a parallel evolution or co-evolution of phytophagous (prey) and entomophagous (predator) mites genome regions on which the primers

have been designed. In some cases the described microsatellites have been identified in coding regions of the two spotted mite genome (data not shown) (Grbić et al., 2011). In relation to this issue (predator–prey relationship) we made sure that the cross-amplification was true and not an artefact due to the presence of phytophagous DNA (prey) in the entomophagous phytoseiid gut by multiplex PCR based method (Pérez-Sayas et al., 2011). Outstandingly, this is the first time that a successful transfer is achieved among distantly related mite species and their natural enemies.

The usefulness of the markers presented in this study is obvious both from a basic (e.g. population studies, assessment of predation, etc.) and an applied (e.g. quality control in commercial insectaries) points of view. As stated before, due to the difficulties and the high economical investment needed to develop species specific microsatellite markers, the transference of microsatellite markers among species (heterologous amplification) is a very interesting alternative.

### **Acknowledgments**

This work was partially funded by Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) projects AGL2005-07155-C03/AGR and AGL2008-05287-C04/AGR and by the Fundació BANCAIXA – Universitat Jaume I projects P1-1A2005-03 and P11B2008-02.

**Table 4.1.** Mites species used in this study

Family	Species	Code	Origin
Tetranychidae	<i>Tetranychus urticae</i>	TuCs	Castelló
	<i>T. urticae</i>	TuLi	Llíria
	<i>T. urticae</i>	TuMall	Inca
	<i>T. urticae</i>	TuVi	Vinaròs
	<i>T. urticae</i>	TuCa	Callosa d'En Sarrià
	<i>T. turkestanii</i>	Tt	Almenara
	<i>T. evansi</i>	Te	Murcia
	<i>T. okinawanus</i>	To	Florida
	<i>Panonychus citri</i>	Pc	Moncada
	<i>Eotetranychus orientalis</i>	Eo	Málaga
	<i>E. banksi</i>	Eb	Huelva
	<i>Oligonychus perseae</i>	Op	Málaga
	<i>Aplonobia histricina</i>	Ah	Moncada
Phytoseiidae	<i>Typhlodromus phialatus</i>	Tp	Moncada
	<i>Neoseiulus californicus</i>	Nc	Koppert Biological Systems
	<i>N. barkeri</i>	Nb	Castelló
	<i>Euseius stipulatus</i>	Es	Moncada
	<i>Phytoseiulus persimilis</i>	Pp	Koppert Biological Systems
	<i>Amblyseius swirskii</i>	As	Koppert Biological Systems
	<i>A. andersoni</i>	Aa	Biobest Biological Systems
	<i>A. cucumeris</i>	Ac	Koppert Biological Systems

**Table 4.2.** Characteristics of *Tetranychus urticae* developed microsatellite loci and their genetic variability in terms of  $H_o$ ,  $H_E$ ,  $F_{IS}$  and  $A_n$ . Primer sequences for each locus are indicated as forward (for) and reverse (rev), with indication of the annealing temperature for each primer pair. Allele size range (in base pairs) and number of alleles (within brackets) are indicated for each population.

Locus	Motif	No. repeats	Primer sequences (5'→3')	Ann. T (°C)	TuCS	TuLi	TuVi	TuCa	TuMall	$H_o$	$H_E$	$F_{IS}$	$A_n$
M11b04	CAC	8	GAG GTT GTC AGT CAT CGT TTC (for) CGA TGA GTC CTG AGT AAT GAT (rev)	55	70-79 (4)	70-79 (4)	54-66 (5)	52-64 (5)	54 (1)	0.9048	0.6136	-0.468	-0.1805
M11g09	CTT	9	ACC TAA AGA AGA CGA GCA AGA (for) AAA GCA GCA GAC ACA ACA AAT (rev)	55	122 (1)	122 (1)	122- 146 (2)	122- 146 (2)	122 (1)	0.7273	0.6942	0.000	-0.0195
M11e03	CAC	8	ATT TTC CAC TGG ATG ACC TGG (for) CCT CTT CCT CCT CAT CAT CAC (rev)	55	182- 203 (2)	182- 203 (3)	203- 215 (2)	190- 203 (2)	203 (1)	0.1091	0.1031	-0.049	-0.0054
M11h03	CAC	9	TGT TGA ACC CTG ACC TGG TAG (for) ACC AGG TGA GCC AGC ATA GTC (rev)	50	100- 103 (2)	88-109 (3)	ND	97 (1)	97 (1)	0.7500	0.4688	-0.500	-0.1914
M14a11a	CAC	9	CCT CTG GAG GTA ACC TTG GTC (for) TCC ATG TTC ATG TTC GTG GTC (rev)	55	177 (1)	-	136- 151 (2)	-	-	0.6667	0.4444	-0.429	-0.1539
M11h07	CTT	8	GCT TCT TCT TCA TCT TCT TTA (for) AGT TCT CTT GGT CCT TTC TTA (rev)	55	220- 226 (2)	211- 220 (2)	186- 229 (4)	196- 226 (4)	-	0.0952	0.0913	-0.035	-0.0036
M11e11	AGA	6	AAA GGA GAA GAA TGA AAA TAA (for) TTT TAT CAT TCT ATC TTC CAT (rev)	55	180 183 (2)	180 195 (3)	180 198 (3)	180 206 (3)	-	0.0500	0.0966	0.492	0.0424
M11g06	GT	33	TTT GTT GCA CGC AAA TGT CAC (for) CAG TGA TAA CAG TAC AAG AGG (rev)	55	111- 113(2)	111 (1)	95-101 (3)	111- 113 (2)	95 (1)	0.0000	0.3750	1.000	0.2727
M11b05	GT	21	GGG TCT GTT TTA AGA AGA TAA AG (for) TAG ATT AAT GCC TTT AAA TGT AC (rev)	50	105 (1)	105 (1)	105 (1)	105 (1)	87 (1)	0.0000	0.0000	ND	ND
M11d04	ACC	4	TTT GAA TAG CGA TGA CGA TGA GC (for) GTT CTT CAT ACC CTT AAA GAT CG (rev)	50	103 (1)	103- 106 (2)	120 (1)	103- 109 (3)	159 (1)	0.4286	0.6020	0.357	0.1082
M20a03	GAA	4	TCA CGG GAA GTT TAC AAG TTG AAA G (for) GAA AAG GGA ATG GAA GAT GAA AGA G (rev)	55	195- 249 (4)	195- 219 (4)	230- 239 (4)	228- 243 (3)	371 -	0.1579	0.2630	0.407	0.0832

**Table 4.3.** Cross amplification characteristics of *Tetranychus urticae* newly developed microsatellite loci in other Tetranychidae species.

Locus	Motif	No. repeats	Tt	Te	Pc	Eo	Eb	Op	Ah	Tok
<b>M11b04</b>	CAC	8	70-82 (5)	70-85 (5)	67-85 (6)	76-79 (2)	76 (1)	76-82 (2)	70-85 (5)	70-79 (4)
<b>M11g09</b>	CTT	9	122 (1)	156 (1)	90-99 (2)	-	122-146 (2)	110- 185 (4)	116-122 (2)	122 (1)
<b>M11e03</b>	CAC	8	203(1)	182 (1)	182-203 (2)	-	191-203 (2)	203 (1)	MBP	203 (1)
<b>M11h03</b>	CAC	9	100 (1)	100-106 (2)	94-103 (3)	100-103 (2)	100-103 (2)	79-100 (3)	97-103 (3)	97-100 (2)
<b>M14a11a</b>	CAC	9	-	158 (1)	-	-	-	-	-	-
<b>M11h07</b>	CTT	8	214 (1)	-	-	200 (1)	229 (1)	223 (1)	MBP	220 (1)
<b>M11e11</b>	AGA	6	180 (1)	180 (1)	180-199 (2)	204-211 (2)	175 (1)	204 (1)	264-292 (2)	-
<b>M11g06</b>	GT	33	111 (1)	-	-	101-111 (2)	111 (1)	-	103 (1)	-
<b>M11b05</b>	GT	21	-	-	105 (1)	105 (1)	-	-	-	-
<b>M11d04</b>	ACC	4	100-115 (5)	103-106 (2)	103 (1)	103-112 (2)	100-115(2)	103(1)	-	115(1)
<b>M11d04_372</b>	ACC	4	344 (1)	-	-	-	-	318 (1)	301 (1)	363 (1)
<b>M20a03</b>	GAA	4	195- 216 (3)	195-210 (2)	195-210 (2)	195-210 (2)	195-210 (2)	195-210 (2)	165-219 (3)	165-225 (6)



Microsatellite markers

**Table 4.4.** Characteristics of new *Tetranychus urticae* microsatellite loci in cross amplification in Phytoseiidae species.

<b>Locus</b>	<b>Nc</b>	<b>Es</b>	<b>Pp</b>	<b>As</b>	<b>Aa</b>	<b>Ac</b>	<b>Tp</b>	<b>Nb</b>
<b>M11b04</b>	70-82 (4)	70-85 (4)	70-76 (3)	70-82 (4)	70-85 (5)	52-64 (5)	52-64 (5)	52-64 (5)
<b>M11g09</b>	AFLP	146-152 (2)	AFLP	AFLP	221 (1)	AFLP	AFLP	AFLP
<b>M11e03</b>	AFLP	AFLP	AFLP	AFLP	AFLP	AFLP	AFLP	AFLP
<b>M11h03</b>	88-114 (5)	94-103 (3)	100-117 (2)	100-103 (2)	82-117 (5)	94-103 (3)	97-103 (3)	82-103 (4)
<b>M14a11a</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>M11h07</b>	220 (1)	-	220 (1)	221-202 (2)	220 (1)	-	208 (1)	208 (1)
<b>M11e11</b>	217-304 (3)	171-351 (3)	239 (1)	-	221 (1)	-	183	180
<b>M11g06</b>	-	105-117 (2)	138 (1)	102-138 (3)	105-126 (3)	123-138 (2)	111-138 (2)	111 (1)
<b>M11b05</b>	105 (1)	105 (1)	-	-	105 (1)	105 (1)	105 (1)	105 (1)
<b>M11d04</b>	335-360 (2)	321 (1)	354 (1)	327 (1)	351 (1)	102 (1)	102-105 (2)	102-118 (2)
<b>M20a03</b>	192- 222 (4)	165-222 (5)	165-222 (6)	168-219 (6)	165-219 (6)	228 (1)	228-231 (2)	228 (1)

**Table 4.5.** Loci discarded by amplification failure or multiple banding results (AFLP-like loci) in *Tetranychus urticae* samples

