

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA RURAL Y AGROALIMENTARIA**

**Unidad de Mecanización y Tecnología Agraria**



**UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA**

**ivia**

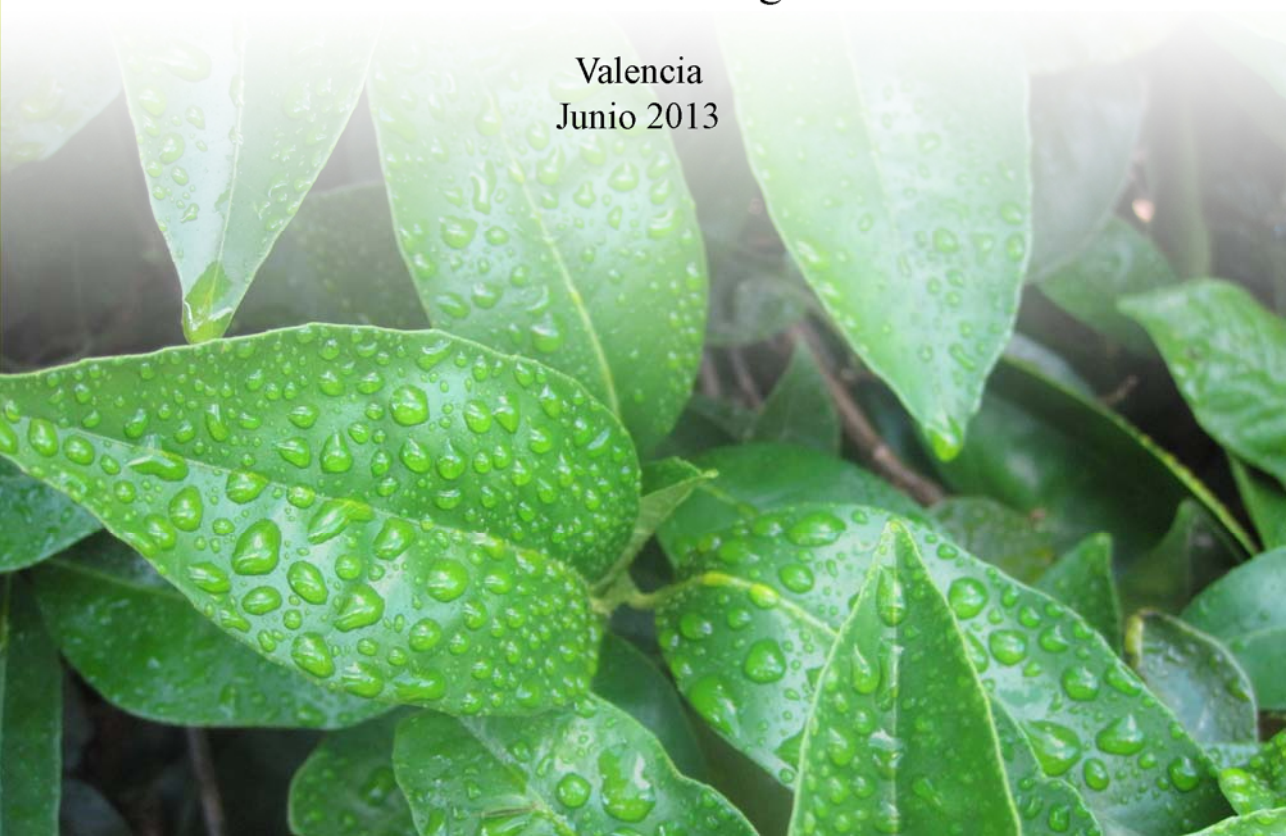
instituto valenciano  
de investigaciones agrarias

Tesis doctoral

**Racionalización de las aplicaciones de productos  
fitosanitarios para el control de *Aonidiella aurantii*  
Maskell (Hemiptera: Diaspididae) en cítricos**

M<sup>a</sup>Cruz Garcerá Figueroa

Valencia  
Junio 2013





**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA RURAL Y AGROALIMENTARIA

Unidad de Mecanización y Tecnología Agraria



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**ivia**

instituto valenciano  
de investigaciones agrarias

**Racionalización de las aplicaciones de productos  
fitosanitarios para el control de *Aonidiella aurantii*  
Maskell (Hemiptera: Diaspididae) en cítricos**

**TESIS DOCTORAL:**

*M<sup>c</sup>Cruz Garcerá Figueroa*

**Directores:**

*Dr. Enrique Moltó García*

*Dra. Patricia Chueca Adell*

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias

**Tutor:**

*Dr. Carlos Gracia López*

Universitat Politècnica de València

Valencia

Junio, 2013

© M<sup>a</sup>Cruz Garcerá Figueroa

Valencia, 2013

*A mis padres,  
apoyo incondicional en todos mis proyectos*



## AGRADECIMIENTOS

En la realización de esta tesis han colaborado de uno u otro modo gran número de instituciones y personas a los que quiero expresar mi gratitud, ya que su colaboración ha sido vital para que la tesis haya llegado a buen puerto.

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a las fuentes de financiación, siempre tan importantes y sin las cuales el desarrollo de este trabajo habría sido imposible. Primero quiero agradecer al Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias la concesión de la beca predoctoral, que me permitió embarcarme en esta aventura.

También quiero agradecer a la empresa Dow AgroSciences Ibérica S.A., por financiar parte de los ensayos realizados en la tesis, y al Ministerio de Economía y Competitividad, por la financiación concedida a través de proyectos de investigación relacionados con la misma, como son los proyectos *Optidosa* (Título: ‘Reducción del uso de productos fitosanitarios en cultivos arbóreos. Optimización de la dosis de aplicación en tratamientos mecanizados’. Referencia: AGL2007-66093-C04-03/AGR) y *Safespray* (Título: ‘Estrategias integrales para una utilización de fitosanitarios segura y eficaz’. Referencia: AGL2010-22304-C04-01). Gracias a estos proyectos he conocido y colaborado con otros grupos de investigación, de la Universitat Politècnica de València (Valencia), la Universitat Politècnica de Catalunya (Barcelona), la Universitat de Lleida (Lleida), y el Centro de Mecanización Agraria de la Generalitat de Catalunya (Lleida), unidos todos por el interés en la mejora de la aplicación de los pesticidas.

Mi más sincero agradecimiento a las fincas donde he realizado los ensayos de campo y a los técnicos al cargo de las mismas, por permitirme hacer lo que necesitaba y facilitarme el trabajo en todo momento. En concreto a Fontestad S.A., Alzicoop (Cooperativa Hortofrutícola de Alzira, Coop. V.), Reva S.A. (Regadíos y Energía de Valencia) y las de propiedad individual.

El apoyo y colaboración de muchas personas también ha sido clave en el desarrollo de la tesis, tanto desde el punto de vista profesional como personal, ya que en numerosas ocasiones este apoyo ha sido el que me ha mantenido al pie del cañón.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores, el Dr. Enrique Moltó y la Dra. Patricia Chueca, por sus buenos consejos y aportaciones, su perseverancia, su paciencia y su confianza depositada en mí, mayor que la mía misma. Ambos sois ejemplo de entusiasmo, dedicación, entrega y defensa del trabajo bien hecho, que siempre me animan a superarme y no me dejan caer. Sois más que mis directores, juntos formamos un buen equipo que espero y deseo que, si las circunstancias lo permiten, llegue muy lejos.

Al Dr. Carlos Gracia, de la Unidad de Mecanización y Tecnología Agraria, parte del Departamento de Ingeniería Rural y Agroalimentaria de la Universitat Politècnica de València (UPV), tutor de esta tesis, ejemplo e inspiración de toda una vida dedicada a la enseñanza y a la mecanización agraria.

Como no, también quiero agradecerle al Dr. Manolo Zarzo, del Departamento de Estadística e Investigación Operativa Aplicadas y Calidad de la UPV, su apoyo y asesoramiento en el análisis estadístico de los datos, sus buenas ideas ante cualquier planteamiento y su buena predisposición a resolver todas mis dudas.

No puedo olvidar a la gente del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del IVIA, gracias a los cuales entré en contacto con el piojo rojo de California, que me “presentaron” a la Torre de Potter y que además siempre estuvieron dispuestos a echar una mano. En especial quiero agradecer al Dr. Alberto Urbaneja, que posibilitó mi colaboración en el proyecto de investigación con título ‘Manejo integrado de plagas en cítricos: control de ácaros (*Eutetranychus banksi*, *E. orientalis* y *Tetranychus urticae*) y del piojo rojo de California (*Aonidiella aurantii*)’ (Referencia: AGL2005-07155-C03-02/AGR) gracias al cual tuve la oportunidad de trabajar con otras plagas. Especialmente, tengo muy buenos recuerdos de las horas pasadas en el laboratorio con Pilar Vanaclocha y Helga Montón delante de la lupa, “N3 KO”, “N1 vivo”.....

También quiero expresar mi gratitud a la Dra. Elizabeth Grafton-Cardwell, de la Universidad de California, que me recibió en su laboratorio del Kearney Research and Extension Center (Reedley, California) como un miembro más de su equipo durante 6 maravillosos meses, lo que me permitió conocer una cultura de vida y trabajo diferentes.

Gracias a los compañeros del Centro de Agroingeniería, los que están y los que han pasado por aquí, que son muchos. A los que han colaborado directamente en la tesis, en el desarrollo tanto de ensayos de laboratorio como de campo, Juanjo, Juan Luis, Sandra, Iván, Rosana,...Sergio, por sus siempre buenos consejos y su apoyo incondicional, y a todos los demás, que me han apoyado y animado desde que empecé y hasta hoy mismo.

Por supuesto, gracias a mi familia por creer siempre en mí más que yo misma, apoyarme siempre en todo lo que necesito y por tener infinita paciencia conmigo y los agobios que me ponen los nervios a flor de piel, a mis amigos por animarme, tanto de cerca como a kilómetros de distancia, siento la fuerza de todos empujándome hacia delante.

E indudablemente, a David, por apoyarme, creer en mí, animarme en todo momento, y hacerme cada día más feliz...y por esperarme...



## RESUMEN

El uso de pesticidas en la agricultura es todavía imprescindible para conseguir un control adecuado de las plagas. Con el fin de disminuir y controlar los riesgos que conlleva su aplicación existe una elevada presión social que promueve el desarrollo de acciones destinadas a minimizar el impacto de los pesticidas sobre el medioambiente.

Una forma de conseguirlo es racionalizar la aplicación de los pesticidas, adecuando la cantidad de producto empleada a las necesidades reales y las condiciones particulares de la aplicación a realizar (plaga que se trata de controlar, maquinaria y productos empleados y vegetación sobre la que se aplica). Sin embargo, en la actualidad se suelen aplicar grandes cantidades de producto con el objetivo de asegurar su resultado, sin tener en cuenta que a menudo esta práctica genera excesos innecesarios que acaban contaminando el medio ambiente e incrementa el coste de producción.