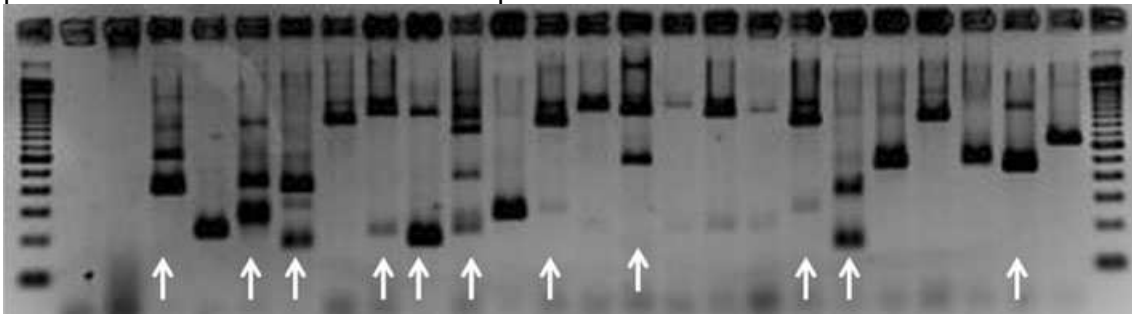
Locus	Motif	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)*	Annealing T (°C)	Amplification type	Species tested
TuCA1	GT	CGA ATC ATA AAG AGA ATG GAG (for) TTC ATC TGG CTA TCT GGT GTC (rev)	373	55	AFLP	TuCS
TuGTG1	CAC	GAG CCT GAG ATT GAC GAT GAG (for) TCA GCA TCA CAA TCA GAC TCC (rev)	124	55	AFLP	TuCS
TuGT1	GT	TGG GAA GAT GAT GGT TTA ATG A (for) TTG CAT GCT TAA GGC CAT TT (rev)	200	55	AFLP	TuCS
M16f04	CAC	ATC GCT GGT GGA AAC AAA AGC (for) ATC ACT GTC CAC TAT CGT CAC (rev)	122	55	AFLP	TuCS
M11b12	CTT	AAA ATG TCA GTC AGT CTC AAT (for) GTA AAG GAA AAA TCT CAA AAA (rev)	191	55	AFLP	TuCS
M14g11	CAC	GAG TTT ATT TGA TGT TGA GGA CGA T (for) TTT TTG GGT CTT CGC TGG GGT AAC T (rev)	148	55	AFLP	TuCS
M17d08	GTG	AAG CGC AAC TAG ATT GAC GTT GAT G (for) ACG ATG AGT CCT GAG TAA TAA TGG G (rev)	115	55	No amplification	TuCS
M14e02	CTT	ACG ATG AGT CCT GAG TAA GTG (for) GAT TAT TTT TGC TTG GGA AGC (rev)	132	55	AFLP	TuCS
M14d02	CTT	TCC TCA TCA TCA TCA TCT TCT (for) ATC TTT ATT CCC TTT ATT TCA (rev)	125	55	AFLP-No amplification	TuCS
M11c09	CTT	AAT GAA AGA AGT TGA AAG TTG CT (for) CCA ATC CAA TGA ATA ACA TTG AG (rev)	318	50	No amplification	TuCS

**Table 4.6.** Summary of cross-species amplification of *T. urticae* microsatellite markers in 17 mite species.

Family	Specie	Functional primer pairs
Tetranychidae	<i>Tetranychus urticae</i> *	11/22
	<i>T. turkestanii</i>	10/22
	<i>T. evansi</i>	8/22
	<i>T. okinawanus</i>	8/22
	<b>Tetranychus</b>	7/11
	<i>Eotetranychus orientalis</i>	8/22
	<i>E. banksi</i>	9/22
	<b>Eotetranychus</b>	7/9
	<i>Panonychus citri</i>	8/22
	<i>Oligonychus perseae</i>	8/22
	<i>Aplonobia histricina</i>	7/22
Phytoseiidae	<i>Typhlodromus phialatus</i>	8/22
	<i>Neoseiulus californicus</i>	7/22
	<i>N. barkeri</i>	8/22
	<b>Neoseiulus</b>	7/8
	<i>Euseius stipulatus</i>	7/22
	<i>Phytoseiulus persimilis</i>	7/22
	<i>Amblyseius swirskii</i>	6/22
	<i>A. andersoni</i>	9/22
	<i>A. cucumeris</i>	6/22
	<b>Amblyseius</b>	5/9

The functional primer pairs number corresponds to those primer pairs that successfully amplified; \*: mean of the five populations tested.

**Figure 4.1.** Amplification pattern of clones containing microsatellites by using PIMA. First and last lanes correspond to molecular weight marker (100bp ladder, Invitrogen). Some lanes marked with a white arrow corresponded to clones containing microsatellites, as the two PCR products are formed by combination of universal M13 primers and microsatellite motif PIMA primer.



## 5. Conclusiones



## 5. Conclusiones

1. La brotación estival y otoñal de los clementinos puede limitar la cantidad de daño infligida por *T. urticae* en fruto, especialmente cuando las poblaciones de *T. urticae* son bajas. Por ello, aquellas prácticas culturales (especialmente el riego) y el control de las especies plaga que atacan los brotes (*P. citrella* y los pulgones) que aseguren la abundancia de la brotación en estas épocas parece crucial para minimizar el impacto de *T. urticae* en la calidad del fruto, y, consecuentemente en el destrío en cosecha.
2. La brotación debe ser tenida en cuenta al establecer los umbrales de intervención contra esta especie plaga.
3. Las densidades de *T. urticae* que de forma natural se pueden alcanzar en los clementinos de la zona de La Plana son capaces de reducir significativamente la producción y la calidad (medida a través de las manchas en la piel) de la fruta, pero no afectan a su diámetro.
4. Las densidades de *T. urticae*, tanto en hojas sintomáticas como en fruto, son los mejores predictores del daño en cosecha (producción y manchado de fruta). Sin embargo, el hecho de que para un índice de daños, DI, igual a la unidad (máximo daño tolerado por el comercio), los efectos sobre producción fueran inferiores a la variación natural en producción del control (5,6 frente a 11,1 %, respectivamente) hicieron que se descartase seguir teniendo en cuenta la reducción en la producción para el desarrollo de umbrales.
5. Para la predicción del manchado de la fruta, el periodo que se extiende entre el 1 de agosto y el 15 de octubre es el que para un menor tiempo de observación, mejor explica las variaciones de daño en cosecha ( $R^2 = 65.4 \%$ ), y por tanto, el aconsejado para realizar los seguimientos en campo.
6. Puesto que las densidades de *T. urticae* alcanzadas en primavera explican muy poco los daños observados en cosecha, no se aconseja ni muestrear ni tratar contra *T. urticae* en esa época del año.
7. El importante papel que los ácaros fitoseidos juegan como enemigos naturales de la araña se ha visto apoyado por la correlación negativa existente entre sus densidades en hoja sintomática y el daño.

## Conclusiones

8. De forma parecida, se ha puesto de manifiesto el efecto amortiguador de la brotación sobre el daño, ya que también se encontró una correlación negativa entre daño y brotación.
9. Para simplificar el umbral y hacerlo útil en GIP, se seleccionó la densidad de *T. urticae* en hoja sintomática, ya que fue el parámetro que por sí solo mejor explicó el daño en fruto para el periodo elegido, y, muy importante, que no presentaba fluctuaciones explosivas, como las poblaciones en fruto, que invalidarían su utilidad para GIP.
10. Por todo lo expuesto, el umbral económico de daños se fijó en 31,14 ácaros por m<sup>2</sup> de hoja sintomática entre el 1 de agosto y el 15 de octubre. En función del método de tratamiento elegido, el umbral de intervención oscilaría entre 10 y 15 ácaros por m<sup>2</sup> de hoja sintomática en el mismo periodo. El método de muestreo será el desarrollado por Martínez-Ferrer y colaboradores.
11. Con el uso del umbral de intervención, será posible contribuir a la racionalización de la gestión de *T. urticae* en clementinos, parte integrante de los programas de GIP en cítricos.
12. A partir de una genoteca de *T. urticae*, se ha conseguido el aislamiento y caracterización de 11 nuevos marcadores microsatélites que pueden ser utilizados para estudios poblacionales de *T. urticae*.
13. Estos nuevos microsatélites se han probado con éxito en otras especies de tetránquidos y fitoseidos de importancia económica, y podrán ser utilizados en futuros estudios poblacionales con esas especies.
14. Los nuevos microsatélites, juntamente con otros marcadores desarrollados por otros investigadores para esta especie y especies próximas, se han incorporado con éxito a cinco PCR multiplex para su aplicación a estudios poblacionales de *T. urticae*.



## 6. Bibliografía



## 6. Bibliografía

- Abad-Moyano, R. 2009. Bases para el control biológico de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) en clementino. Tesis Doctoral. Departamento de Ecosistemas Agroforestales. ETSIA. Universidad Politécnica de Valencia.
- Abad-Moyano, R; Pina, T; Ferragut, F y Urbaneja, A. 2009b. Comparative life-history traits of three phytoseiid mites associated with *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) colonies in clementine orchards: *Phytoseiulus persimilis* and *Neoseiulus californicus*. *Exp. App. Acarol.*, 50: 23:34.
- Abad-Moyano, R; Pina, T; Dembilio, O; Ferragut, F; Urbaneja, A. 2009a. Survey of natural enemies of spider mites (Acari: Tetranychidae) in citrus orchards in Eastern Spain. *Exp. Apl. Acarol.*, 47: 49-61.
- Abad-Moyano, R; Urbaneja, A y Schausburger, P. 2010. Intraguild interactions between *Euseius stipulatus* and the candidate biocontrol agents of *Tetranychus urticae* in Spanish clementine orchards: *Phytoseiulus persimilis* and *Neoseiulus californicus*. *Exp. App. Acarol.*, 50: 23-34.
- Abercrombie, LG; Anderson, CM; Baldwin BG., et al. 2009. Primer note—permanent genetic resources added to Molecular Ecology Resources database. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1375-1379.
- Agarwala, BK; Das, S y Bhaumik, AK. 1987. Natural food range and feeding habits of aphidophagous insects in northeast India. *J. Aphidol.*, 1: 18-22.
- Agrawal, AA. 2000. Host-range evolution: adaptation and trade-offs in fitness of mites on alternative hosts. *Ecology*, 81: 500-508.
- Aguilar-Fenollosa, E. 2011. Efecto de la cubierta vegetal en el control biológico de *Tetranychus urticae* en mandarino clementino. Tesis Doctoral. Departament de Ciències Agràries I del Medi Natural. Universitat de Jaume I.
- Aguilar-Fenollosa, E; Pascual-Ruiz, S; Hurtado-Riu, M y Jacas JA. 2008. Efecto del manejo de la cubierta vegetal en la acarofauna asociada a *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Prostigmata) en clementino. *Bol. San. Veg. Plagas*, 34: 461-472.

- Aguilar-Fenollosa, E; Ibáñez-Gual, MV; Pascual-Ruiz, S; Hurtado, M y Jacas JA. 2011a. Effect of Ground-Cover Management on Spider Mites and their Phytoseiid Natural Enemies in Clementine Mandarin Orchards (I): Bottom-Up Regulation Mechanisms. *Biological Control*, 59: 158-170.
- Aguilar-Fenollosa, E; Ibáñez-Gual, MV; Pascual-Ruiz, S; Hurtado, M y Jacas JA. 2011b. Effect of Ground-Cover Management on Spider Mites and their Phytoseiid Natural Enemies in Clementine Mandarin Orchards (II): Top-Down Regulation Mechanisms. *Biological Control*, 59: 171-179.
- Aguilar-Fenollosa E., Pascual-Ruiz S., Hurtado M.A. y Jacas J.A. 2011c. Efficacy and economics of ground-cover management as a conservation biological control strategy against *Tetranychus urticae* in clementine mandarin orchards. *Crop Protection* 30: 1328-1333.
- Aguilar-Fenollosa, E; Pascual-Ruiz, S; Hurtado-Ruiz, MA y Jacas, JA. 2011d. Efficacy and economics of groundcover management as a conservation biological control strategy against *Tetranychus urticae* in clementine mandarin orchards. *Crop. Prot.*, 30 (10): 1328-1333.
- Aguilar-Fenollosa E., Pina, T.,Gómez-Martínez, M.A. Hurtado M.A. y Jacas J.A. 2012 Does host adaptation of *Tetranychus urticae* populations in clementine orchards with a *Festuca arundinacea* cover contribute to a better natural regulation of this pest mite?. *Entomologia Experimentalis et applicata*. 144: 181–190.
- Agustí M. 2000. Citricultura. Mundi-Prensa (Eds.), Madrid, España: 422pp
- Agustí, M; Almela, V y Pons, J. 1992. Effects of girdling on alternate bearing in citrus. *J. Hortic. Sci.*, 67: 203–210.
- Agustí N, Vicente de MC y Gabarra R. 1999. Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new PCR-based technique for predator gut analysis. *Molecular Ecology*, 8: 1467–1474.
- Agustí N, de Vicente, MC y Gabarra, R. 2000. Developing SCAR markers to study predation on *Trialeurodes vaporariorum*. *Insect Molecular Biology*, 9: 263-268.

- Alston, GD. 1994. Effect of apple orchard floor vegetation on density and dispersal of phytophagous and predaceous mites in Utah. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 50: 73-84.
- Anderson, DL y Trueman, JWH. 2000. *Varroa Jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.*, 24: 165-189.
- Anon. 1991. Integrated pest management for citrus. 2<sup>nd</sup> Ed. University of California-Statewide IPM Project. Division of Agriculture and Natural Resources. Oakland, EEUU.
- Anon. 2000. Estadística agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España.
- Anon. 2006. Instituto nacional de meteorología. Valores climatológicos normales: Castellón (Almazora). Disponible en: <http://www.imn.es> [Último acceso: 28 octubre 2012]
- Ansaloni, T; Aucejo, S y Jacas, JA. 2007. Estimating the intrinsic rate of increase of *Tetranychus urticae*: which is the minimum number of immature individuals to consider? *Exp. Appl. Acarol.*, 41: 55-59.
- Ansaloni, T; Pascual-Ruiz, S; Hurtado, M y Jacas, JA. 2008. Can summer and fall vegetative growth regulate the incidence of *Tetranychus urticae* Koch on clementine fruit? *Crop. Prot.*, 27: 459-464.
- Aucejo, S. 2005. Manejo Integrado de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) en clementinos: agregación, dinámica e influencia del estado nutricional de la planta huésped. Tesis Doctoral. Departamento de Ecosistemas Agroforestales. ETSIA. Universidad Politécnica de Valencia.
- Aucejo, S; Foó, M; Gimeno, E; Gómez-Cadenas, A; Monfort, R; Obiol, F; Prades, E; Ramis, M; Ripollés, JL; Tirado, V; Zaragoza, L; Jacas, JA y Martínez-Ferrer, MT. 2003. Management of *Tetranychus urticae* in citrus in Spain: acarofauna associated to weeds. *Integrated Control in Citrus Fruit Crops OILB/SROP*, Bull. 26: 213-220.
- Aucejo-Romero, S; Gómez-Cadenas, A y Jacas-Miret, JA. 2004. Effects of NaCl stressed citrus plants on life-history parameters of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.*, 33: 55-68.

- Augustinos, A; Stratikopoulos, E; Drosopoulou, E; Kakani, E y Mavragani-Tsipidou, P. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers from the olive fly, *Bactrocera oleae*, and their cross-species amplification in the Tephritidae family. BMC Genomics, 9: 618.
- Agustí, N.; T.R. Unruh Y S.C. Welter. 2003a. Detecting *Cacopsylla pyricola* (Hemiptera: Psyllidae) in predator guts by using COI mitochondrial markers. Bull. Entomol. Res. 93: 179-185.
- Agustí, N.; S.P. Shayler, J.D. Harwood, I.P. Vaughan, K.D. Sunderland YW.O.C. Symondson. 2003b. Collembola as alternative prey sustaining spiders in arable ecosystems: prey detection within predators using molecular markers. Mol. Ecol. 12: 3467-3475.
- Avise, JC. 2000. Phylogeography: the History and Formation of Species. Harvard University Press. Massachusetts, EEUU: 447 pp.
- Avise, JC. 2004. Molecular Markers, Natural History and Evolution, 2<sup>nd</sup> Ed. Sinauer Associates. Massachusetts EEUU: 684 pp.
- Badii, MH y McMurtry, JA. 1984. Life-History of and life table parameters for *Phytoseiulus longipes* with comparative studies on *Phytoseiulus persimilis* and *Typhlodromus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae). Acarol., 25: 111-123
- Bailly, X; Migeon, A y Navajas, M. 2004. Analysis of microsatellite variation in the spider mite *Tetranychus turkestanii* (Acari: Tetranychidae) reveals population genetic structure and raises questions about related ecological factors. Biological Journal of the Linnean Society, 82: 69-78.
- Baker, ED y Tuttle, DM. 1994. A guide to Spider Mites (Tetranychidae) from the United States. Indira Publishing House. Michigan, EEUU: 347pp.
- Barbosa, P. 1998. Conservation Biological Control. Barbosa, P (Ed.). Elsevier. Academic Press. California, EEUU: 396 pp.
- Bech, N; Novoa, C; Allieenne, JF y Boissier, J. 2010. Transferability of Microsatellite markers among economically and ecologically important galliform birds. Gen. Mol. Res., 9 (2):1121-1129.

- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. 1996-2004 GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France). Disponible en: <http://kimura.univ-montp2.fr/genetix/> [Último acceso: 20 enero 2012]
- Bellés, X. 2010. Beyond Drosophila: RNAi. In vivo and functional genomics in Insects. *Annu. Rev. Entomol*, 55: 111-28.
- Behura, SK. 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Mol. Ecolaboradores*, 15: 3087-3113.
- Ben-David, T; Melamed, S y Gerson, U. 2007. ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari:Tetranychidae) *Exp. Appl. Acarol.*, 41:169-181.
- Black, WC. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Mol. Biol.*, 2: 1-6.
- Black, WC y Piesman, J. 1994. Phylogeny of hard and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S ribosomal DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91: 10034-10038.
- Black WC, Klompen JSH y Keirans JE. 1997. Phylogenetic relationships among thick subfamilies (Ixodida: Ixodidae : Argasidae) based on the 18S nuclear rDNA gene. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 7: 129-144.
- Boecklen, W. J. and Howard, D. J. (1997). Genetic analysis of hybrid zones: Numbers of markers and power of resolution. *Ecology* 78:2611-2616.
- BOGAS. 2011. Bioinformatics Gent Online Genome Annotation Service. 2011. Disponible: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/bogas/overview/Tetur> [Último acceso: 28 octubre 2012]
- BOE. 2012. Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios. *Boletín Oficial del Estado*, 223: 65127- 65171. Disponible: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/bogas/> [Último acceso: 28 octubre 2012]

- Bollanad, HR; Gutierrez, J y Flechtmann, CHW .1998. World Catalogue of Spider Mite Family (Acari: Tetranychidae). Koninklijke Brill NV, Leiden, Holanda: 392 pp.
- Boller, EF; Avila, J; Gendrier, JP; Jorge, E y Malavolta, C. 1998. Integrated production in Europe 20 years after the declaration of Ovrannaz. OILB/WPRS. Bull. 21:1-41.
- Boller, EF; El Titi, A; Gendrier, JP; Avilla, J; Jörg, E y Malavolta, C. 1999. Integrated Production. Principles and technical guides. OILB/WPRS. Bull. 22: 29 pp.
- Boore, JL. 2006. The use of genome-level characters for phylogenetic reconstruction. Trends Ecolaboradores Evol., 21: 439-446.
- Bordeaux, HB y Dosse, G. 1963. Concerning the names of some common spider mite. Advances in Acarology, 1: 350-64.
- Boubou, A; Migeon, A; Roderik, GK y Navajas, M. 2010. Recent emergence and worldwide spread of the red tomato spider mite, *Tetranychus evansi*: genetic variation and multiple cryptic invasions. Biol. Invasions, 13 (1): 81-92.
- Boutla A, Delidakis C y Tabler M. 2003. Developmental defects by antisense-mediated inactivation of micro-RNAs 2 and 13 in *Drosophila* and the identification of putative target genes. Nucleic Acids Research, 31: 4973-4980.
- Brandenburg, RL y Kennedy, GG. 1981. Differences in dorsal integumentary lobe densities between *Tetranychus urticae* Koch and *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acarina: Tetranychidae). Indian. J. Acar., 1: 231-234.
- Breene, RG; Sweet, MH y Olson, JK. 1990. Analysis of the gut contents of Naiads of *Enallagma civile* (Odonata, Coenagrionidae) from Texas pond. J. Am. Mosq. Control Assoc., 6: 547-548.
- Breeuwer, JAJ. 1997. *Wolbachia* and cytoplasmatic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestanii*. Heredity, 79: 41-47.
- Brewer, JAJ y Jacobs, G. 1996. Wolbachia: intracellular manipulations of mite reproduction. Exp. Appl. Acarol., 20: 421-434.
- Brewer, JAJ y Werren, JH. 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. Nature, 346: 558-60.



- Breeuwer, JAJ; Stouthamer, R; Barns, SM; Pelletier, DA; Weisburg, WG y Werren, JH. 1992. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect. Mol. Biol.*, 1: 25-36.
- Bund, CF van, y Helle, W. 1960. Investigation of the *Tetranychus urticae* complex in north west Europe (Acari: Tetranychidae). *Entomologia experimentalis and applicata*, 3: 142-156.
- Canales-Aguirre, CB; Ferrada, S; Hernández, CE; Galleguillos, R. 2010. Usefulness of heterologous microsatellites obtained from *Genipterus blacodes* (Schneider) in species *Genipterus* off the Southeast Pacific. *Gayana*, 74 (1): 74-77.
- Carbonelle, S; Hance, T; Migeon, A; Baret, P; Cros-Arteil, S y Navajas, M .2007. Microsatellit markers reveal spatial genetic structure of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations along a latitudinal gradient in Europe. *Exp. Appl. Acarol*, 41: 225-241.
- Castagnoli, M. y Simoni, S. 2003. *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari Phytoseiidae): survey of biological and behavioural traits of a versatile predator. *Redia*, 86: 153-164
- Cavalloro, R y Prota, R. 1983. Integrated control in citrus orchards: sampling methodology and thresholds for intervention against the principal phytophagous pests. Commission of the European Communities. Brussels-Luxembourg, Belgium: 64 pp
- CBOL. 2003. Consortium for the Barcoding of Life. Disponible: <http://www.barcodeoflife.org/> [Último acceso: 28 octubre 2012]
- Cheng, TC; Xia, QY; Qian, JF; Liu, C; Lin, Y; Zha, XF y Xiang, ZH. 2004. Meaning single nucleotide polymorphisms from EST data of silkworm, *Bombix mori*, inbred strain Dazao. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 523-530.
- Clancy, DJ y Hoffmann, AA. 1996. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: evolving complexity. *Trends Ecolaboradores Syst.*, 11: 145-146.
- Comunidad Valenciana. 2008. Dirección General de Investigación y Tecnología Agroalimentaria. Normas para la producción integrada en cítricos en la Comunidad Valenciana. Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación,

5901: 88055-88096. Disponible:  
[http://www.docv.gva.es/datos/2008/11/26/pdf/2008\\_13692.pdf](http://www.docv.gva.es/datos/2008/11/26/pdf/2008_13692.pdf) [Último Acceso:  
28 octubre 2012].