Para poder ajustar racionalmente la cantidad de producto que debe aplicarse en un tratamiento, es necesario estudiar las relaciones existentes entre la cantidad de materia activa depositada, la forma en que se deposita y cómo ésta afecta al control de la plaga, evaluando las posibles diferencias de sensibilidad entre los estadios de desarrollo de la misma. Esta tesis ha servido para desarrollar de manera científica estas relaciones, utilizando como ejemplo el control del piojo rojo de California, *Aonidiella aurantii* Maskell (Hemiptera: Diaspididae) en sus distintas fases de desarrollo, ya que es una plaga de las más importantes en el cultivo de los cítricos. A lo largo de la tesis se han utilizado los dos tipos de productos que más se emplean contra esta plaga, con organofosforados y aceites minerales como materias activas. Como consecuencia de los modelos de respuesta que se han establecido en la tesis, se deducen los depósitos mínimos que se deben alcanzar sobre el material vegetal para obtener la máxima eficacia sobre cada estadio de desarrollo del insecto. Así, contra las fases jóvenes es necesario un depósito mínimo de caldo de  $1.01 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  con insecticidas organofosforados y de  $3.41\text{-}4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  en el caso de los aceites

minerales, mientras que para fases adultas estos depósitos aumentan hasta valores de alrededor de  $4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  en todos los casos, utilizando siempre los productos a la concentración registrada contra el piojo rojo de California en cítricos.

A continuación se han validado en condiciones de campo los modelos de respuesta de los insecticidas. Para ello se han diseñado unos tratamientos en función del modelo de respuesta, el tamaño de la copa y la densidad foliar de la vegetación, y se ha comparado su eficacia respecto a tratamientos convencionales basados en volúmenes cercanos al punto de goteo. A pesar de haber obtenido menores recubrimientos con los tratamientos diseñados (60-70% frente al 90% con los tratamientos convencionales), no se han encontrado diferencias de eficacia estadísticamente significativas y se ha ahorrado alrededor de un 40% de producto fitosanitario.

La tesis también demuestra que, una vez alcanzado un determinado umbral de recubrimiento, y por tanto, de depósito (diferente para cada estadio de la plaga), la generación de mayor recubrimiento no conduce a una mayor eficacia, poniendo de manifiesto que la cantidad de insecticida organofosforado o aceite mineral empleada actualmente puede ser reducida mediante la optimización del volumen de aplicación, en función del volumen de vegetación al que se dirige el tratamiento.

Por último, la tesis propone y valida un método para estimar la calidad de un tratamiento, basado en los depósitos conseguidos sobre papel hidrosensible tras la aplicación. Para ello utiliza los datos de recubrimiento observados y los relaciona con la eficacia esperada.

## ABSTRACT

The use of pesticides in agriculture is still essential to achieve adequate control of pests. However, there is an important social pressure towards the development of measures for minimizing the impact of pesticides on the environment and reducing and controlling the risks associated with their application.

One way to achieve these goals is the rational application of pesticides by properly adjusting the amount of product to the actual needs and specific conditions of the application (pest to be controlled, machinery and pesticide used and vegetation to be treated). However, applying large quantities of product is fairly common, in order to ensure the result, without taking into account that this practice normally entails an excessive release of products that pollute the environment and increases production costs.

In order to rationally adjust the amount of product to be applied in a treatment, it is necessary to study the relationships between the quantity of deposited active ingredient, how it is deposited and how it affects the control of the pest, evaluating if there are differences between their natural developmental stages. This thesis has served to scientifically develop these relationships, using California red scale, *Aonidiella aurantii* Maskell (Hemiptera: Diaspididae) and its different developmental stages as an example, because it is a key pest in citrus. Throughout the thesis, two types of the most widespread products against this pest have been used: organophosphates and mineral oils. From the response models established in this thesis, minimum deposits for maximum effectiveness of these products on each stage of development of the California red scale are inferred. For example, minimum necessary deposit against young stages with organophosphate pesticides is  $1.01 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  and  $3.41\text{-}4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  in the case of mineral oils, while optimal deposits against adult stages increased to approximately  $4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  in all cases, mixing the products at the registered concentrations against California red scale in citrus.

Subsequently, the response models of the insecticides have been validated in field conditions. Treatments designed from models, which depend on the response, the size of the canopy and the leaf density of the vegetation, have been compared, in terms of efficacy, with respect to conventional treatments, based on volumes close to the runoff point. Despite having obtained lower levels of coverage with the proposed treatments (60-70% against 90% obtained with the conventional treatments), no statistically significant differences of efficacy have been found, with around 40% of pesticide savings.

The thesis also demonstrates that, once a certain threshold has been reached (which is different for each stage of the pest), generating greater coverage does not increase efficacy, thus demonstrating that the amount of organophosphate insecticide or mineral oil used can be reduced by optimizing the spray application volume, taking into account the targeted volume of vegetation.

Finally, the thesis proposes and validates a method to estimate the quality of a treatment, based on the deposits made on water sensitive paper after application. It uses observed coverage data and relates them to the expected efficacy.

## RESUM

L'ús de pesticides en l'agricultura continua sent imprescindible per tal d'aconseguir un control adequat de les plagues. A fi de disminuir i controlar els riscos que comporta la seua aplicació existeix una elevada pressió social que promou el desenvolupament d'accions destinades a minimitzar l'impacte dels pesticides sobre el medi ambient.

Una forma d'aconseguir-ho és mitjançant la racionalització de l'aplicació dels pesticides, adequant la quantitat de producte empleada a les necessitats reals i les condicions particulars de l'aplicació (plaga que es tracta de controlar, maquinaria i producte empleats i vegetació sobre la qual s'aplica). No obstant això, actualment l'aplicació de gran quantitat de producte amb l'objectiu d'assegurar el resultat és una pràctica prou estesa, sense tindre en compte que sovint genera un excés innecessari de producte que acaba contaminant l'ambient i augmenta els costos de producció.

Per a poder ajustar racionalment la quantitat de producte que ha de aplicar-se en un tractament, és necessari estudiar les relacions existents entre la quantitat de matèria activa dipositada, la forma en què es diposita i com aquesta afecta al control de la plaga, avaluant les possibles diferències de sensibilitat entre els seus estadis de desenvolupament. Esta tesi ha servit per desenvolupar de manera científica estes relacions, usant com exemple el poll roig de Califòrnia, *Aonidiella aurantii* Maskell (Hemiptera: Diaspididae), en les seues distintes fases de desenvolupament, ja que aquesta és una plaga de les més importants en el cultiu dels cítrics. Al llarg de la mateixa s'han utilitzat dos tipus de productes que més es fan servir contra esta plaga, amb organofosforats i olis minerals com matèries actives. Com a conseqüència dels models de resposta que s'han establert en la tesi, es dedueixen els depòsits mínims que cal acumular sobre el material vegetal per obtindre la màxima eficàcia sobre cada estadi de l'insecte. Així doncs, contra les fases joves és necessari un depòsit mínim de caldo de  $1.01 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  amb insecticides organofosforats i de  $3.41\text{-}4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  en el cas d'olis minerals, mentre que per a les fases adultes estos depòsits augmenten fins al

voltant de  $4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  en tots els casos, utilitzant sempre els productes a la concentració registrada contra el poll roig de Califòrnia en cítrics.

A continuació s'han validat en condicions de camp els models de resposta dels insecticides. Per això s'han dissenyat uns tractaments que depenen del model de resposta, el tamany de la copa i la densitat foliar de la vegetació, i s'ha comparat la seua eficàcia respecte als tractaments convencionals, basats en volums d'aplicació pròxims al punt de goteig. Fins i haver obtingut menors recobriments amb els tractaments dissenyats (69-70% front al 90% amb els tractaments convencionals), no s'han trobat diferències d'eficàcia estadísticament significatives, i s'ha estalviat al voltant d'un 40% de producte fitosanitari.

La tesi també demostra que, una vegada arribats a un determinat llindar (diferent per a cada estadi de la plaga), la generació de major recobriment no condueix a una major eficàcia, posant de manifest que la quantitat de pesticides organofosforats i d'olis minerals pot ser reduïda per mitjà de l'optimització del volum d'aplicació, basant-se en el volum de vegetació a que es dirigeix el tractament.

Finalment, la tesi proposa i valida un mètode per estimar la qualitat d'un tractament, basat en els depòsits aconseguits sobre paper hidrosensible després de l'aplicació. Per això utilitza les dades de recobriment observats i les relaciona amb l'eficàcia esperada.

## ÍNDICE

<b>CAPITULO I DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO II OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS.....</b>	<b>5</b>
1    Objetivos de la tesis .....	7
2    Organización de la tesis .....	8
<b>CAPITULO III ANÁLISIS PRELIMINAR DE LOS FACTORES QUE AFECTAN A LA EFICACIA BIOLÓGICA DE LOS TRATAMIENTOS .....</b>	<b>11</b>
1    La relación entre la deposición del producto y su eficacia biológica.....	13
1.1    Factores que influyen sobre las necesidades de deposición de los productos .....	15
1.1.1    Modo de actuación del producto.....	15
1.1.2    Características biológicas de la plaga .....	18
1.2    Factores que afectan a cómo se depositan los productos.....	19
1.2.1    La formulación del producto fitosanitario .....	19
1.2.2    Interacción entre el caldo y la superficie receptora .....	20
1.2.3    Densidad y volumen de la vegetación .....	20
1.2.4    Método de aplicación.....	21
1.2.5    Condiciones meteorológicas durante el tratamiento .....	21
1.3    El problema de la expresión de la dosis de los tratamientos .....	22
2    El problema del piojo rojo de California <i>Aonidiella aurantii</i> (Maskell) para la citricultura.....	26

2.1	Características del insecto que afectan a la eficacia de los tratamientos fitosanitarios .....	26
2.2	Influencia del modo de cultivo: características diferenciales de los cítricos en la Comunidad Valenciana .....	28
2.3	Equipos para la aplicación de productos fitosanitarios en citricultura .....	30
2.4	Productos que actualmente se emplean para el control de piojo rojo de California .....	31
<b>CAPITULO IV MODELIZACIÓN DE LA RELACIÓN DEPOSICIÓN Y EFICACIA BIOLÓGICA CONTRA <i>Aonidiella aurantii</i> .....</b>		<b>35</b>
1	Effect of spray volume of two organophosphate pesticides on coverage and on mortality of California red scale <i>Aonidiella aurantii</i> (Maskell) .....	39
1.1	Introduction .....	39
1.2	Materials and methods .....	41
1.2.1	Study of deposition .....	42
1.2.2	Study of biological efficacy .....	45
1.2.3	Data analysis .....	47
1.3	Results .....	48
1.3.1	Study of deposition .....	48
1.3.2	Study of biological efficacy .....	52
1.4	Discussion and Conclusions .....	53
1.5	Acknowledgements .....	55
2	Modelling the spray deposition and efficacy of two mineral oil-based products for the control of California red scale, <i>Aonidiella aurantii</i> (Maskell) .....	57
2.1	Introduction .....	57



2.2	Materials and methods.....	59
2.2.1	Deposition pattern.....	60
2.2.2	Efficacy against CRS stages. ....	61
2.2.3	Data analysis.....	62
2.3	Results .....	64
2.3.1	Deposition pattern.....	64
2.3.2	Efficacy against CRS stages. ....	69
2.4	Discussion.....	71
2.5	Acknowledgements .....	74
<b>CAPITULO V VALIDACIÓN DE LOS MODELOS DE CONTROL DE</b>		
<b><i>Aonidiella aurantii</i> EN CONDICIONES DE CAMPO .....</b>		<b>75</b>
1	Effect of spray application volume on coverage and efficacy of organophosphate insecticides for control of California red scale, <i>Aonidiella aurantii</i> (Maskell), in Spain.....	79
1.1	Introduction .....	79
1.2	Material and methods .....	82
1.2.1	Experimental sites.....	82
1.2.2	Description of the treatments and the sprayer.....	84
1.2.3	Application timing .....	87
1.2.4	Spray distribution in the canopy .....	88
1.2.5	Study of the biological efficacy of treatments .....	90
1.2.6	Proposing a parameter to evaluate the quality of the treatments.....	93