- Cranham, JE y Helle, W. 1985. Pesticide resistance in Tetranychidae. En: Spider mites, their biology, natural enemies and control (Vol. 1B). Helle, W and Sabelis, MW (Eds.). Elsevier. Amsterdam, Holanda: 458 pp.
- Croft, BA. 1975. Integrated control of apple mites. Mich. State Univ. Corp. Ext. Serv. Bull. E825: 12pp.
- Croft, BA. 1976. Establishing insecticide-resistant phytoseiid mite predators in deciduous tree fruit orchards. *Entomophaga*, 21 (4): 383-399.
- Crosbie, PR; Boyce, WM y Rodwell, TC. 1998. DNA sequence variation in *Dermacentor hunteri* and estimated phylogenies of *Dermacentor* spp. (Acari: Ixodidae) in the New World. *J. Med. Entomol.*, 35: 277-288.
- Deh-ne, HW y Schonbeck, F. 1994. Crop protection past and present. En: Crop production and Crop protection. OERKE EC Elsevier (Eds.). Amsterdam, Holanda: 45-71.
- Delaye, C; Aeschlimann, A; Renaud, F; Rosenthal, B y De Meeus, T. 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the *Ixodes ricinus* complex (Acari: Ixodidae). *Mol. Ecolaboradores*, 7: 357-363.
- De Mendonça, RS; Navia, D; Diniz, IR; Auger, P y Navajas, M .2011. A critical review on some closely related species of *Tetranychus* sensu stricto (Acari: Tetranychidae) in the public DNA sequences databases. *Exp. Appl. Acarol.*, 55 (1): 1-23.
- Dent, D. 1991. *Insect Pest Management*. CAB International. Reino Unido.
- Dermauw, W; Vanholme, B; Tirry, L y Leeuwen, T van. 2010. Mitochondrial genome analysis of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* and a revisit of the *Metaseiulus occidentalis* mitochondrial genome. *Genome*, 53: 285-301.
- Dobson, SJ y Barrer, SC. 1999. Phylogeny of the hard ticks (Ixodidae) inferred from 18S rDNA indicates that the genus *Aponomma* is paraphyletic. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 11: 288-295.

- Dowling, TE; Moritz, C; Palmer, JD y Rieseberg, LH. 1996. Nucleic Acids III: analysis of fragments and restriction sites. En: Hillis, DL; Moritz, C and Mable BK (Eds.). Molecular Systematics. Sinauer associates. Massachussets, EEUU: 655 pp.
- Dupont, LM. 1979. On gene flow between *Tetranychus urticae* Koch, 1936 and *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) Bordeaux, 1956 (Acari: Tetranychidae): synonymy between the two species. Ent. Exp. and Appl., 25: 297-303.
- Edwards, OR; Melo, EL; Smith, L y Hoy, MA. 1997. Discrimination of three *Typhlodromus* species (Acari: Phytoseiidae) using random amplified polymorphic DNA markers. Exp. Appl. Acarol., 21: 101-109.
- Ehara, S. 1993. Plant mites of Japan in colors. Tokyo, Zenkoku Noson Kyoiku, Kyoai. 298 pp. (En Japonés).
- Escudero, LA y Ferragut, F. 1996. Comportamiento de *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot y *Neoseiulus californicus* (McGregor) (acari:Phytoseiidae) ante diferentes densidades de presa. Bol. San. Veg. Plagas, 22: 115-124.
- Escudero, LA y Ferragut, F. 1998. Comunidad de ácaros del ecosistema hortícola mediterráneo: composición y distribución geográfica. Bol. San. Veg. Plagas., 24: 749-762.
- Evans JD (2000) Microsatellite loci in the honey bee parasitic mite *Barroa jacobsoni*. Mol. Ecolaboradores, 9:1433-1449.
- FAOSTAT. 2012. Food and agriculture Organization of the United Nations. Disponible: <http://faostat3.fao.org/home/index.html> [Último acceso: 28 octubre 2012].
- Ferragut F y Santonja MC. 1989. Taxonomía y distribución de los ácaros del género *Tetranychus* Dufour 1832 (Acari: Tetranychidae), en España. Bol. San. Veg. Plagas, 15: 271-281.
- Ferragut, F; Costa-Comelles, J; García-Marí, F; Laborda, R; Roca, D y Marzal, L. 1987. Influence of food and temperature on development and oviposition of *Euseius stipulatus* and *Typhlodromus phialatus* (Acari: Phytoseiidae). Exp. App. Acarol., 3:317-329.
- Ferragut, F; Costa-Comelles, J; García-Marí, F; Laborda, R; Roca, D y Marzal, C. 1988. Dinámica poblacional del fitoseido *Euseius stipulatus* (Athis-Henriot) y

su presa *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Phytoseidae, Tetranychidae), en los cítricos españoles. Bol. San. Veg. Plagas, 14: 45-54.

Ferragut, F; García-Marí, F y Marzal, C. 1983. Determinación y abundancia de los fitoseidos (Acari: Phytoseiidae) en los agrios españoles. Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas. Acta I del Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas: 299-308.

Ferragut, F; Pérez-Moreno, I; Iraola, V y Escudero, A. 2010. Ácaros depredadores en las plantas cultivadas, familia Phytoseiidae. Ediciones Agrotécnicas, Madrid, España: 202 pp.

Field, LM; Devonshire, AL y Forde, G. 1988. Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. Biochemical Journal, 251: 309-312.

Flexner, JL; Westigard, PH; Gonzalves, P y Hilton, R. 1991. The effect of ground cover and herbicide treatment on twospotted spider mite density and dispersal in southern Oregon pear orchards. Entomol. Exp. Appl., 60:111-123.

Fournier, D; Bridge, JM y Navajas, M.1994 Mitochondrial DNA from a spider mite: isolation, restriction map and partial sequence of the cytochrome oxidase subunit I gene. Genetica, 1994 (1): 73-5.

Fry, JD.1989. Evolutionary adaptation to host plants in a laboratory population of the phytophagous mite *Tetranychus urticae* Koch. Oecologia 81: 559-565

Fry, JD. 1992. On the maintenance of genetic variation by disruptive selection among hosts in a phytophagous mite. Evolution, 46: 279-283.

Frohlich, DR; Torres-Jerez, I; Bedford, ID; Markham, PG y Brown, JK. 1999. A phyllogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. Mol. Ecolaboradores, 8: 1683-1691.

García-Marí, F y Ferragut, F. 2002. Los Ácaros. En: García-Marí, F y Ferragut, F (Eds.). Plagas Agrícolas. Phytoma-España S.L. Valencia, España: 19-52.

García-Marí, F; Costa-Comelles, J y Ferragut, F. 1994. Las Plagas Agrícolas. Phytoma España S. L. Madrid, España: 376 pp.

- García-Marí, F; Ferragut, F; Marzal, C; Costa-Comelles, J y Laborda, R. 1986a. Ácaros que viven en las hojas de los cítricos españoles. *Inv. Agr. : Prod. Prot. Veg*, 1: 219-250.
- García-Marí, F; Ferragut, F; Marzal, C; Costa-Comelles, J y Laborda, R. 1986b. Ácaros de las plantas cultivadas y su control biológico. Ediciones Pisa, Alicante, España: 175 pp.
- García-Marí, F; Laborda, R; Costa-Comelles, J; Ferragut, F y Marzal, C. 1985. Ácaros fitófagos y depredadores en nuestros cítricos. *Cuadernos de Fitopatología*, 2: 54-63.
- García-Marí, F; Llorens, JM; Costa-Comelles, J y Ferragut, F. 1991. Ácaros de las plantas cultivadas y su control biológico. Ediciones Pisa. Alicante, España.
- Garrido, A y Ventura, JJ. 1993. Plagas de los cítricos. Bases para el manejo integrado. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid: 183 pp.
- Generalitat de Catalunya. 2012. Norma técnica per a la producció integrada de cítrics. Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural. Disponible:  
[http://www20.gencat.cat/docs/DAR/AG\\_Agricultura/AG03\\_Produccio\\_integrada/Documents/Normes\\_tecniques\\_produccio/2012-SEM1/Fitxers\\_estatics/110412-CITRICS-Norma-annexos.pdf](http://www20.gencat.cat/docs/DAR/AG_Agricultura/AG03_Produccio_integrada/Documents/Normes_tecniques_produccio/2012-SEM1/Fitxers_estatics/110412-CITRICS-Norma-annexos.pdf) [Último Acceso: 19 octubre 2012].
- Generalitat Valenciana. 2008. Normes per a la producció integrada de cítrics en el àmbit de la Comunitat Valenciana. Diari Oficial de la Generalitat Valenciana 5901: 88055-88096. Disponible:  
[http://www.docv.gva.es/datos/2008/11/26/pdf/2008\\_13692.pdf](http://www.docv.gva.es/datos/2008/11/26/pdf/2008_13692.pdf) [Último Acceso: 19 octubre 2012].
- Generalitat Valenciana, 2012. Efectos secundarios de pñaguicidas sobre fauna útil en cítricos. Disponible: <http://gipcitricos.ivia.es/wp-content/uploads/2012/09/Efectos-seundarios1sin-poli.pdf> [Último acceso: 2 noviembre 2012].
- Goldstein, D.B. y Shlötterer, C. 1999. *Microsatellites, evolution and applications*. Oxford University Press, New York.

- Gerson, U. 2003. Acarine pest of citrus: overview and non-chemical control. *Syst. App. Acarol.*, 8: 3-12.
- Gotoh, T; Araki, R; Boubou, A; Migeon, A; Ferragut, F y Navajas, M. 2009. Evidence of co-specificity between *Tetranychus evansi* and *Tetranychus takafujii* (Acari: Prostigmata, Tetranychidae): comments on taxonomic and agricultural aspects. *Int. J. Acarol.*, 35 (6): 485-501.
- Gotoh, T; Yamaguchi, K y Mori, K. 2004. Effect of the temperature on life history of the predatory mite *Amblyseius (Neoseiulus) californicus* (Acari: Phytoseiidae). *Exp. App. Acarol.*, 32: 15-30.
- Grbíć, M; Leeuwen van, T; Clark RM et al. 2011. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature*, 479: 487-479.
- Gould, F .1979. Rapid host range evolution in a population of the phytophagous mite *Tetranychus urticae* Koch. *Evolution*, 33: 791-802.
- Gutiérrez J. 1985. Mounting Techniques in Spider Mites: Their Biology, Natural Enemies and Control. Vol. 1A. Helle, W and Sabelis M (Eds.). Elsevier Science Publishers. Amsterdam, Holanda: 351-353.
- Gutiérrez, J y Schicha, E. 1983. The spider mite family Tetranychidae (Acari) in New South Wales. *Internat. J. Acarol.*, 9 (3): 99-116.
- Hale, ML; Burg, TM; Steeves, TE. 2012. Sampling for Microsatellite-Based Population Genetic Studies: 25 to 30 Individuals per Population Is Enough to Accurately Estimate Allele Frequencies. *PLoS ONE* 7(9): e45170.
- Hamada, H y Kakunaga, T. 1982. Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature*, 298: 396-398.
- Hare, JD. 1994. Sampling arthropod pests in citrus. En: Handbook of sampling methods for arthropods in Agriculture. Pedigo, LP and Buntin, GD (Eds.). CRC Press. Florida, EEUU: 417-431 pp.
- Harper, CR. 1991. Predatory-prey systems in pest management. *North-eastern Journal of Agricultural and Resource Economics*, 20 (1): 15-23.
- Hazan, A; Gerson, U y Tahori, AS.1975. Spider mite webbing II. The effect of webbing on egg hatchability. *Acarologia*, 6: 270-273.