1.3	Results .....	95
1.3.1	Analysis of spray distribution in the canopy.....	95
1.3.2	Biological efficacy of the treatments .....	99
1.4	Discussion and Conclusions .....	107
1.5	Acknowledgements .....	111
2	Validación del modelo dosis-respuesta para aceites minerales contra el piojo rojo de California en condiciones de campo.....	113
2.1	Introducción.....	113
2.2	Materiales y métodos.....	114
2.2.1	Parcelas experimentales.....	114
2.2.2	Tratamientos aplicados y equipo de pulverización.....	115
2.2.3	Distribución de la pulverización en la vegetación .....	117
2.2.4	Estudio de la eficacia biológica de los tratamientos .....	119
2.2.5	Propuesta de un parámetro para evaluar la calidad de los tratamientos.....	120
2.3	Resultados.....	122
2.3.1	Análisis de la distribución del caldo en la vegetación .....	122
2.3.2	Eficacia biológica de los tratamientos .....	124
2.3.3	Propuesta de un parámetro de evaluación de la calidad de los tratamientos con aceites minerales.....	128
2.4	Discusión y conclusiones.....	130
	<b>CAPITULO VI DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>133</b>
	<b>CAPITULO VII CONCLUSIONES .....</b>	<b>141</b>

---

<b>CAPITULO VIII TRABAJOS FUTUROS .....</b>	<b>145</b>
<b>CAPITULO IX BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>151</b>
<b>CAPITULO X ANEJOS .....</b>	<b>189</b>
<b>ANEJO 1      PIOJO ROJO DE CALIFORNIA.....</b>	<b>191</b>
1      Origen y distribución.....	191
2      Daños en la planta e importancia económica.....	193
3      Morfología y desarrollo.....	195
4      Factores naturales de control.....	200
4.1      Clima .....	200
4.2      Parasitismo, enemigos naturales.....	203
5      Estrategias actuales de control .....	205
5.1      El nivel poblacional y la evolución de la plaga .....	206
5.2      Control de los fenómenos de resistencia .....	210
5.3      El control biológico .....	211
5.4      Productos alternativos: aceites minerales .....	211
6      Cría de piojo rojo de California en laboratorio .....	213
<b>ANEJO 2      TORRE DE PULVERIZACIÓN DE POTTER.....</b>	<b>215</b>
1      Introducción .....	215
2      Método de calibración: Porcentaje de recuperación .....	217
2.1      Metodología.....	217
2.1.1      Obtención del porcentaje de recuperación.....	217
2.1.2      Análisis de datos .....	218

2.2 Resultados y discusión ..... 218

**ANEJO 3      RELATIONSHIP BETWEEN COLLECTORS: CONVERSION  
OF COVERAGE DATA BETWEEN FIELD AND LABORATORY TRIALS221**

1      Introduction..... 221

2      Materials and methods ..... 223

3      Results and discussion..... 227

4      Conclusions..... 231

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<i>Figura II-1. Organización de las actividades de la tesis.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura III-1. Fotografía aérea del área citrícola del término municipal de Museros (Valencia, España) (Fuente: Visor de SigPac del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). .....</i>	<i>29</i>
<i>Figure IV-1. Example of spray distribution on a citrus leaf and a PVC collector. ....</i>	<i>43</i>
<i>Figure IV-2. Photography set (illumination system, column and digital camera).....</i>	<i>43</i>
<i>Figure IV-3. 3-steps image-analysis procedure of the pictures taken of the PVC collectors. 1. Trimmed picture; 2. Grey scale picture; 3. Black&amp;White picture; 4. Segmented picture (each impact has a number).....</i>	<i>45</i>
<i>Figure IV-4. Scales circled on a lemon skin.....</i>	<i>47</i>
<i>Figure IV-5. Example of collectors sprayed with the organophosphate tested solutions .....</i>	<i>49</i>
<i>Figure IV-6. Interaction between the factors “deposited volume” and “product” for (A) coverage, (B) mean impact size, and (C) number of impacts per unit area. ....</i>	<i>51</i>
<i>Figure IV-7. Interaction between the factors “deposited volume” and “development stage” for the effectiveness of Chlorpyrifos-based product (A) and Chlorpyrifos-methyl-based product (B). .....</i>	<i>53</i>
<i>Figure IV-8. Example of some collectors sprayed with the oil solutions .....</i>	<i>64</i>
<i>Figure IV-9. Experimental data and regression curves for coverage (A), mean impact size (B) and number of impacts per unit area (C) as a function of D (<math>\mu\text{l solution}/\text{cm}^2</math>) for each PDSO.....</i>	<i>68</i>
<i>Figure IV-10. Experimental data and regression curves for efficacy (%) as a function of D (<math>\mu\text{l solution}/\text{cm}^2</math>) for Oil A (A) and Oil B (B). .....</i>	<i>71</i>

*Figure V-1. Location and aerial views of orchards A, B and C (Source: SigPac Viewer of the Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). ..... 84*

*Figure V-2. Handgun hydraulic sprayer employed for the application of the treatments. .... 86*

*Figure V-3. A) Side view of a standard tree. Distribution of WSP in height. B) Top view of a standard tree. Distribution of WSP at each height. .... 88*

*Figure V-4. Coverage (%) at each height and depth (mean  $\pm$  SE) in orchards A, B and C. Means within each combination height x depth with different letters are significantly different (LSD test,  $P < 0.05$ ). ..... 97*

*Figure V-5. Infestation Index (%) of treatments prior to harvest (mean  $\pm$  SE), for CBP, CMBP and Standard treatments for orchard A, B and C respectively. Means within each combination product x orchard with a different letter are significantly different (LSD test,  $P < 0.05$ ). ..... 101*

*Figure V-6. TE (%) of treatments with CBP against the first generation of CRS (predominance of N1/N2 stages,  $TE_1$ ) and the second generation (coexistence of a stages mix,  $TE_2$ ) for each height and depth in orchards A and B. .... 104*

*Figure V-7. TE (%) of treatments with CMBP against the first generation of CRS (predominance of N1/N2 stages,  $TE_1$ ) and the second generation (coexistence of a stages mix,  $TE_2$ ) for each height and depth in orchards A and C. .... 106*

*Figura V-8. Localización e imágenes aéreas de las parcelas A y D (Fuente: Visor de SigPac del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). ..... 115*

*Figura V-9. A) Vista lateral de un árbol tipo. Distribución de los WSP en altura. B) Vista superior de un árbol tipo. Distribución de los WSP en cada altura. .... 118*

*Figura V-10. Recubrimiento (%) a cada altura y profundidad (media  $\pm$  EE) en las parcelas A y D. Medias dentro de cada combinación altura x profundidad con letras diferentes son significativamente diferentes (test LSD,  $P < 0.05$ ). ..... 123*

- Figura V-11. Índice de infestación (%) de los tratamientos antes de la cosecha (media  $\pm$  EE) en la parcela A. Medias de cada combinación campaña x tratamiento con una letra diferente son significativamente diferentes (test LSD,  $P < 0.05$ )..... 126*
- Figura V-12. Índice de infestación (%) de los tratamientos antes de la cosecha (media  $\pm$  EE) en la parcela D. Medias de cada combinación campaña x tratamiento con una letra diferente son significativamente diferentes (test LSD,  $P < 0.05$ )..... 127*
- Figura V-13. TE (%) de los tratamientos contra la primera generación de CRS (predominio de estadios N1&N2, TE<sub>1</sub>) y la segunda generación (coexistencia de una mezcla de estadios, TE<sub>2</sub>) para cada altura y profundidad en las parcelas A y D. ... 129*
- Figura X-1. Distribución mundial de A. aurantii (Fuente: CAB Intnal., 1996)..... 191*
- Figura X-2. Mapa de observaciones acumuladas en la Comunidad Valenciana de A. aurantii del 1/10/2004 a 11/11/2007 (Fuente: Red de Vigilancia Fitosanitaria de Cítricos de la GVA). ..... 193*
- Figura X-3. Infestación de A. aurantii sobre diferentes órganos de cítricos (fruto, rama y hoja) ..... 194*
- Figura X-4. Momificación de frutos y decaimiento general del árbol provocado por infestación severa de A. aurantii ..... 195*
- Figura X-5. Ciclo biológico de A. aurantii (Fuente: Forster et al., 1995, modificado). ..... 197*
- Figura X-6. Vistas en sección transversal de los estados de fase y muda de A. aurantii (Fuente: Forster et al., 1995). ..... 198*
- Figura X-7. Trampa con feromona para captura de machos de A. aurantii (Foto cedida por Pilar Vanaclocha Arocas, Unidad de Entomología del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias). Capturas de machos de A. aurantii durante 2006 en la Comunidad Valenciana (Fuente: Red de Vigilancia Fitosanitaria de Cítricos de la GVA). ..... 203*

*Figura X-8. Evolución de la primera generación de A. aurantii en los años 2006/2007/2008 en la Comunidad Valenciana, donde N1= 1ª Fase+Muda I; N2=Hembra de 2ª Fase+Muda II; H1=Hembra de 3ª Fase; H2=Hembra grávida; H3=Hembra con larvas; Machos= Todos los estadios del macho (Fuente: Red de Vigilancia Fitosanitaria de Cítricos de la GVA).*..... 209

*Figura X-9. Limones de la cría infestados con Aonidiella aurantii.*..... 214

*Figura X-10. Torre de pulverización de Potter: A) Vista general; B) Boquilla y depósito de caldo; C) Plataforma sobre la que se dispone la muestra que recibe la pulverización.* ..... 215

*Figura X-11. Diseño original de la boquilla de pulverización fina (A, entrada de aire; F, filtro del aire; C, cámara de aire; LF, entrada del líquido; AN, tuerca de ajuste; R, prensaestopas de caucho; M, varilla de sujeción; B, cuerpo de la boquilla) (Fuente: Potter, 1952. Copyright © 2008, John Wiley and Sons)* ..... 216

*Figura X-12. Intervalos HSD de Tukey para el porcentaje de recuperación.*..... 219

*Figura X-13. Intervalos HSD de Tukey para  $\mu\text{g caldo}/\text{cm}^2$ .* ..... 219

*Figura X-14. % de caldo recuperado vs temperatura (°C); humedad relativa (%); presión atmosférica (hPa).*..... 220