- Helle, W. y Pijnacker, LP. 1985. Parthenogenesis, Chromosomes and sex. En: Spider mites. Their biology, natural enemies and control. Vol 1A. Helle, W and Sabelis, MW (Eds.). Elsevier, Netherlands. Amsterdam, Holanda: 129-139.
- Helle, W y Sabelis, MW. 1985. World crop pests. En: Spider mites: their biology, natural enemies and control. Vol 1B. Helle, W and Sabelis, MW (Eds.). Elsevier. Amsterdam, Holanda: 90 pp
- Herbert, PDN; Cywinska, A; Ball, SL; y deWaard, JR. 2003. Biological identification through DNA barcodes. Proc. R. Soc. London, 270: 313-322.
- Hermoso de Mendoza, A; Arouni, R; Benlliure, B; Carbonell, A y Pérez-Panadés, J. 2004. Umbrales económicos de tratamiento contra *Aphis spiraecola* (Hemiptera: Aphididae) en clementinos. Bol. San. Veg., 30: 287-298.
- Hillis, DM y Dixon, MT. 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. Quart. Rev. Biol., 66: 411-429.
- Hillis, DM; Mable, BK; Larson, A; Davis, SK y Zimmer EA. 1996. Nucleic Acids IV: sequencing and cloning. En: Hillis, DM; Moritz, C y Mable, BK (Eds.). Molecular Systematics. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, EEUU: 655 pp.
- Hmimina. M; Allam, L; Ougass, Y y Marmouche, A. 1995. Circonstances des pullulations de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) en verger d'agrumes. Bull. OILB/WPRS, 18 (5): 28-35.
- Hinomoto, N; Osakabe, M; Gotoh, T y Takafuji, A. 2001. Phylogenetic analysis of green and red forms of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), in Japan, based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I sequences. Appl. Entomol. Zool., 36: 459-464.
- Hinomoto, N y Maeda, T. 2005. Isolation of Microsatellite Markers in *Neoseiulus womersleyi* Schicha (Acari: Phytoseiidae). J. Acarol. Soc. Jpn., 14(1):25-30.
- Hinomoto, N y Takafuji, A. 2001. Genetic diversity and phylogeny of the Kanazawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* in Japan. Exp. Appl. Acarol, 25: 355-370.
- Hinomoto, N; Todokoro, Y y Higaki, T. 2010. Population structure of the predatory mite *Neoseiulus womersleyi* in a tea field based on an analysis of microsatellite DNA markers. Exp. Appl. Acarol., 53: 1-15.

- Hinomoto, N; Todokoro, Y y Higaki, T. 2011. Population structure of the predatory mite *Neoseiulus womersleyi* in tea field based on an analysis of microsatellite DNA markers. *Exp. Appl. Acarol.*, 53(1):1-15.
- Hoogendoorn, M. Y G.E. Heimpel. 2001. PCR-based gut content analysis of insect predators: using ribosomal ITS-1 fragments from prey to estimate predation frequency. *Mol. Ecol.* 10: 2059-2067.
- Hoy, MA. 2003. *Insect Molecular Genetics*. Academic Press. Hoy MA (Ed.) Elsevier. California, EEUU.
- Hoyt, SC; Westigard, PH y Croft, BA. 1985. Cyhexatin resistance in Oregon populations of *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 78: 656-659.
- Huffaker, CB; Vrie van de, M y McMurtry, JA. 1969. The ecology of tetranychid mites and their natural control. *Annual Review of Entomology*, 14: 125-174.
- Hurst, GD y Jiggins, FM. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceeding of Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 272: 1525-1534.
- Hurtado, M; Agustí, N y Sabater-Muñoz, B. 2008a. Aplicación de Tecnologías Moleculares al Control Biológico de plagas. En: *Control Biológico de Plagas Agrícolas*. Jacas, JA y Urbaneja, A. (Eds.). Phytoma. Valencia, España: 453-468.
- Hurtado, MA; Ansaloni, T; Cros-Arteil, S; Jacas, JA y Navajas, M. 2008b. Sequence analysis of the ribosomal internal transcribed spacers región in spider mites (Prostigmata: Tetranychidae) occurring in citrus orchards in Eastern Spain: use for species discrimination. *Ann. Appl. Biol.*, 153: 167-174.
- Hurtado, MA; Ansaloni, T; Jacas, JA y Navajas, M. 2008c. Structure of *Tetranychus urticae* (Acari: Prostigmata) populations occurring in Spanish clementine orchards (*Citrus reticulata* Blanco) and its relevance for pest management. *IOBC wprs Bulletin. OILB srop.*, 38: 243.
- IRAC Insecticide Resistance Action Committee. [www.irc-online.org](http://www.irc-online.org) IRAC MoA Classification Scheme. Febrero 2012.



IRAC, 2011. Clasificación del modo de acción de Insecticidas y Acaricidas. Disponible: [http://www.ircac-online.org/content/uploads/2009/12/modo\\_de\\_accion\\_Oct11.pdf](http://www.ircac-online.org/content/uploads/2009/12/modo_de_accion_Oct11.pdf) [Último acceso: 2 noviembre 2012].

Ishiwata, K; Sasaki, G; Ogawa, J; Miyata, T; Su, ZH. 2011. Phylogenetic relationships among insect orders based on three nuclear protein-coding gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 58(2):169-80.

Jacas, J y García-Marí, F. 2001. Side-effects of pesticides on selected natural enemies occurring in Spain. *Integrated Control in Citrus Fruit Crops. IOBC/WPRS, Bull.* 24: 103-112.

Jacas, JA y Urbaneja, A. 2010. Biological control in citrus in Spain: from classical to conservation biological control. En: *Integrated Management of Arthropods Pests and Insect Borne Diseases. Vol 5. Ciancino, A and Mukerji, KG (Eds.)*. Springer Netherlands. Dordrecht, Holanda: 57-68.

Jacas, JA; Gómez, A; Urbaneja, A. 2001. Situación actual del manejo de plagas en cítricos. *Vida Rural*, 131: 33-36 pp.

Jacas, JA; Karamaouna, F; Vercher, R y Zappalà, L. 2010. Citrus pest management in the Northern Mediterranean Basin: Spain, Italy and Greece. En: *Integrated Management of Arthropods Pests and Insect Borne Diseases. Vol 5. Ciancino, A and Mukerji, KG (Eds.)*. Springer Netherlands. Dordrecht, Holanda: 3-26.

Jarne y Lagoda, 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecolaboradores Evol.* 11: 424-429.

Jervis, MA. 2005. *Insects as natural enemies: A practical perspective*. Jervis MA (Ed.). Springer. Dordrecht, Holanda: 750 pp.

Jeppson, JR; Baker, ER y Keifer, HH. 1975. *Mites injurious to economic plants*. University of California Press. California, EEUU: 614 pp

Jeyaprakash, A y Hoy, MA. 2002. Mitochondrial 12S rRNA sequences used to design a molecular ladder assay to identify six commercially available phytoseiids (Acari: Phytoseiidae). *Biological Control*, 25: 136-142.

- Jeyaprakash, A y Hoy, MA. 2009. The nuclear genome of the phytoseiid *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) is among the smallest known in arthropods. *Exp. Appl. Acarol.*, 47: 263-273.
- Johanowicz, DL y Hoy, MA. 1995. Molecular evidence for *A-Wolbachia* endocytobiont in the predatory mite *Metaseiulus occidentalis*. *Ann. Ent. Soc. Am.*, 89: 435-441.
- Jordaan, LC .1977. Hibridization Studies on the *Tetranychus cinnabarinus* complex in South Africa (Acari: Tetranychidae). *Journal of Entomological Society of South Africa*, 40: 147-156.
- Juan-Blasco, M; Verdú, MJ y Urbaneja, A. 2008. Depredación del piojo rojo de California, *Aonidiella aurantii* (Maskell), por fitoseidos depredadores. *Bol. San. Veg. Plagas*, 34: 187-199.
- Karamaouna, F; Pascual-Ruiz, S; Aguilar-Fenollosa, E; Verdú, MJ; Urbaneja, A y Jacas, JA. 2010. Changes in predation and parasitism of the citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) populations in Spain following establishment of *Citrostichus phyllocnistoides* (Hymenoptera: Eulophidae). *Biological Control*, 52 (1): 37:45.
- Koch, CL.1836. *Deutsche Crustaca, Myriapoda, Arachnida*, Fasc. I.
- Kuang, H y Cheng, L. 1990. Studies of differentiation between two sibling species: *Tetranychus cinnabarinus* and *T. urticae*. *Acta Entomologica Sinica*, 33: 109-115. (En Chino).
- Leeuwen van, T; Vanholme, B; Pottelberge, S van; Nieuwenhuysse, P van; Nauen, R; Tirry, L y Denholm, I. 2008. Mitochondrial heteroplasmy and the evolution of insecticide resistance: non-Mendelian inheritance in action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105 (16): 5980-5985.
- Leeuwen van, T; Vontas, J; Tsagkarakou, A; Dermauw, W y Thierry. 2009. Mechanisms of acaricide resistance in the Two-Spotted spider mite *Tetranychus urticae*. En: *Biorrational Control of Arthropod Pests*, Ishaaya and A.R. Horowitz (Eds.): 347-393.

- Leng, L y Zhang, DE. 2011. Measuring population differentiation using GST or D? A simulation study with microsatellite DNA markers under a finite island model and nonequilibrium conditions. *Mol. Ecol.* 20 (12): 2494-509.
- Lenteren, JC van. 1994. Biologically based crop protection: The approach for the 21<sup>st</sup> century. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen. Univ. Gent. Holanda*, 59 (2): 163-169.
- Lenteren, JC van. 2001. A greenhouse without pesticides: fact or fantasy? *Crop. Prot.*, 19: 375-384.
- Li, T; Chen, XL y Hong, XY. 2009. Population genetic structure of *Tetranychus urticae* and its sibling Species *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) in China as inferred from microsatellite data. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 102 (4): 674-683.
- Loxdale, HD y Lushai, G. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*, 88: 577-600.
- Lucas, JA. 2010. Advances in plant disease and pest management. *Journal of Agricultural Science*. 24 pp. doi:10.1017/S002185961000097.
- Litt, M y Luty, JM. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44: 397-401.
- Lunt, DH; Hutchinson, WF y Carvalho, GR. 1999. An efficient method for PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Molecular Ecology*, 8: 891-893.
- Luque, C; Legal, L; Staudter, H et al. 2002. ISSR (inter simple sequence repeats) as genetic markers in noctuids (Lepidoptera). *Hereditas*, 136: 251-253.
- Maddison, DR; Schulz, KS y Maddison, WP. 2007. The Tree of Life Web Project. Pages: 19-40. En: Zhang, ZQ and Shear, WA (Eds.). *Linneaus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy. Zootaxa*, 1668: 1-766.
- Magaña, C; Hernández-Crespo, P; Ortego, F y Castañera, P. 2007. Resistance to malathion in field populations of *Ceratitis capitata*. *Journal of Economic Entomology*, 100: 1836-1843.