*Figure X-15. Function plot for each tested solution.*..... 230



---

**ÍNDICE DE TABLAS**

<i>Table IV-1. Estimated amount of active ingredient deposited per unit area (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>) (Mean and SE*) for the four volumes of solution and for each organophosphate pesticide sprayed with the Potter tower onto Petri dishes. ....</i>	42
<i>Table IV-2. Estimated amount of active ingredient deposited per unit area (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>) (Mean and SE*) for the five volumes of solution and for each PDSO sprayed with the Potter tower onto Petri dishes.....</i>	60
<i>Table IV-3. Regression coefficients of the MLR equation for coverage as a function of D (deposited volume, <math>\mu\text{l}</math> solution/<math>\text{cm}^2</math>) (<math>R^2 = 0.889</math>) .....</i>	65
<i>Table IV-4. Regression coefficients of the MLR equation for mean impact size as a function of D (deposited volume, <math>\mu\text{l}</math> solution/<math>\text{cm}^2</math>) (<math>R^2 = 0.823</math>) .....</i>	66
<i>Table IV-5. Regression coefficients of the MLR equation for number of impacts per unit area as a function of D (deposited volume, <math>\mu\text{l}</math> solution/<math>\text{cm}^2</math>) (<math>R^2 = 0.750</math>) .....</i>	67
<i>Table IV-6. Regression coefficients of the MLR equation for efficacy as a function of D (deposited volume, <math>\mu\text{l}</math> solution/<math>\text{cm}^2</math>) (<math>R^2 = 0.826</math>) .....</i>	70
<i>Table V-1. Characteristics of trial orchards .....</i>	83
<i>Table V-2. Operative characteristics of treatments.....</i>	87
<i>Table V-3. Significance of the spray application volume on coverage for each height and depth in each orchard.....</i>	98
<i>Table V-4. Infestation Index (%) of each treatment in each orchard (mean<math>\pm</math>SE). Significance of the differences of I.I. of CBP, CMBP and Standard applications with the Control and of CBP and CMBP applications with the Standard ones (Dunnnett's test). Significance of spray application rate for each treatment in each orchard (ANOVA &amp; LSD test).....</i>	100
<i>Table V-5. MLR results: regression coefficients for II (%) as a function of II<sub>CONTROL</sub> (%), applied volume per unit canopy (<math>\text{l}/\text{m}^3</math>) and products (<math>R^2 = 0.586</math>).....</i>	102

<i>Table V-6. WTE (%) of treatments with CBP and CMBP against the first generation of CRS (predominance of, <math>WTE_1</math>) and the second generation (coexistence of a mix of stages, <math>WTE_2</math>) in orchards A, B and C.....</i>	<i>107</i>
<i>Table V-7. Regression coefficients of the MLR for II (%) as a function of <math>II_{CONTROL}</math> (%) and WTE (<math>R^2 = 0.367</math>).....</i>	<i>107</i>
<i>Tabla V-8. Características de la Parcela D.....</i>	<i>114</i>
<i>Tabla V-9. Características operativas de los tratamientos.....</i>	<i>117</i>
<i>Tabla V-10. Significación del volumen de aplicación sobre el recubrimiento para cada altura y profundidad en cada parcela.....</i>	<i>124</i>
<i>Tabla V-11. Índice de Infestación (%) de cada tratamiento en la parcela A (media <math>\pm</math> EE). Significación de las diferencias de II de las aplicaciones de Aceite A y Estándar con el Control y de las aplicaciones de Aceite A con las Estándar (test de Dunnett). Significación del volumen de aplicación para cada tratamiento en cada campaña (ANOVA &amp; test LSD).....</i>	<i>125</i>
<i>Tabla V-12. Índice de Infestación (%) de cada tratamiento en la parcela D en cada campaña (media<math>\pm</math>EE). Significación de las diferencias de II de las aplicaciones de Aceite A y Aceite B con el Control (test de Dunnett). Significación del volumen de aplicación para cada aceite en cada campaña (ANOVA &amp; test LSD).....</i>	<i>125</i>
<i>Tabla V-13. Coeficientes de regresión del RLM para II (%) como función de <math>II_{CONTROL}</math> (%), Recubrimiento Ponderado (WC, %) y los tratamientos (<math>R^2 = 0.624</math>).....</i>	<i>128</i>
<i>Tabla V-14. WTE (%) de los tratamientos contra la primera generación de CRS (predominio de estadios <math>N1\&amp;N2</math>, <math>WTE_1</math>) y la segunda generación (coexistencia de una mezcla de estadios, <math>WTE_2</math>) en las parcelas A y D. ....</i>	<i>130</i>
<i>Tabla X-1. Zonas límite de desarrollo.....</i>	<i>201</i>
<i>Tabla X-2. Número de generaciones en diferentes localizaciones.....</i>	<i>202</i>
<i>Tabla X-3. Características estructurales de las boquillas de la torre de Potter.....</i>	<i>216</i>

---

<i>Table X-4. Deposited volume when spraying water</i> .....	224
<i>Table X-5. Tested functions</i> .....	227
<i>Table X-6. Goodness-of-fit of the different functions (<math>R^2</math>)</i> .....	228
<i>Table X-7. P-value of Shapiro-Wilk's test over the residues of functions 1 and 2.1</i>	228
<i>Table X-8. "a" value for each solution</i> .....	229



**CAPITULO I DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA Y  
JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS**

---



A pesar de los grandes avances en el control biológico de las plagas y enfermedades, en la agricultura actual todavía es necesario el uso de fitosanitarios. El objetivo de cualquier tratamiento fitosanitario es colocar una cantidad determinada de una sustancia activa en el lugar adecuado de la planta, de la manera más segura y económica posible con el fin de controlar las plagas y enfermedades diana. Aunque tanto los productores agrícolas como las industrias fabricantes de pesticidas realizan acciones continuas para que los tratamientos se realicen de la manera más conveniente posible, todavía una parte de los productos aplicados se pierde en el medioambiente, como resultado de la aplicación excesiva, la escorrentía, el lavado de los productos, la evaporación o la deriva. Paralelamente, la conciencia medioambiental de la sociedad europea va en aumento y existe una preocupación creciente por preservar la salud de personas y animales.

Por todo ello, en los últimos años se han estimulado importantes acciones legislativas para reducir al mínimo los riesgos asociados a la utilización de fitosanitarios, persiguiendo conseguir la eficacia óptima de cada producto aplicado y evitar la emisión innecesaria de productos al ambiente y la presencia de residuos en los alimentos (EPPO, 2012a,b). En este sentido, la Directiva 2009/128/CE (DOUE, 2009a) establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los productos para el control de plagas y enfermedades. La directiva establece una serie de herramientas y acciones para la reducción de los riesgos derivados de la utilización de estos productos, pero no solamente requiere medidas específicas de gestión de los riesgos, sino también medidas paliativas que reduzcan la contaminación del entorno. Además, también propone, entre otros aspectos, que la aplicación de los principios generales de la Gestión Integrada de Plagas (GIP) sea obligatoria para todos los productores europeos a partir del 1 de enero de 2014, lo que limitará el número de ingredientes activos que se podrán utilizar en cada caso, así como condicionará su aplicación. Esta directiva ha sido incorporada recientemente al ordenamiento jurídico interno español mediante la aprobación del Real Decreto 1311/2012 (BOE, 2012), que establecía que el marco de acción para conseguir un uso

sostenible de los productos fitosanitarios se definiría mediante un Plan de Acción Nacional para el Uso Sostenible de Productos Fitosanitarios, aprobado en diciembre de 2012. Por otra parte, la Directiva 91/414/CEE (DOCE, 1991) y el Reglamento (CE) 1107/2009 (DOUE, 2009b) exigen más garantías a nivel europeo de eficacia y seguridad de los productos aplicados, lo que también provoca la disminución del número de productos autorizados para el control de plagas. Asimismo, se limita la cantidad máxima de residuos fitosanitarios en los alimentos de origen vegetal que se comercializan en la Unión con el Reglamento (CE) 396/2005 (DOUE, 2005). En concordancia con todo este escenario, la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas establece que es necesario determinar la dosis mínima efectiva de los pesticidas según las condiciones de aplicación (características del cultivo, sensibilidad de la plaga, etc) (EPPO, 2012a).

Sin embargo, la experiencia con los productores agrarios nos enseña que existe la idea generalizada y errónea de que hay una relación directa y positiva entre la cantidad de producto aplicado y su eficacia en el control de las plagas, de forma que cuanto mayor es la cantidad de producto que se aplica, mayor es el control que se consigue, independientemente del cultivo, el producto y/o la plaga. Además, apenas existen fuentes de información, incluidas las etiquetas y prospectos de los productos, en las que aparezcan recomendaciones prácticas sobre la cantidad óptima de insecticida que deba utilizarse en condiciones reales de campo, lo que la mayoría de veces conduce a que se distribuyan sin tener en cuenta las necesidades reales para las condiciones particulares de cada parcela.

La falta de recomendaciones sobre la utilización correcta de la dosificación de los productos basadas en conocimiento científico se debe a la gran cantidad de factores, a menudo incontrolados, que influyen sobre el resultado de un tratamiento, como son el volumen y densidad de vegetación del cultivo que se desea proteger, las características de la plaga que se desea controlar y su nivel poblacional, las características físico-químicas y el modo de acción del producto empleado, las



regulaciones del equipo de aplicación o las condiciones meteorológicas. La interacción entre todos estos factores a menudo lleva a la confusión en la interpretación de los resultados o la imposibilidad de obtener tendencias claras en la respuesta de la plaga a los tratamientos.

Como consecuencia de los tratamientos mal realizados, gran parte del caldo pulverizado se pierde en el suelo o la atmósfera, lo que supone una importante pérdida de recursos y una contaminación innecesaria del medioambiente, que afecta al equilibrio de los ecosistemas. Merece la pena destacar los efectos adversos que esta situación provoca sobre la fauna útil y los enemigos naturales de las plagas, así como el efecto de aumento de la resistencia de las plagas a los insecticidas cuando no se utilizan racionalmente.

El piojo rojo de California (*Aonidiella aurantii* Maskell (Hemiptera: Diaspididae)) es un insecto que produce importantes pérdidas económicas en la citricultura mundial y en la Comunidad Valenciana en particular, por ello, esta tesis tiene como objetivo contribuir a racionalizar los tratamientos contra esta plaga y para ello se centra en investigar la eficacia de los tratamientos fitosanitarios para su control, evaluar los parámetros que influyen para conseguir el máximo aprovechamiento del producto aplicado para lograr el control deseado y reducir la pérdida de producto en el medioambiente, con el fin de aportar evidencias científicas que sirvan para dar recomendaciones sobre el uso óptimo de los tratamientos fitosanitarios.



## **CAPITULO II OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS**

---



## 1 OBJETIVOS DE LA TESIS

En esta tesis se estudian las aplicaciones de los productos que mayoritariamente se emplean para el control del piojo rojo de California (CRS) en la citricultura de la Comunidad Valenciana (insecticidas organofosforados y aceites minerales), con el objetivo de definir las relaciones entre la deposición de los productos y su eficacia, posibilitando así el ajuste de la dosificación a las condiciones particulares de la plantación objetivo del tratamiento. Es importante señalar que hasta el momento no hay apenas trabajos de este tipo, es decir que abarquen simultáneamente el estudio de la forma de deposición del producto y los efectos que ésta produce sobre la eficacia en el control de la plaga.

Como fin último, la tesis pretende sentar las bases científicas para establecer recomendaciones operativas prácticas para el tratamiento de la plaga y desarrollar una metodología sistemática para realizar este tipo de estudios en otros cultivos arbóreos, otras plagas y otros productos.

El primer objetivo es establecer los modelos de control que relacionan la deposición y la eficacia biológica de los productos fitosanitarios evaluados sobre los distintos estadios de CRS. Para ello, se marcaron una serie de objetivos secundarios:

- Determinación de la forma en que se depositan los diferentes productos;
- Evaluación del efecto de la dosificación de los productos sobre la eficacia en el control de los distintos estadios de *Aonidiella aurantii*;
- Generación de modelos que expliquen la influencia que tiene la distribución de la deposición sobre la eficacia biológica.

El segundo objetivo es la validación en condiciones reales de aplicación de los modelos de control establecidos y la evaluación de los parámetros relativos a la aplicación y a las características de la vegetación objetivo que más influyen en la eficacia conseguida. Este objetivo se subdividió en los siguientes:

- Estudiar la distribución de los tratamientos en los árboles empleando diferentes condiciones operativas, comparando las definidas en base a los modelos de control y en base a las prácticas habituales de aplicación;
- Determinar la eficacia de los tratamientos en diferentes condiciones operativas y validar los modelos de control;
- Determinar qué parámetros de las aplicaciones están más relacionados con la eficacia biológica.

Como último objetivo, se propone definir una metodología para evaluar la calidad de las aplicaciones realizadas en el campo a partir de los modelos de eficacia-deposición que se realizan en condiciones controladas, con el fin de avanzar en la generación de modelos que permitan en un futuro predecir el nivel de control de una plaga en función de la deposición observada en el campo y los resultados de mortalidad obtenidos en laboratorio.

## **2 ORGANIZACIÓN DE LA TESIS**

En primer lugar se presenta un análisis bibliográfico sobre los factores que influyen en la aplicación y deposición de los productos fitosanitarios en general y en los tratamientos aplicados contra el piojo rojo de California en la citricultura de la Comunidad Valenciana en concreto, y la influencia de estos factores sobre la eficacia biológica (Capítulo III).

A continuación se expone la investigación llevada a cabo para alcanzar los objetivos de la tesis, trabajo que se organiza siguiendo la lógica que se expresa en la Figura II-1.

El primer bloque de trabajo, que se detalla en el Capítulo IV, consiste en establecer los modelos de control del piojo rojo de California. Para ello, se analiza el comportamiento de las características de la deposición de los productos al variar las dosis aplicadas y, paralelamente, se estudia cómo afectan estas dosis a la eficacia en

el control de los distintos estadios de desarrollo del piojo rojo de California. Las dosis se consiguen variando el volumen de caldo y manteniendo constante la concentración del producto en el mismo (el Anejo 2 explica cómo se calcula el depósito de caldo). Por último, se establecen las relaciones entre los parámetros que describen la deposición y los parámetros que describen la eficacia biológica del tratamiento, relaciones de las que se extrae información sobre la deposición adecuada para conseguir el control de la plaga en condiciones controladas.

Este capítulo se divide en dos partes, relacionadas con los dos tipos de productos que se estudian. Así, el apartado 1 del Capítulo IV trata sobre los insecticidas organofosforados y el apartado 2 sobre los aceites minerales.

El segundo bloque de trabajo, detallado en el Capítulo V, se basa en las experiencias llevadas a cabo en condiciones reales. Al igual que en el capítulo anterior, el apartado 1 del capítulo explica los ensayos con insecticidas organofosforados y el apartado 2 con aceites minerales.

En este capítulo en primer lugar se analiza la influencia del volumen de caldo sobre la distribución de la pulverización en las diferentes zonas del árbol. Además, se evalúa la eficacia biológica conseguida y se analiza el efecto del volumen de aplicación. Posteriormente se realiza un estudio para identificar los factores del tratamiento que mejor se relacionan con la eficacia. Por último, se propone un método para estimar la eficacia de los tratamientos basada en relacionar los recubrimientos observados con los resultados de eficacia conseguidos en laboratorio. Este método puede servir de base para determinar en el campo la posible capacidad de control de un tratamiento y, por tanto, la calidad de un tratamiento. El método se valida con los datos de eficacia real conseguida en los ensayos de campo. Para poder llevar a cabo toda esta tarea es necesario relacionar los resultados de recubrimiento conseguidos en laboratorio con los de campo, ya que los datos se consiguieron con distintos tipos de colectores, dicha relación se presenta en el Anejo 3.

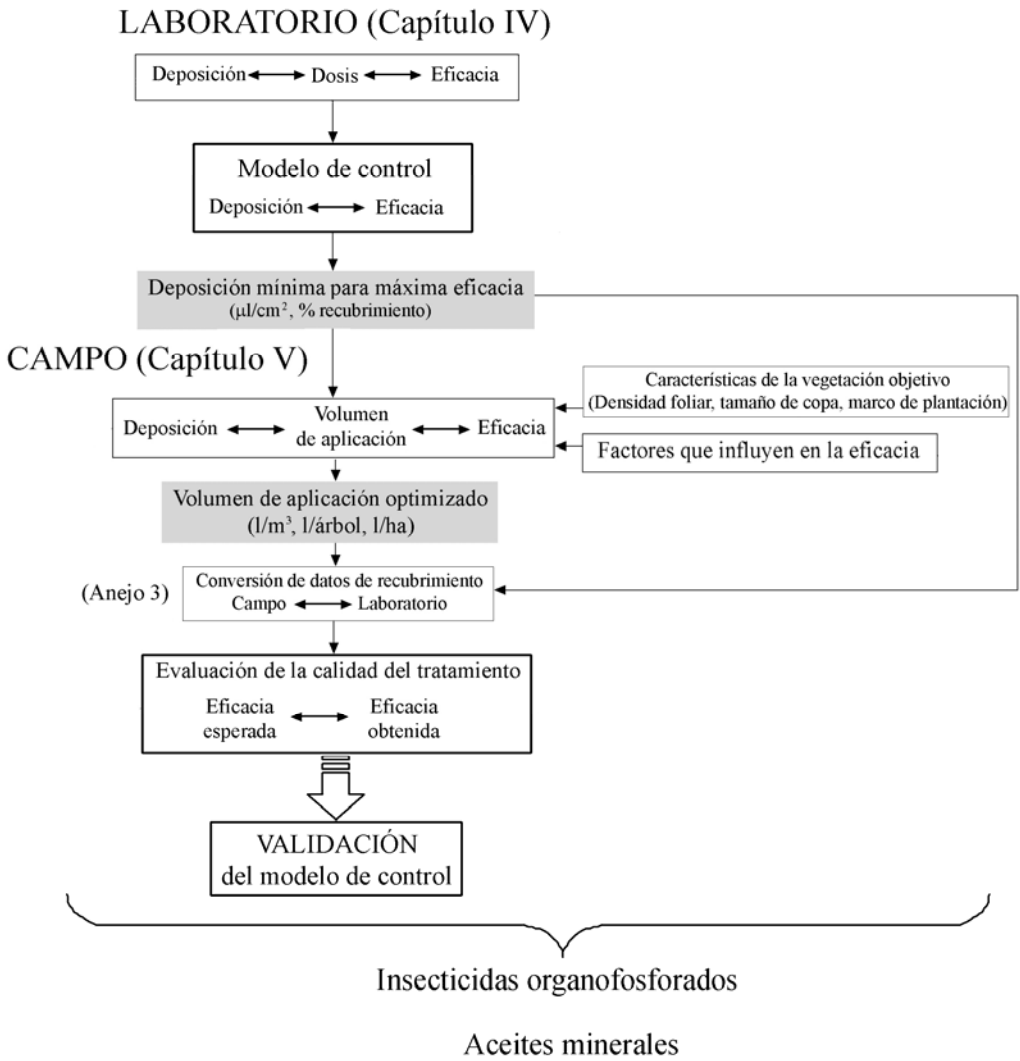


Figura II-1. Organización de las actividades de la tesis



**CAPITULO III ANÁLISIS PRELIMINAR DE LOS  
FACTORES QUE AFECTAN A LA  
EFICACIA BIOLÓGICA DE LOS  
TRATAMIENTOS**

---



## **1 LA RELACIÓN ENTRE LA DEPOSICIÓN DEL PRODUCTO Y SU EFICACIA BIOLÓGICA**

Es razonable considerar que la eficacia de un producto fitosanitario sobre una plaga depende de cómo se deposita el producto sobre la vegetación y de cómo afecta esta distribución a su acción sobre la plaga. En la literatura científica encontramos trabajos que afirman que existe una relación entre la distribución del producto sobre la planta y su eficacia de control y, en todo caso, que siempre existe una relación positiva entre la cantidad de deposición y la eficacia (Zabkiewicz, 2003). Sin embargo, algunos autores observan que elevadas dosis de un producto, distribuidas en depósitos pequeños y concentrados son menos eficaces que dosis más bajas distribuidas en depósitos mayores, lo que significa una disyuntiva entre utilizar mayor número de gotas pequeñas y concentradas o gotas de mayor tamaño y menos concentradas (Ebert y Derksen, 2004; Ebert y Downer, 2006), mientras que otros encuentran una relación inversa entre la mortalidad y el tamaño de gota (Reed y Smith, 2001).

A menudo se considera que una deposición uniforme sobre la planta y un recubrimiento elevado implican una aplicación correcta del producto y se asume implícita o explícitamente que esto es generalizable a todos los productos y plagas (Hall et al., 1993; Carrero, 1996; Zabkiewicz, 2007). En esta línea, frecuentemente se encuentran trabajos en los que se considera la uniformidad del recubrimiento en la copa de los árboles como el único parámetro de calidad de una aplicación. Sin embargo, la necesidad de uniformidad varía según el modo de acción del pesticida y las características de la plaga a controlar, como puede ser su movilidad o su tendencia a cobijarse en determinadas partes de la planta. A menudo, también se afirma que la uniformidad, y por tanto el recubrimiento óptimo, se consigue con la aplicación de gotas pequeñas, pero no se tienen en cuenta las características físico-químicas del producto aplicado, que influyen sobre el tamaño de las gotas, ni si el modo de acción del mismo requiere de esta uniformidad para ser eficaz contra la plaga (Iwata et al.,

1983; McCoy et al., 1989, 1990; Salyani y McCoy, 1989a,b). Es decir, el elevado recubrimiento, con elevada uniformidad y pequeño tamaño de las gotas, son parámetros relacionados con la deposición que normalmente se buscan en las aplicaciones de pesticidas sin tener en cuenta cómo afecta a la eficacia biológica del tratamiento.

Asimismo, se pueden encontrar un conjunto de trabajos en los que se tiene muy en cuenta la eficacia biológica de los tratamientos y se asume directamente que la mortalidad generada en la plaga está directamente relacionada con el porcentaje de recubrimiento alcanzado. De ello se deduce que para obtener una mayor mortalidad de la plaga hay que obtener el mayor recubrimiento posible, lo que a su vez implicaría obtener el mayor número de gotas del menor tamaño posible. En algunos casos los resultados obtenidos confirman esta asunción (Yee et al., 2001), pero en otros muchos trabajos, el propio diseño del experimento impide alcanzar conclusiones al respecto. Por ejemplo, French et al. (1992) no pueden relacionar recubrimiento y mortalidad por observar insuficientes puntos de baja mortalidad y porque los diferentes niveles de recubrimiento y mortalidad encontrados coinciden con zonas con diferentes niveles de infestación inicial. También puede ocurrir que se confundan los efectos del recubrimiento y de la cantidad de materia activa depositada, como ocurre en el trabajo de Reed y Smith (2001), ya que al variar el volumen aplicado para obtener diferente recubrimiento, se modifica la concentración de materia activa en el caldo y, por tanto la cantidad de materia activa depositada.

Algunos trabajos afirman que la disminución de depósito y de recubrimiento implican necesariamente una disminución en el control, pero no tienen en cuenta las características físico-químicas y toxicológicas de los productos ni si esto es aplicable a todos los productos o a todas las plagas (Viret et al., 2003; Armstrong-Cho et al., 2008). Es importante especificar todos estos parámetros como hacen, por ejemplo, Beattie et al. (1991), que concluyeron que existe una relación directa entre deposición

y eficacia en los tratamientos realizados con aceite mineral contra *Ceroplastes sinensis* Del Guercio (Hemiptera: Coccidae) en cítricos.