Magaña, C; Hernández-Crespo, P; Brun-Barale, A; Couso-Ferrer, F; Bride, JM; Castañera, P; Feyereisen R y Ortego, F. 2008. Mechanisms of resistance to malathion in the medfly *Ceratitis capitata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 756-762.

MAGRAMA. 2004. ORDEN APA/1657/2004, de 31 de mayo, por la que se establece la norma técnica específica de la identificación de garantía nacional de producción integrada de cítricos. Boletín Oficial del Estado 137: 20684-20747. Disponible:  
[http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/legislacion/Citricos\\_tcm7-1272.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/legislacion/Citricos_tcm7-1272.pdf)  
[Último acceso: 28 octubre 2012]

MAGRAMA. 2012. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Registro de Productos Fitosanitarios. Disponible:  
<http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/medios-de-produccion/productos-fitosanitarios/fitos.asp> [Último acceso: 2 noviembre 2012]

Mallet, J y Willmot, K. 2003. Taxonomy: renaissance or tower of Babel? *Trends in Ecology and Evolution*, 18 (2): 57-59.

Manson, DCM. 1967. The spider mite family Tetranychidae in New Zealand. II. The genus *Tetranychus*. *Acarologia*, 9 (3): 76-123.

Martínez-Ferrer, MT; Jacas, JA y Ripollés, JL. 2004. La araña roja *Tetranychus urticae*: métodos de muestreo y umbrales económicos de tratamiento en cítricos. *Phytoma España*, 164: 53-58.

Martínez-Ferrer, MT; Jacas-Miret, JA; Ripollés-Moles, JL y Aucejo-Romero, S. 2006a. Approaches for sampling the twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) on clementines in Spain. *J. Econ. Entomol.*, 99:1490-1499.

Martínez-Ferrer, MT; Jacas-Miret, JA; Ripollés-Moles, JL y Aucejo-Romero, S. 2006b. Sampling plans for *Tetranychus urticae* (Acari:Tetranychidae) for IPM decisions on clementines in Spain. *Integrated Control in Citrus Fruit Crops. IOBC/WPRS, Bull 29*: 51.

McEnroe, WD y Lakocy, A. 1969. The development of Pentac resistance in an outcrossing swarm of the two-spotted spider mite. *J. of Econ. Entomol.*, 62 (2): 283-286.

McLean 2009 Academy Publish

McMurtry, JA. 1977. Some predaceous mites (Phytoseiidae) on citrus in the Mediterranean region. *Entomophaga*, 22 (1): 19-60.

McMurtry, JA. 1982. The use of phytoseiids for biological control: progress and future prospects. En: *Recent Advances in Knowledge of the Phytoseiidae*, MA Hoy (Eds.). Univ. Calif. Press. Berkeley, EEUU, 3284: 23-48.

McMurtry, JA. 1985. Citrus. En: *World Crop Pests. Spider mites. Their biology, natural enemies and control*. Vol 1b. Helle, W and. Sabelis MW (Eds.). Elsevier. Amsterdam, Holanda: 339-347.

McMurtry, JA. 1992. Dynamics and potential impact of "generalist" phytoseiids in agroecosystems and possibilities of establishment of exotic species. *Exp. Appl. Acarol.*, 14: 371-382.

McMurtry, JA y Croft, BA. 1997. Life-styles of phytoseiid mites and their role in biological control. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 291-321.

McMurtry, JA y Rodriguez, J. 1987. Nutritional ecology of phytoseiid mites. En: *Nutritional Ecology of Insects, Mites and Spiders*. F. Slansky y J. Rodriguez (Eds.). Nueva York, EEUU: 609-644.

McMurtry, JA; Huffaker, CB y Vrie van de, M. 1970. Ecology of Tetranychid mites and their natural enemies: a review. I. Tetranychid enemies: Their biological characters and the impact of spray practices. *Hilgardia*, 4: 331-390.

Meyer, KP. 1974. A revision of the Tetranychidae of Africa (Acari); with a key to the genera of the World. *Entomology Mem. Dep. Agric. Tech Serv. Repub. S. Afr.*, 36: 291 pp

Migeon M, Ferragut F, Escudero-Colomar LA, Fiaboe K, Knapp M, et al. 2009. Modelling the potential distribution of the invasive tomato red spider mite, *Tetranychus evansi* (Acari:Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology* 48: 199–212.

Mollet, JA y Sevacherian, V. 1984. Effect of temperature and humidity on dorsal lobe densities in *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae). *International Journal of Acarology*, 10: 159-161.

- Moner, J. 1997. Control de ácaros en cítricos. *Levante Agrícola*, 340: 241-250.
- Navajas, M. 1998. Host plant associations in the spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): insights from molecular phylogeography. *Exp. Appl. Acarol.*, 22: 201-214.
- Navajas, M y Boursot, P. 2003. Nuclear ribosomal DNA monophyly versus mitochondrial DNA polyphyly in two closely related mite species: the influence of life history and molecular drive. *Proceedings of the Royal Society of London Series, B. Biological Sciences*, 270: S124-S127.
- Navajas, M y Fenton, B. 2000. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Exp. Appl. Acarol.*, 24: 751-774.
- Navajas, M; Cotton, D; KreiTer, S and Gutierrez, J. 1992. Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): preliminary data on ribosomal DNA sequences. *Exp. Appl. Acarol.*, 15: 211-218.
- Navajas, M; Gutierrez, J y Lagnel, J. 1996. Mitochondrial Cytochrome Oxidase I in tetranychid mites: a comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. *Bulletin of Entomological Research*, 86: 407-417.
- Navajas, M; Lagnel, J; Gutierrez, J y Boursot, P. 1998a. Species wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity*, 80: 742-752.
- Navajas, M; Lagnel, J; Fauvel, G y Moraes de, G. 1999. Sequence variation of ribosomal internal transcribed spacers (ITS) in commercially important Phytoseiidae mites. *Exp. Appl. Acarol.*, 23: 851-859.
- Navajas, M; Perrot-Minnot, MJ; Lagnel, J; Bourse, T y Cornuet, JM. 2002. Genetic structure of a greenhouse population of the spider mite *Tetranychus urticae*: spatio-temporal analysis with microsatellite markers. *Insect Molecular Biology*, 11: 157-165.
- Navajas, M; Thistlewood, HMA; Lagnel, J y Hughes, C. 1998b. Microsatellite sequences are under-represented in two mite genomes. *Insect Molecular Biology*, 7 (3): 249-256.

- Navajas, M; Tsagkarakou, A; Lagnel, J y Pierrot-Minnot, MJ. 2000. Genetic differentiation in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): polymorphism, host races or sibling species? *Exp. Appl. Acarol.*, 24: 365-376.
- NCBI. 2011. Genome Project Report: *Tetranychus urticae* Genome. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=tetranychus%20urticae>. [Último acceso: 28 octubre 2012]
- Nicholls, JA; Fuentes-Utrilla, P; Hayward, A; Melika, G; Csóka, G; Nieves-Aldrey, JL; Pujade-Villar, J; Tavakoli, M; Schönrogge, K y Stone, GN. 2010. Community impacts of anthropogenic disturbance: natural enemies exploit multiple routes in pursuit of invading herbivore hosts. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 322 pp.
- Nishimura, S; Hinomoto, N y Takafuji, A. 2003. Isolation, characterization, inheritance and linkage of microsatellite markers in *Tetranychus kanzawai* (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.*, 31: 93-103.
- Norris, DE; Klompen, JSH y Black IV, WC. 1999. Comparison of the mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA genes in resolving phylogenetic relationships among hard-ticks (Acari: Ixodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 92: 117-129.
- OJEU. 2009. Directive 2009/128/EC of the European parliament of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve sustainable use of pesticides. *Off. J. Eur. Communities: Legis L309*. Bruselas, Bélgica: 71-86.
- Okassa, M; Tixier MS ; Cheval B y Kreiter, S. 2009. Molecular and morphological evidence for new species status within the genus *Euseius* (Acari: Phytoseiidae). *Can. J. Zool.*, 87: 689-698.
- Okassa, M; Tixier, MS y Kreiter, S. 2010. Morphological and molecular diagnostics of *Phytoseiulus persimilis* and *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae). *Exp. App. Acarol.*, 52 (3): 291-303.
- Olivatti, AM; Boni, TA; Silva-Júnior NJ; Resende, LV; Gouveia, FO y Telles, MPC. 2011. Heterologous amplification and characterization of microsatellite markers in the Neotropical fish *Leporinus friderici*. *Genet. Mol. Res.*, 10(3): 1403-1408.

- O'Neill, SL; Giordano, R; Colbert, AME; Karr, TL; y Robertson, HM. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature*, 348: 178-180.
- Osakabe, MH; Hirose, T y Sato, M. 2002. Discrimination of four Japanese *Tetranychus* species (Acari: Tetranychidae) using PCR-RFLP of the inter-transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA. *Appl. Entomol. Zool.*, 37(3): 399-407.
- Overmeer, WPJ. 1985. Rearing and Handling. En: Spider mites: their biology, natural enemies and control. (Vol 1B). Helle, W y Sabellis, MW (Eds.). Elsevier. Amsterdam, Holanda: 161-169.
- Parr, WJ y Hussey, NW. 1960. Further Studies on the reproductive isolation of geographical Straits of the *Tetranychus urticae* complex. *Ent. Exp. and Appl.*, 3: 137-141.
- Parrot, PJ; Hodgkiss, HE y Schoene, WJ. 1906. The Eryophyidae. Part I. The apple and pear mites. *N. Y. Agr. Exp. Sta. Bul.*, 283: 302-03.
- Pascual, A. 2007. Acarofauna de los cítricos en Alicante. Dinámica espacial y temporal de la araña roja *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Tesis Doctoral. Departamento de Ecosistemas Agroforestales. ETSIA. Universidad Politécnica de Valencia.
- Pauchet, Y., Wilkinson, P., van Munster, M., Augustin, S., Pauron, D., French-Constant, R.H. 2009. Pyrosequencing of the midgut transcriptome of the poplar leaf beetle *Chrysomela tremulae* reveals new gene families in Coleoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 39 (5-6): 403-413.
- Pedigo, LP; Hutchins, SH y Higley, LG. 1986. Economic injury levels in theory and practice. *Annu. Rev. Entomol.*, 31: 341-368.
- Pennisi, E. 2012. Gene Researchers Hunt Bargains, Fixer-Uppers. *Science*, 29: 735-736.
- Pérez-Sayas, C; Hurtado, MA; Gómez-Martínez, M; Jacas, JA y Pina, T. 2011. Molecular detection of *Tetranychus* prey in Phytoseiidae predators occurring in citrus by Multiplex PCR. Third Meeting of the IOBC Working Group "International Organization of Biological Control". Integrated Control of Plant-



Feeding Mites IOBC/wprs Bulletin. 13-16 sept 2011. Cesky Krumlov, Republica Checa. ISBN: 978-80-86668-20-8

Perrot-Minnot, M.J; Lagnel, J; Desmarais, E y Navajas, M. 2000. Isolation and characterization by direct amplification of length polymorphisms (DALP) of codominant genetic markers with Mendelian inheritance in *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). Exp. Appl. Acarol., 24: 795-803.