En esta tesis se considera que la eficacia de una aplicación fitosanitaria depende de dos tipos de factores: los que están relacionados con la deposición que se necesita realizar, que dependen de la plaga y el modo de actuación del producto, y los que están relacionados con el modo en que se distribuye el producto, como son la formulación, las características de retención de gotas de la vegetación, la climatología, etc. Todos estos factores son difíciles de controlar al mismo tiempo en los experimentos de campo o de laboratorio para generar modelos de eficacia de los tratamientos, pero no por ello deben ser olvidados.

## **1.1 Factores que influyen sobre las necesidades de deposición de los productos**

### 1.1.1 Modo de actuación del producto

El modo de actuación del producto está relacionado con los tamaños de impacto y uniformidad en la deposición que se necesitan. Hay productos que para actuar eficazmente necesitan entrar en contacto con la plaga (buprofezin, cipermetrina, etc), mientras que otros actúan por inhalación (pirimicarb, clorpirifos, etc) por lo que basta con acercarlos suficientemente a la plaga, aunque si bien es cierto que a menudo los productos presentan una combinación de modos de actuación (Smith D.N. et al., 1997; Cross et al., 2001; Tcheslavskaja et al., 2005; Moltó et al., 2006).

A grandes rasgos, podemos decir que dependiendo de la vía de ingreso e interacción con el cuerpo del insecto, los diferentes productos presentan las siguientes exigencias de deposición:

- Los productos que actúan por contacto requieren que la posibilidad de encuentro de los insectos con los depósitos sea elevada, lo que se consigue con un elevado recubrimiento y uniformidad de la deposición;

- Los productos que actúan por ingestión requieren su absorción por el sistema digestivo del organismo objetivo, lo que se consigue con un elevado recubrimiento para aumentar la probabilidad de que el insecto encuentre el depósito;
- Los productos que actúan como atrayentes pueden ser productos para la confusión sexual, como son feromonas naturales o artificiales, que actúan dispersándose en el aire de modo que los insectos creen seguir hembras reproductoras y mueren sin fecundarlas, o cebos alimenticios, que atraen la plaga al depósito de insecticida. Para ellos no es necesario un alto recubrimiento, ya que es más importante la capacidad de dispersión en el aire del producto y la persistencia en el tiempo, en estos casos no es tan importante maximizar el recubrimiento sino aumentar el tamaño de las gotas depositadas.
- Los productos que actúan por inhalación, en los que la acción tóxica se produce cuando penetran en forma gaseosa en el sistema respiratorio del organismo objetivo, necesitan estar presentes en una determinada cantidad por unidad de volumen para crear una atmósfera suficientemente tóxica para el insecto, pero en principio no requieren un determinado patrón de deposición;
- Los productos que actúan por asfixia física o sofocación, como los aceites minerales, actúan cubriendo los sistemas de respiración de los insectos, por lo que en principio necesitan un alto recubrimiento que consiga taponarlos.

Una vez aplicados, los productos interactúan con las plantas de manera diferente, de forma que los plaguicidas se pueden dividir en:

- Superficiales: aplicados sobre la planta permanecen en su superficie sin penetrar apreciablemente en los tejidos. En este caso la importancia del

recubrimiento depende de las exigencias del modo de actuación del producto (inhalación, contacto, etc);

- Sistémicos: el producto penetra hasta los tejidos vasculares de la planta, ya sea a través de las hojas o de las raíces, situándose en la corriente de la savia. De esta forma se trasloca, en su forma original o modificada, a diferentes partes de la planta. Cuando el insecto intenta infestar la planta se encuentra con el producto. En estos casos el recubrimiento de las partes expuestas tiene poca importancia, siempre que se deposite una adecuada cantidad por planta;
- Fumigantes: son productos altamente volátiles y son eficaces en su fase de vapor. Por ello no es necesario conseguir un elevado recubrimiento o tamaño de gota, sino que haya la suficiente cantidad de ingrediente activo en la atmósfera durante el tiempo suficiente;
- Translaminares: el producto es capaz de atravesar la cutícula y pasar a través de la lámina de la hoja pero no tiene actividad sistémica o es limitada. En este caso es importante el recubrimiento porque la movilidad del producto en la planta es muy escasa, y hay que aumentar las probabilidades de que el insecto interactúe con el producto, sobre todo si se trata de una plaga fija.

No hay que olvidar que algunos productos pueden causar fitotoxicidad. En estos casos es necesario que la concentración de los mismos no sobrepase unos determinados límites en determinadas partes de la planta, en general hojas o frutos, ya que pueden ocasionar daños irreversibles. Por ejemplo, se sabe que los fungicidas cúpricos producen fitotoxicidad sobre los cítricos y ésta aumenta con el nivel de cobre (Albrigo et al., 1997). Igualmente los fungicidas sulfúricos pueden provocar quemaduras sobre las hojas si la concentración de azufre aumenta debido a una pulverización no uniforme (Smith D. et al., 1997). Las concentraciones excesivas de

algunos aceites minerales sobre las hojas o el fruto también pueden llegar a ser perjudiciales (Beattie et al., 1989).

### 1.1.2 Características biológicas de la plaga

Las características de la plaga también determinan la deposición necesaria para su control. Las plagas y enfermedades que se fijan al sustrato vegetal, requieren un recubrimiento más o menos alto y uniforme. Así, en general, se afirma que para conseguir un adecuado control de ácaros, cochinillas y la mayoría de enfermedades fúngicas de hoja y fruto, es necesario alcanzar una determinada concentración umbral del pesticida sobre la superficie de los tejidos (Stover et al., 2002), con una distribución lo más uniforme posible de la deposición (Whitney y Salyani, 1991; Ebert y Downer, 2006). Sin embargo, las plagas más móviles pueden entrar en contacto con el plaguicida al moverse por la superficie.

También es muy importante tener en cuenta que los diferentes estadios en la evolución de un insecto pueden presentar diferente sensibilidad a cada producto, requiriendo diferente dosis, y por tanto, diferente recubrimiento (Busvine, 1971), determinando así no sólo las necesidades de deposición, sino también el momento óptimo de aplicación.

Además, hay que considerar que cada plaga tiene unas exigencias de luz y temperatura, condicionando su localización en ciertas zonas del árbol, lo que requerirá la deposición del pesticida en estas zonas, especialmente si actúa por contacto (Whitney y Salyani, 1991). Por ejemplo, hay que tener en cuenta si la plaga tiende a situarse en la parte interna o externa del árbol, o también si será necesario que la pulverización alcance el envés de las hojas (French et al., 1992), las hendiduras de los frutos, las zonas altas de la copa, etc. en los que suele ser complicado realizar una correcta deposición (Carman y Jeppson, 1974; Salyani y Whitney, 1988; Juste et al., 1990).



## **1.2 Factores que afectan a cómo se depositan los productos**

Una vez que se conocen las necesidades de deposición de un producto, hay que tener en cuenta los factores que afectan al modo en que éste se distribuye el producto, con el fin de realizar un tratamiento adecuado y conseguir dicha deposición.

### **1.2.1 La formulación del producto fitosanitario**

La mayor parte de los productos fitosanitarios que se utilizan en nuestra citricultura se distribuyen mezclados con agua. Las propiedades físicas del caldo aplicado intervienen en el proceso de formación de las gotas y, por tanto, en el transporte del producto hasta el objetivo. Asimismo influyen en la formación de gotas sobre la superficie pulverizada y, por lo tanto, en el tamaño y distribución de las deposiciones sobre la misma.

Existen numerosos estudios sobre la influencia de las propiedades fisico-químicas del caldo en las distintas fases de la pulverización, principalmente sobre el espectro de los tamaños de las gotas pulverizadas y sobre la distribución de la deposición sobre el objetivo (Haq et al., 1983; Yates et al., 1983; Bouse et al., 1986, 1988 y 1990; Salyani, 1988; Wirth et al., 1991; Stevens, 1993; Schick, 1997 y 2006; Zhu et al., 1997; Hall et al., 1993; Butler-Ellis et al., 1997; Butler-Ellis y Tuck, 1999; Miller y Butler-Ellis, 2000; Jørgensen, 2000; Butler-Ellis et al., 2001; Holloway et al., 2000; Hewitt, 2001; Stainier et al., 2006; Zabkiewicz, 2007). Las características que más influyen sobre ambos aspectos son la tensión superficial, principalmente la dinámica, y, en menor medida, la viscosidad del caldo. Para una boquilla dada, cuanto menor es cualquiera de las dos características, menor es el tamaño medio de gota.

Las propiedades fisico-químicas del caldo dependen de la formulación de los productos fitosanitarios y de las mezclas con otros compuestos que actúan como coadyuvantes (emulsificantes, surfactantes, mojantes, etc) que, en principio no tienen ninguna actividad biológica y se añaden para mejorar la calidad de la deposición e incluso aumentar la eficacia de la materia activa (Carrero, 1996).

### 1.2.2 Interacción entre el caldo y la superficie receptora

El tamaño, forma y distribución de las gotas que se depositan sobre una superficie dependen también de las propiedades físicas y la microestructura de esta superficie (Reichard et al., 1986; Mercader et al., 1995). Cuando se busca localizar el producto sobre la parte vegetal preferida por la plaga (por ejemplo, el haz o el envés de las hojas, los frutos, la madera, etc) hay que tener en cuenta las características de retención de líquidos de ésta. Por ejemplo, la superficie de las hojas puede ser rugosa, puede estar cubierta de pelos, tiene estomas o puede tener un sistema ceroso bajo la cutícula que dificulte la retención del producto. Por otro lado, las ramas de los árboles frutales suelen ser porosas y suelen retener el caldo con facilidad. Todo ello influye en la dispersión, retención y penetración de la materia activa (Wirth et al., 1991; Chow, 1993; Smith D.B. et al., 2000; Ramos et al., 2007) y ha de tenerse en cuenta tanto a la hora de planificar los tratamientos plaguicidas, como a la hora de evaluar la calidad de la aplicación.

### 1.2.3 Densidad y volumen de la vegetación

La forma y la densidad de la vegetación afectan enormemente a la deposición y la deriva del producto que se produce durante la aplicación, y dependen de la especie y variedad del cultivo, de la intensidad y forma de poda, y del momento del ciclo vegetativo (Stover et al., 2002). Gran cantidad de investigadores afirman que la variabilidad de la deposición en el interior del árbol aumenta conforme aumenta la densidad de vegetación y han concluido que ésta tiene grandes efectos sobre los depósitos y la eficacia de los tratamientos (Carman y Jeppson, 1974; Byers et al., 1984; Travis et al., 1987; Salyani y Whitney, 1990; Hall, 1991; Furness et al., 1998; Cross et al., 2001; Stover et al., 2002). También es importante el tamaño de los árboles, pues los árboles grandes o adultos suelen presentar mayor superficie foliar.

#### 1.2.4 Método de aplicación

Tanto el alcance como el tamaño de las gotas pulverizadas dependen del equipo de aplicación y su configuración (Reichard et al., 1977; Yates et al., 1985).

El equipo de aplicación, además de generar las gotas, también tiene que hacerlas llegar al objetivo. Los equipos hidráulicos lo hacen únicamente por presión mecánica, con una bomba que impulsa el líquido a través de la boquilla, que forma las gotas y las lanza a una cierta distancia. Los equipos asistidos por aire utilizan menos presión para formar las gotas y arrastran éstas con una corriente de aire producida por un ventilador. En los equipos neumáticos, una corriente de aire forma y transporta las gotas desde el orificio de salida de las boquillas.

En cualquier caso, a igualdad de volumen aplicado, con menor tamaño de gotas se obtiene un mayor recubrimiento y mayor adherencia a las hojas. Pero las gotas más pequeñas se evaporan fácilmente y se ven más afectadas por la deriva. Por otro lado, las gotas muy grandes son más fáciles de dirigir al objetivo, pero también presentan más tendencia a escurrir, lo que comúnmente se denomina escorrentía, que causa depósitos en el suelo e implica pérdida de producto e impacto ambiental. Por ello es importante conseguir un tamaño de gota adecuado para lograr los efectos de deposición que se persiguen (Moltó et al., 2006).

#### 1.2.5 Condiciones meteorológicas durante el tratamiento

Las condiciones meteorológicas en que se realiza la aplicación también influyen en el resultado del tratamiento (Göhlich, 1983). Las temperaturas excesivamente altas, mayores de 25°C, y las humedades relativas bajas, menores del 50%, favorecen la evaporación rápida de las gotas, incluso antes de llegar al objetivo. Además, vientos mayores de 2 km/h aumentan la deriva, lo que hay que considerar sobre todo cuando el tratamiento se va a realizar con máquinas asistidas por aire. Además, la lluvia favorece el lavado del producto (Franz et al., 1998; Stover et al.,

2002), por lo que es importante conocer la previsión meteorológica antes de realizar el tratamiento.

Cualquiera de las condiciones adversas antes mencionadas es habitual en verano en la Comunidad Valenciana y puede poner en peligro el éxito de los tratamientos. En concordancia con esta afirmación se ha observado que durante los meses más cálidos se obtienen mayores depósitos sobre las hojas si los tratamientos se realizan durante los momentos más frescos del día. Es importante también señalar que pulverizar cuando hay rocío sobre la superficie de las hojas mitiga los beneficios de aplicar los tratamientos en condiciones de temperatura baja y humedad relativa alta (Hoffmann y Salyani, 1996).

### **1.3 El problema de la expresión de la dosis de los tratamientos**

Para realizar un tratamiento fitosanitario hay que definir la cantidad de producto que se quiere aplicar y en cuánto caldo (Frießleben et al., 2007).

En cuanto a la cantidad de producto a aplicar, nos encontramos con que en la etiqueta de los productos autorizados en España normalmente sólo se indica la concentración de producto en el caldo, es decir la proporción de producto comercial respecto a la cantidad total de caldo, que habitualmente se expresa en unidades como  $\text{cm}^3/\text{hl}$ , %,  $\text{g}/\text{hl}$ , ppm, etc. Sin embargo, comúnmente se denomina dosis a esta concentración.

En otros países europeos las recomendaciones de las etiquetas indican como dosis de producto la cantidad de éste que se debe aplicar por unidad de superficie. Normalmente, la superficie se expresa respecto a la superficie de suelo cultivada, por lo que las unidades empleadas para expresar la dosis suelen ser  $\text{cm}^3/\text{ha}$ ,  $\text{g}/\text{ha}$ , etc. Este tipo de expresiones tiene sentido para cultivos que cubren la mayor parte del suelo, como los cereales o los cultivos hortícolas extensivos, pero no para frutales, ya que la superficie vegetal que recibe el tratamiento depende del marco de plantación (que está

relacionado con el número de árboles por superficie de suelo cultivada) y del tamaño y la densidad foliar de los árboles.

Existen multitud de trabajos sobre la dosificación de los tratamientos y la importancia de ajustar la cantidad de producto fitosanitario a las características de la vegetación (Moltó et al., 2001; Furness, 2003; Gil et al, 2005; Walklate y Cross, 2005; Solanelles et al., 2006; Siegfried et al., 2007; Pergher and Petris, 2008). Sin embargo, no existe un consenso sobre cómo hacerlo. Así, se han propuesto diversas formas de expresar la dosis, sobre todo para frutales (manzanos y perales) y viñas en espaldera. Las diferentes formas de expresión se basan en

- La altura de la vegetación, las unidades de dosificación serían kg ó l de producto por m de altura de vegetación;
- La longitud de la fila cultivada, expresando la recomendación como kg ó l de producto por m lineal de vegetación;
- El índice de superficie foliar (Leaf Area Index, LAI), para lo cual la dosificación se expresa como kg ó l de producto/unidad de LAI;
- El volumen de la fila de árboles (Tree Row Volume, TRV), que se calcula a partir de la medida de la distancia entre las filas, la altura y anchura de la vegetación y se expresa como kg ó l de producto por cada 10000 m<sup>3</sup> de volumen de vegetación en la fila y por ha;
- La superficie de pared vegetal expuesta al tratamiento (Leaf Wall Area, LWA), que se mide a través de la distancia entre filas y la altura de la vegetación y se expresa como kg ó l de producto por cada 10000 m<sup>2</sup> de pared vegetal y ha.

Es singularmente importante el modelo denominado ajuste de la dosis de pesticida al ambiente del cultivo (Pesticide dose rate Adjustment to the Crop Environment, PACE), que se emplea para frutales y depende de la anchura de calle, la altura y anchura de la vegetación y la densidad de vegetación, relacionada con una

serie de pictogramas que muestran árboles en diferentes etapas de crecimiento (Cross y Walklate, 2008).

En Australia, Furness et al. (1998) propusieron el método de la unidad de fila de vegetación (Unit Canopy Row, UCR). El método se basa en definir el mínimo volumen de aplicación requerido para mojar a punto de goteo  $100 \text{ m}^3$  de vegetación (1 m de alto x 1 m de ancho x 100 m de largo), expresado en l/100 m de longitud de fila.

Los agricultores están familiarizados con el modo de expresión de la dosis empleado en su país y la imposición de un nuevo modo de expresión sea probablemente difícil de entender, por lo que es necesario un medio para relacionar las expresiones que se utilizan en diferentes países (Toews y Frießleben, 2012). Además, es importante conocer o definir los diferentes parámetros estructurales de la vegetación y las condiciones operativas empleadas en los ensayos de registro de los productos, así como los de la propia parcela donde se vaya a realizar la aplicación (EPPO, 2012b).

En 2009 algunas industrias químicas del sector fitosanitario propusieron adoptar de manera comunitaria el sistema de expresión de dosis basado en la superficie de la pared vegetal de acuerdo con el modelo LWA, atendiendo a su facilidad de aplicación a escala productiva (Wohlhauser, 2009, 2012). Sin embargo, en la actualidad todavía no se ha llegado a un acuerdo satisfactorio porque el parámetro LWA no tiene en cuenta ni la densidad foliar ni la anchura de la vegetación, que en casos como la viña, los olivos y frutales en cultivo intensivo, y los cítricos, pueden ser decisivos a la hora de realizar una aplicación pesticida adecuada (Pergher y Petris, 2008).

En lo que respecta al volumen a aplicar en un tratamiento, se define como la cantidad de caldo que se debe aplicar en la unidad de superficie tratada. En la mayoría de las etiquetas de los productos fitosanitarios que se emplean en citricultura, no aparece y en caso de hacerlo, se expresa como el volumen de caldo a aplicar por

unidad de suelo cultivado (l/ha). Del mismo modo, las recomendaciones de los fabricantes de productos fitosanitarios y los reglamentos de Producción Integrada de cítricos se expresan de esta misma forma (BOE 2004, DOCV 2008). Sin embargo, de esta manera no se tiene en cuenta la cantidad de vegetación a tratar. Parece razonable que las recomendaciones de aplicación en fruticultura, y concretamente en citricultura deberían establecerse de otro modo, y expresarse, por ejemplo, como volumen de caldo por metro cúbico de volumen aparente de copa (por ser este un parámetro sencillo de medir por el agricultor) o, por la superficie foliar total que se desea tratar (Koch, 2007).

Dado que la dosis depende de la concentración de producto en la mezcla y el volumen de aplicación, si se fija la dosis y no se define el volumen, una misma dosis puede aplicarse con diferentes concentraciones, lo que puede llevar a la formación de diferentes depósitos de producto, más y menos concentrados, aunque la cantidad total aplicada sea la misma. Por ello, en esta tesis se decidió trabajar a concentración constante, utilizando las concentraciones registradas para cada producto, y de lo que se trata es de buscar el volumen óptimo de aplicación.

Algunos autores han desarrollado herramientas que calculan el volumen de aplicación (l/ha) a partir de la superficie foliar objetivo, definida por el Índice de Área Foliar, sobre la que se busca conseguir un determinado número de impactos por unidad de superficie. Esta cantidad de impactos es diferente según el tipo de producto (diferenciando únicamente entre insecticida o fungicida, y si es sistémico o de contacto), y se ha de producir con gotas de un tamaño específico, según la clasificación definida por la British Crop Protection Council (BCPC). De este modo se ha desarrollado una herramienta para hacer recomendaciones de tratamiento en viña (Dosaviña) (Gil, 2001; Gil y Escolà, 2009), en frutales (Dosafrut) (Planas, 2011) y en cítricos (Dosacitric) (Unidad de Mecanización y Tecnología Agraria de la UPV, comunicación personal).

En Australia se ha desarrollado una herramienta para viña y cítricos basada en el método UCR para calcular el volumen de aplicación necesario para mojar hasta punto de goteo copas de distintos tamaños (SARDI/PIRSA, 2002), siendo la concentración indicada en las etiquetas de los productos la correspondiente a utilizar con este volumen. En caso de aplicar un volumen inferior al volumen de punto de goteo, la herramienta permite recalcular la concentración necesaria para no variar la dosis de producto aplicada, pero las gotas depositadas tienen una concentración más elevada.

## **2 EL PROBLEMA DEL PIOJO ROJO DE CALIFORNIA *Aonidiella aurantii* (MASKELL) PARA LA CITRICULTURA**

### **2.1 Características del insecto que afectan a la eficacia de los tratamientos fitosanitarios**

En este apartado se resumen los aspectos relacionados con la plaga que afectan a la eficacia de los tratamientos fitosanitarios. En el Anejo 1 se hace una descripción detallada de la misma: su origen y distribución, el daño que produce y su importancia económica, su morfología y desarrollo, los factores naturales de control, las estrategias de control que actualmente se emplean y el método de cría en laboratorio.

El piojo rojo de California es una plaga muy importante para la producción cítrica mundial y es una de las más dañinas en España (Tena y García-Marí, 2011). En el sector cítrico de la Comunidad Valenciana tiene una importante influencia económica ya que desde su detección en los años 80 su presencia se ha ido incrementando. Presenta una serie de características que la hacen especialmente difícil de manejar. Una característica importante es que este insecto desarrolla un escudo que acaba cubriendo totalmente el cuerpo de los individuos, protegiéndolos frente a las agresiones físicas y químicas del medioambiente. La formación de este escudo es progresiva y aumenta su capacidad protectora a medida que se desarrolla.



En el estado larvario móvil (*crawler*) no existe, en los machos alcanza su máximo desarrollo en el segundo estadio de crecimiento y en las hembras en el tercero, cuando son plenamente adultas, existiendo también en este estadio un velo ventral que aumenta su protección frente a las agresiones. Esto implica que los individuos presentan diferente sensibilidad a los métodos de control según el estadio en que se encuentren, disminuyendo ésta a medida que avanza su desarrollo y que las fases más jóvenes son las más sensibles a los tratamientos (Busvine, 1971).