Peterson, RKD y Higley, LG. 2002. Economic decision levels in Encyclopedia of pest management. Pimentel, D (Ed.). CRC Press. New York, EEUU: 228-230.

Pina T, Pérez-Sayas C, Jacas JA y Hurtado-Ruiz, MA. 2011. Optimization of the PCR-Multiplex technique for prev detection in citrus mites. Citrus Working Group "Integrated Control in Citrus Fruit Crops". International Organization of Biological Control. IOBC/wprs Bulletin. Agadir, Marruecos: 62: 99 p.

Pina, T; Argolo, P; Urbaneja, A y Jacas, JA. 2012a. Effect of pollen quality on the efficacy of two different life-style predatory mites against *Tetranychus urticae* in citrus. Biological Control, 61: 176–183.

Pina, T; Verdu, MJ; Urbaneja, A y Sabater-Munoz, B. 2012b. The use of integrative taxonomy in determining species limits in the convergent pupa coloration pattern of Aphytis species. Biological Control, 61 (1): 64-70.

Quirós-González, M. 2000. Phytophagous mite populations in Tahiti lime, *Citrus latifolia*, under induced drought conditions. Exp. Appl. Acarol., 24: 897-940.

Rannala, B. and Mountain, J. L. (1997). Detecting immigration by using multilocus genotypes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94:9197-9201.

Revuelta, L. 2010. Análisis compartivo de la expresión e interferencia génica de dos acetilcolinesterasas en *Blatella germanica* (L) (Dyctioptera blattellidae) y en *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera Chrysomelidae). Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.

Revuelta, L. Piulachs, M.D, Bellés, X., Castañera, P., Ortego, F., Díaz-Ruiz, J.R., Hernández-Crespo, P. y Tenllado, F. 2009. RNAi of ace1 and ace2 in *Blatella germanica* reveals their differential contribution to acetylcholinesterase activity

and sensitivity to insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 41: 795-803.

R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing version 2.14.2. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Disponible: <http://www.R-project.org> [Último acceso: 28 octubre 2012].

Richardson, BJ; Baverstock, PR y Adams, M. 1986. Allozyme electrophoresis. A handbook for animal systematics and population studies. Academic Press. London, Reino Unido: 410 pp.

Ripollés, JL; Marsà, M y Martínez, M. 1995. Desarrollo de un programa de control integrado de las plagas de los cítricos en las comarcas del Baix Ebre-Montsià. *Levante Agrícola*, 332: 232-248.

Robinson, GE; KJ Hackett, KJ; Purcell-Miramontes, M et al. 2011. Creating a buzz about insect genomes. *Science*, 331 (6023):1386.

Roderick, GK. 1996. Geographic structure of insect populations: Gene Flow, Phylogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology*, 41: 325-52.

Roderick, GK. 2004. Tracing the origin of pests and natural enemies: genetic and statistical approaches. En: *Genetics, Evolution, and Biological Control*. Ehler, LE; Sforza, R and Maitelle, T (Eds.). CAB International, Wallingford, Reino Unido:97-112.

Ros, VID y Breeuwer, JAJ. 2007. Spider mite (Acari: Tetranychidae) mitochondrial COI phylogeny reviewed: host plant relationships, phylogeography, reproductive parasites and barcoding. *Exp. Appl. Acarol.* 42:239-262.

Rousset, F; Bouchon, D; Pintureau, B; Juchault, P y Solignac, M. 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. R. Soc. B.*, 250: 91-98.

Rousset, F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecolaboradores Res.*, 8: 103-106.

Rychlik, W. 1992. OLIGO 4.06, Primer Analysis Software. National Biosciences Inc. Publishers. Plymouth, USA

- Sabater-Muñoz, B; Legeai, F; Rispe, C et.al. 2006. Large-scale gene discovery in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera). *Genome Biol.*, 7 (3): R21.
- Sabater-Muñoz, B; Pascual-Ruiz, S; Jacas, JA y Hurtado, MA. 2009. How homogeneous are *Tetranychus urticae* populations in citrus orchards? Preliminary isolation and Characterization of polymorphic microsatellite markers for *T. urticae* (Acari: Prostigmata). Second meeting of the IOBC Work Group "Integrated Control of Plant Feeding Mites". Florencia, Italia, 50: 81pp.
- Sabelis, MW. 1981. Biological control of two-spotted spider mites using phytoseiid predators. Part I: modelling the predator-prey interaction at the individual level. *Agricultural Research Reports*. Wageningen, Holanda: 238-242.
- Sabelis, MW y Afman, BP. 1994. Synomone-induced supresión of take-off in the phytoseiid mite *Phytoseiulus persimilis*. *Exp. Appl. Acarol.*, 18: 711-21.
- Sabelis, MW y Janssen, A. 1994. Evolution of life history patterns in the Phytoseiidae. En: *Mites: Ecological and evolutionary Analyses of Life-History Patterns*. M. A. Houck (Eds.). New York, EEUU: 70-99.
- Sambrook, J; Fritsch, EF y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A Laboratory manual*. Sambrook, J; Fritsch, EF and Maniatis, T (Eds.). Cold Spring Harbor Press, Cold New York, EEUU.
- Sanger, F; Nicklen, S y Coulson, AR. 1977. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.
- Schwemmler, W. 1989. *Insect Endocytobiosis: Morphology, physiology, genetics, evolution*. Schwemmler, W and Gassner, G (Eds.). CRC Press. Florida, EEUU: 288pp
- Silva, IMMS; Meer van, MMM; Roskam, MM; Hoogenboom, A; Gort, G y Stouthamer, R. 2000. Biological control potential of Wolbachia-infected versus uninfected wasps: Laboratory and greenhouse evaluation of *Trichogramma cordubensis* and *T. deion* strains. *Biocontrol Science and Technology*, 10: 223-238.
- Smith, D; Beattie, GAC y Broadley, R. 1997. *Citrus pests and their natural enemies. Integrated pest management in Australia*. Department of Primary Industries. Brisbane, Australia: 272 pp.

- Smith, LM; Fung, S; Hunkapiller, MW; Hunkapiller, TJ y Hood, LE. 1985. The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: Synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Res.*, 13: 2399-2412.
- Smith, PT; Kambhampati, S y Armstrong KA. 2002. Phylogenetic relationships among *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phyl. and Evol.*, 26: 8-17.
- Smith, LM; Sanders, JZ; Kaiser, RJ; Hughes, P; Dodd, C; Connell, CR; Heiner, C; Kent, SB y Hood, LE. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321: 674-679.
- Smith-Meyer, MKP. 1981. Mites pests of crops in Southern Africa. *Repub. S. Afr. Dep. Agric. Tech. Serv., Sci, Bull.*, 397: 1-91.
- Smith-Meyer, MKP. 1987. African Tetranychidae (Acari: Prostigmata) with referente to the world genera. Republic of South Africa Departament of Agriculture and Water Supply. *Entomology Memoir*, 69: 75 pp.
- Söller, R; Wohltmann, A; Witte, H y Blohm, D. 2001. Phylogenetic relationships within terrestrial mites (Acari: Prostigmata, Parasitengona) inferred from comparative DNA sequence analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 18(1): 47-53
- Sonoda, S;Y Kohara, S;gingerile, Toyoshima,S; Kishimoto, H y Hinomoto, Y. 2011. Phytoseiid mite species composition in Japanese peach orchards estimated using quantitative sequencing. *Experimental and Applied Acarology*, 56: 9-22.
- Souliotis, P; Tsagkarakou, A y Nomikou, M. 1997. Field observations and ethoecological aspects of phytoseiid mites in greek citrus groves. *Acarologia*, 38 (1): 29-37.
- Speight, MR; Watt, A y Hunter, M. 2008. *Ecology of insects: Concepts and Applications*. 2<sup>nd</sup> Ed. Blackwell Science, London: 640 pp.
- Staden, R; Beal, KF y Bonfield, JK. 1998. The Staden Package, 1998. En: Misener, S., Krawetz, S.A. (Eds.) *Computer Methods in Molecular Biology*. Vol 132. *Bioinformatics Methods and Protocols*. The Humana Press Inc. Totowa, EEUU: 115-130

- Stern, VM. 1973. Economic thresholds. *Ann. Rev. Entomol.*, 18: 259-80.
- Stern, VM; Smith, RF; van den Bosch, R; y Hagen, KS. 1959. The integrated control concept. *Hilgardia*, 29: 81-101.
- Stouthamer, R; Breeuwer, JAJ; Luck, RF y Werren, JH. 1993. Molecular identification of microorganisms associated with the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *J. Invert. Phathol.*, 17: 48-52.
- STSC. 1987. Statgraphics User's Guide, version 5.0, Graphic Software System STSC Inc. Rockville, EEUU.
- Subod, KJ; Bharat, N; Divya, P y Kalpana, J. 2010. RAPD marker system in insect study: A Review. *Indian Journal of Biotechnology*, 9: 7-12.
- Sun JT, Lian C, Navajas M, Hong XY. 2012. Microsatellites reveal a strong subdivision of genetic structure in Chinese populations of the mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Bmc Genetic*, 13:8.
- Sunderland, KD; Crook, NE; Stacey, DL y Fuller, BJ. 1987. A study of feeding by polyphagous predators on cereal aphids using Elisa and gut dissection. *J. Appl. Ecolaboradores*, 24: 907-933.
- Sunnucks, P y Hales, DF. 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Mol. Biol. and Evol.*, 13: 510-524.
- Swirski, E. 1973. Integrated control of mites in Israel. En: I Congreso Mundial de Citricultura. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS). Murcia-Valencia: 477-480.
- Symondson, WOC and Liddell, JE. 1996. Immunological approaches to the detection of predation upon New Zealand Flatworms (Tricladida: Terricola): problems caused by shared epitopes with slugs (Mollusca: Pulmonata). *International Journal of Pest Management*, 42: 95-99.
- Talhok, AS. 1975. Citrus pests throughout the world. En: Citrus. Häfliger, E. (Ed.). Ciba-Geigy Ltd. Basilea, Suiza: 21-23.
- Telles, MPC; Peixoto, FP; Lima, JS; Resende, LV; Vianello, RP; Walter, MEMT y Collevatti, RG. 2011. Development of microsatellite markers for the

endangered Neotropical tree species *Tibouchina papyrus* (Melastomataceae). *Genet. Mol. Res.*, 10: 321–325.

Tixier, MS; Ferrero, M; Okassa, M; Guichou, S y Kreiter, S. 2010. On the specific identity of specimens of *Phytoseiulus longipes* Evans (Mesostigmata: Phytoseiidae) showing different feeding behaviours: morphological and molecular analyses. *Bull. Entomol. Res.*, 100: 569-579.

Tixier, MS; Kreiter, S; Auger, P y Weber, M. 1998. Colonization of Languedoc vineyards by phytoseiid mites (Acari: Phytoseiidae): influence of wind and crop environment. *Exp. Appl. Acarol.*, 22: 191-211.

Tixier, MS; Kreiter, S; Barbar, S; Ragusa, S y Cheval, B. 2006a. The status of two cryptic species: *Typhlodromus exhilaratus* Ragusa and *Thyphlodromus phialatus* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae): consequences for taxonomy. *Zool. Scr.*, 35: 115-122.

Tixier, MS; Kreiter, S; Ferragut, F y Cheval, B. 2006b. Morphological and molecular evidences for the synonymy of *Kampilodromus hmiminai* McMurtry and Boufour and *K. adrianae* Ferragut and Pena-Estevez (Acari: Phytoseiidae). *Canadian Journal of Zoology*, 84 (8): 1216-1222.

Tsagkakakou, A; Guillemaud, T; Rousset, F y Navajas, M. 1996. Molecular identification of *Wolbachia endosymbiont* in a *Tetranychus urticae* strain (Acari: Tetranychidae). *Insect Mol. Biol.*, 5: 217-221.

Tsagkarakou, A; Navajas, M; Lagnel, J y Pasteur, N. 1997. Population structure in the spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) from Crete based on multiple allozymes. *Heredity*, 78: 84: 92.

Tsagkarakou, A; Navajas, M; Papaioannou-Souliotis, P y Pasteur, N. 1998. Gene flow among *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations in Greece. *Mol. Ecolaboradores*, 6: 305-314.

Tsagkarakou, A; Navajas, M; Rousset, F y Pasteur, N. 1999. Genetic differentiation in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) from greenhouses in France. *Exp. Appl. Acarol.*, 23: 365-378.

- Trautwein, MD; Wiegmann, BM, Beutel, R; Kjer, KM y Yeates, DK. 2012. Advances in insect phylogeny at the dawn of the postgenomic era. *Annu. Rev. Entomol.*, 57:449-68.
- Tree of life Project. 1995-2004. Information for every species and for each group of organisms, living or extinct. Disponible: <http://www.tolweb.org/tree/home.pages/abouttol.html> [Último acceso: 28 octubre 2012].
- Tuttle, DM y Baker, EW. 1968. Spider mites of South-western United States and a revision of the family Tetranychidae. University of Arizona Press. Arizona, EEUU: 143 pp.
- Ueckermann, EA; Navajas, M; Auger, P; Migeon, A; Tiedt, L y Yanar, D. 2010. *Tetranychus urticae* and *T. cinnabarinus* synonymous or not. XIII International Congress of Acarology. Recife, Brazil. Abstract book:281 pp
- Uesugi, R y Osakabe, M. 2007. Isolation and characterization of the microsatellite loci in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Mol. Ecolaboradores Resour.*, 7: 290-292.
- Uesugi, R; Kunimoto, Y y Osakabe, MH. 2009a. The fine-scale genetic structure of the two-spotted spider mite in a comercial greenhouse. *Exp. Appl. Acarol.*, 47: 99-109
- Uesugi, R; Terunori, S y Osakabe, MH. 2009b. Evidence of a high level of gene flow among apple trees in *Tetranychus urticae*. *Exp. Appl. Acarol.*, 49:281-290.
- University of California. 1991. Integrated pest Management for citrus. 2nd ed. University of California-Statewide IPM Project. Division of Agriculture and Natural Resources. Oakland, EEUU, 3308: 156pp.
- University of California., 2012; IPM Integrated Pest Management guidelines: citrus. Publicación 3441. Disponible: <http://.ipm.ucdavis.edu/PDF/PMG/pmgcitrus.pdf> [Último acceso: 28 octubre 2012]
- Urbaneja, A; Chueca, P; Montón, H; Pascual-Ruiz, S; Dembilio, O; Vanaclocha, P; Abad-Moyano, R y Castañera, P. 2009. Chemical alternatives to malathion for controlling *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), and their side effects on natural enemies in Spanish citrus orchards. *J. Econ. Entomol.*, 102: 144-151.

- Urbaneja, A; Llácer, E; Garrido, A y Jacas, JA. 2000. Impact of indigenous natural enemies of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) in East Spain. *Biol. Control*, 18: 199-207.
- Urbaneja, A; Morales, C; Hermoso, A. Garrido, A y Jacas, A. 2003. Effect of temperature on development and survival of *Citrostichus phyllocnistoides* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *Biocontrol Science and Technology*, 15: 131-134.
- Urbaneja, A; Pascual-Ruiz, S; Pina, T; Abad-Moyano, R; Vanaclocha, P; Montón, H; Dembilio, O; Castañera, P y Jacas, JA. 2008. Efficacy of five selected acaricides against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and their side effects on relevant natural enemies occurring in citrus orchards. *Pest Manag. Sci.*, 64: 834-842.
- Urbaneja, A; Planes, L; Catalán, J; y Jacas, JA. 2012. Plagas principales, Tetraníquidos, Métodos de muestreo y umbrales de la araña roja (*Tetranychus urticae*). En: *Gestión Integrada de Plagas de Cítricos (IVIA)*. Urbaneja, A; Catalán, J; Tena, A y Jacas, JA (Eds.). Disponible: <http://gipcitricos.ivia.es/area/plagas-principales/tetraniquidos/arana-roja> [Último acceso: 28 octubre 2012].
- Vacante, V. 2010. *Citrus mites: Identification, bionomy and Control*. CABI. UK: 378 pp.
- Venables, WN y Ripley, BD. 2002. *Statistics and computing. Modern Applied Statistics with S*. Springer. New York, EEUU: 496 pp.
- Vrie, M. van de. 1972. Potentials of *Thyphlodromus (A.) potentillae* Garman to reduce *Panonychus ulmi* Koch on apple with various nitrogen fertilizations. *Entomophaga*, 15 (3): 291-304.
- Viñuela, E. 1998. Resistencia a insecticidas en plagas de cultivos hortícolas en España. En: *Resistencia a los pesticidas en los cultivos hortícolas*. Cuadrado, IM y Viñuela, E (Eds.). FIAPA. Almería, España: 19-30.
- Viñuela, E y Jacas, JA. 1993. Los enemigos naturales de las plagas y los plaguicidas. *Hojas Divulgatorias 2/93*. MAPA. Madrid, España: 24 pp.



- Vos, P; Hogers, R; Bleeker, M; Reijans, M; van de Lee, T; Hornes, M; Frijters, A; Pot, J; Peleman, J; Kuiper, M y Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 (21): 4407-4414.
- Wang, FH. 1981. Acariformes: Tetranychoida. *Economic Insect fauna of China*, 23: 142-156 (En Chino).
- Wang, Y., Zhang, H., Haichao, L., y Miao X. 2011. Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. *PLOS One* 6 (4): e18644.
- Weeden, NF; Timmerman, GM; Hemmat, M; Kneen, BE y Lodhi, MA. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. En: *Applications of RAPD technology to plant breeding*. Hoisington, D y McNab, A (Eds.). Proc. Symp. Appl. RAPD Technol. Plant Breed, Crop Sci. Soc. Am. Minneapolis, EEUU: 12-17.
- Weersink, A; Deen, W y Weaver, S. 1991. Defining and Measuring Economic Threshold Levels. *Can. J. Agric. Econ.*, 39: 619-625.
- Werren, JH. 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 587-609.
- Werren, JH; Guo, L y Windsor, DW. 1995a. Distribution of *Wolbachia* in neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. London Ser B*, 262: 147-204.
- Werren, JH y Jaenike, J. 1995b. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mycophagous *Drosophila* and their relatives. *Heredity*, 75: 320-26.
- Werren, JH; Zhang, W y Guo, LR. 1995c. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. London Ser, B* 251: 55-71.
- Wilson, ACC; Massonnet, B; Simon, JC; Prunier-Leterme, N; Dolatti, L; Llewellyn, KS; Figueroa, CC; Ramirez, CC; Blackman, RL; Estoup, A y Sunnucks, P. 2004. Cross-species amplification of microsatellite loci in aphids: assessment and application. *Mol. Ecolaboradores*, 4(1): 104-109.
- Wijnands, FG y Kroonen-Backbier, BM. A. 1993. Management of farming systems to reduce pesticide inputs: the integrated approach. En: *Modern crop protection: The development and perspectives*, Zadoks, JC. Press. Wageningen University, Holanda: 227-234.

- Williams, JGK; Kubelik AR; Livak, J; Rafalsky JA y Tingey, SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18 (2): 6531-6535.
- Xie, L; Hong, XY y Xue YF. 2006. Population genetic structure of the two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) from China. *Annals of the Entomological Society of America*, 99: 959-965.
- Yli-Mattila, T; Paavenen-Huhtala, S; Fenton, B y Tuovinen, T. 2001. Species and strain identification of the predatory mite *Euseius finlandicus* by RAPD-PCR and ITS sequences. *Exp. Appl. Acarol.*, 24: 863: 880.
- Yu, MZ; Zhang, KJ; Xue, XF y Hong, XY. 2011. Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation and evolution in natural populations of *Tetranychus urticae* Koch. *Ins. Mol. Biol.*, 20(3): 311-321.
- Yuan, ML; Wei, DD; Wang BJ; Dou, W y Wang, JJ. 2010. The complete mitochondrial genome of the citrus red mite *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae): high genome rearrangement and extremely truncated tRNAs. *BMC Genomics*, 11: 597.
- Zabalou, S; Riegler, M; Theodorakopoulou, M; Stauffer, C; Savakis, C y Bourtzis, K .2004. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 15042-15045.
- Zaher, MA; Gomaa, EA y El-Enany, MA. 1982. Spider mites of Egypt (Acari: Tetranychidae). *Internal. J. Acarol.*, 8(2): 91-114.
- Zane, L; Bargelloni, L y Patarnello, T .2002. Strategies for microsatellite isolation; a review. *Mol. Ecolaboradores*, 11: 1-16.
- Zhang, ZQ. 1995. Variance and covariance of ovipositional rates and developmental rates in the Phytoseiidae (Acari: Mesostigmata): a phylogenetic consideration. *Exp. Appl. Acarol.*, 19: 139-46.
- Zhang, ZQ. 2003. *Mites of greenhouses. Identification, biology and control*. CABI Publishing. Wallingford, UK: 244 pp

- Zhang, ZQ. y Jacobson, RJ. 2000. Using adult female morphological characters for differentiating *Tetranychus urticae* complex (Acari: Tetranychidae) from greenhouse tomato crops in UK. Syst. Appl. Acarol., 5: 69-76.
- Zhang, GH; Lü, ZC y Wan, FH. 2007. Detection of *Bemisia tabaci* remains in predator guts using a sequence-characterized amplified region marker. Entomologia Experimentalis et Applicata, 123: 81–90.
- Zhao, Z y McMurtry, JA. 1990. Development and reproduction of three Euseius (Acari: Phytoseiidae) species in the presence and absence of supplementary foods. Exp. Appl. Acarol., 8: 233-42.