Dentro de una población, el desarrollo de los individuos no es homogéneo, por lo que normalmente se observa la coexistencia de individuos con diferentes estadios de crecimiento. La proporción de individuos de cada estadio varía a lo largo de la campaña. En las condiciones climáticas españolas se observan normalmente de 3 a 4 generaciones. De ellas, suele haber más homogeneidad en la primera, mientras que en las generaciones posteriores la emergencia de las larvas es más escalonada.

Para que el control sea lo más eficaz posible, en cada generación hay que buscar el momento en que el porcentaje de estadios sensibles frente al total es máximo, lo que estrecha la ventana del momento de tratamiento. El momento en que se alcanzan estos máximos es diferente cada campaña, ya que depende de las condiciones climáticas de la misma, por lo que es necesario hacer un seguimiento de la evolución de las poblaciones.

Otra característica que dificulta el control del piojo rojo es su preferencia por situarse en zonas del fruto que en un principio son difíciles de alcanzar con los tratamientos fitosanitarios, como son las axilas de las yemas o las irregularidades y hendiduras de la superficie de los frutos (Beardsley y González, 1975). Conforme avanzan las generaciones en el año las preferencias de localización dentro de la planta, favorecen la posibilidad de ser alcanzado por los tratamientos. Prefiere el fruto en primer lugar, seguido de ramas verdes y hojas, siendo la madera el sustrato menos favorable para su desarrollo, y el follaje el más uniforme y adecuado para el establecimiento de la cochinilla (Carroll y Luck, 1984; Hare et al., 1990).

También hay que tener presente que en nuestras condiciones climáticas el piojo rojo de California se desarrolla normalmente desde finales de mayo hasta septiembre-octubre, temporada en la que suelen darse muchas de las condiciones meteorológicas adversas para realizar pulverizaciones.

Según algunos autores, la necesidad de una buena distribución del producto es crítica para el control de esta plaga (Salama y Amin, 1983; Georgala, 1984), incluso más que en otras. En este sentido, Jeppson y Carman (1974) concluyeron que la aplicación de tratamientos a bajo volumen para el control del ácaro rojo (*Panonychus citri* McGregor) y el piojo rojo de California resultaba en una mayor reducción de la eficacia sobre éste último. Pero en este trabajo los autores comparan diferentes productos para ambas plagas, diferentes modos de aplicación y diferentes concentraciones, por lo que hay una gran confusión de efectos que no permiten concluir que las diferencias de eficacia observadas se deban exclusivamente al volumen.

Otro aspecto importante a considerar es que se han encontrado poblaciones resistentes a los productos fitosanitarios cuando se aplican de manera continuada en varias regiones cítricas del mundo, como son Sudáfrica (Bedford, 1998a,b), Australia (Smith D. et al., 1997), California (Grafton-Cardwell y Vehrs, 1995), etc. Por este motivo se han dejado de utilizar algunas materias activas y se han tenido que encontrar materias o métodos alternativos de control (ver Anejo 1).

## **2.2 Influencia del modo de cultivo: características diferenciales de los cítricos en la Comunidad Valenciana**

Las características de la vegetación influyen en la distribución del producto. Los cítricos, en general, presentan una gran densidad foliar, mucho mayor que otros frutales, lo que dificulta alcanzar determinadas partes del árbol o conseguir recubrimientos uniformes y suficientes. Su alta densidad foliar exterior puede llegar a formar una pantalla de hojas que puede desviar cantidades considerables de la

pulverización, lo que aumenta las pérdidas si lo comparamos con árboles de otros cultivos de tamaño similar (Johnson, 1997), o incluso pueden impedir el movimiento adecuado del aire si se emplean los equipos asistidos por aire.

Los cítricos también se caracterizan por tratarse en general de árboles grandes, con tendencia a tener una forma globular. Además, en la Comunidad Valenciana, con la poda se favorece la formación redondeada de la copa y se dejan las faldas muy cercanas al suelo, lo que dificulta el alcance de la pulverización a todas las zonas de la vegetación.

La gran abundancia de minifundismo en la citricultura valenciana supone la existencia de un gran número de pequeñas parcelas, que se gestionan de maneras diferentes, lo que provoca, entre otras cosas, que haya árboles de edades y variedades muy diversas, así como diferentes formas de poda, marcos y esquemas de plantación, como se observa en la fotografía aérea adjunta (Figura III-1), por lo que las recomendaciones de los tratamientos no pueden ser generalizadas y han de tener en cuenta estas particularidades, no sólo de los cítricos en general, sino de las características de la vegetación particular en cada caso.



*Figura III-1. Fotografía aérea del área citrícola del término municipal de Museros (Valencia, España) (Fuente: Visor de SigPac del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente).*

## **2.3 Equipos para la aplicación de productos fitosanitarios en citricultura**

Muchos tratamientos en la Comunidad Valenciana se realizan con tanque y pulverizador de pistola, ya que abundan las parcelas de pequeño tamaño. Sin embargo el coste de la aplicación es muy elevado, por el tiempo y la mano de obra necesarias. En las fincas de gran tamaño estos sistemas tienden a sustituirse por equipos hidráulicos asistidos por aire que disponen de un ventilador axial. Algunos agricultores tienen reticencias a la sustitución del tratamiento a pistola por el tratamiento con atomizador asistido por aire, ya que existe la creencia de que podría reducirse la eficacia de los tratamientos por proporcionar un menor mojado (Durbá y García-Marí, 2006), aunque en la actualidad este sistema ya se utiliza para aplicar el 58% de los tratamientos, frente al 42% en el que se emplea la pistola (Cunha et al., 2012).

En general, los tratamientos no son capaces de producir un recubrimiento uniforme en toda la copa. Normalmente suelen producir menores recubrimientos en la parte alta de la copa, debido a la mayor distancia que tienen que recorrer las gotas desde las boquillas, a menudo atravesando la densa vegetación (Carman, 1977b; Cunningham y Harden, 1998a). Del mismo modo, en el interior de la copa suele observarse menor recubrimiento, lo que puede generar problemas en el control de plagas que se sitúan en las zonas internas (Juste et al., 1990).

En Australia se emplean pulverizadores hidráulicos con boquillas oscilantes, sin asistencia del aire (Furness y Pinczewski, 1985). El problema es que estos equipos aplican mayores volúmenes de caldo, y producen gotas de mayor tamaño, lo que aumenta el riesgo de mayores pérdidas por escorrentía. Además, en Australia y Estados Unidos también se emplean equipos que aplican corrientes de aire desde arriba, con ventiladores situados en una especie de torre, que permiten obtener un mayor depósito con un volumen más bajo, sin embargo en algunos casos disminuye el nivel de control de la plaga (Cunningham y Harden, 1999), pese a aumentar la

deposición en la parte alta de la copa (Farooq y Salyani, 2002). Furness et al. (2006) evaluaron un nuevo sistema con múltiples cabezas con ventiladores incorporados, determinando que mejoran la deposición y la eficiencia. Sin embargo, suelen ser máquinas grandes, que no se ajustan a las parcelas que habitualmente se encuentran en la Comunidad Valenciana.

## **2.4 Productos que actualmente se emplean para el control de piojo rojo de California**

En España hay una serie de productos fitosanitarios autorizados para el control de cochinillas en cítricos. En el Registro de Productos Fitosanitarios del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (consultado el 31/10/2012) (MAGRAMA, 2012a) aparecen los siguientes grupos de materias activas:

- Reguladores del crecimiento:
  - Fenoxicarb: actúa por contacto e ingestión. Su modo de acción se basa en mimetizar la hormona juvenil que producen varios grupos de insectos. Esta hormona es responsable de mantener las características larvales de los individuos y prevenir que se transformen en adultos antes de completar su crecimiento. Cantidades anormales de hormona juvenil producen la muerte de huevos y larvas y evitan la reproducción al inhibir la maduración de los organismos.
  - Piriproxifen: actúa por contacto e ingestión. Su modo de acción también se basa en mimetizar la hormona juvenil, interfiriendo en el desarrollo de insectos sensibles al inhibir procesos naturales como la metamorfosis, embriogénesis y reproducción.
- Organofosforados: son inhibidores de la acetilcolinesterasa, por lo que provocan la acumulación excesiva de acetilcolina,

neurotransmisor responsable de interrumpir la transmisión del impulso nervioso, lo que provoca una sobreestimulación que resulta mortal para los insectos. Entre ellos destacan

- Clorpirifos: actúa por contacto, ingestión e inhalación.
  - Metil-clorpirifos: actúa de manera similar.
  - Dimetoato: sistémico, con actividad por ingestión y contacto.
  - Fosmet: actividad predominante por contacto.
- Limonoides: actúan principalmente como reguladores del crecimiento, inhibiendo la producción de ecdisoma, lo que interfiere en la muda de los insectos. También tienen propiedades disruptivas de la alimentación y disuasorias de la oviposición. La azadiractina es uno de ellos y actúa por contacto o ingestión.
- Aceites minerales: Actúan ocluyendo las vías respiratorias de los insectos, lo que produce su asfixia. Para aumentar su eficacia se les añaden aditivos que mejoran su capacidad de extenderse (mojantes) y por ello a menudo se mezclan con otros productos que también requieren gran recubrimiento. También se les supone un cierto efecto tóxico, posiblemente causado por algunos aditivos o por la presencia de dobles enlaces en las cadenas de hidrocarburos que los forman. La calidad de los aceites minerales puede considerarse que depende de su residuo insulfonable. Una primer clasificación distingue entre aceite de invierno (residuo insulfonable 70-90%) o de verano (residuo insulfonable 90%). Kuhlmann y Jacques (2002) establecieron una clasificación basada en el número equivalente de hidrocarburos de cadena lineal (número de hidrocarburos de cadena lineal con el punto de destilación igual al punto de destilación medio del aceite

considerado,  $nCy$ ) y la diferencia de  $nCy$  entre el punto de destilación inicial y el final (rango de  $nCy$ ), distinguiendo entre:

- Aceite mineral (MO): sólo destilados de petróleo virgen, con  $nCy > 16$
- Aceite mineral para agricultura (AMO): MO con residuo insulfonable  $> 92\%$ , % carbonos parafínicos  $> 60\%$  y  $nCy$  entre 18 y 21 o entre 25 y 27
- Aceite mineral para horticultura (HMO): AMO con  $nCy$  entre 21 y 25, y rango de  $nCy$  entre 5 y 6

Las dos últimas categorías se pueden emplear sobre las hojas, por ser las más refinadas, pero sobre plantas perennes, como los cítricos, es más recomendable el uso de HMO, para evitar la fitotoxicidad (Beattie y Hardy, 2005).

Dos de los productos más empleados por los productores en la actualidad para el control del piojo rojo de California y que además están recomendados en GIP (DOCV, 2012), son los organofosforados y los aceites minerales, productos evaluados en esta tesis.

Los organofosforados clorpirifos y metil-clorpirifos, se aplican indistintamente en cualquier generación ya que, aunque los primeros estadios son los más sensibles, atacan a todas las fases de desarrollo. Sin embargo, debe tenerse en cuenta 1) que está reglamentado el límite máximo de residuos que puede aparecer en la fruta, por lo que no se pueden utilizar en épocas cercanas a la recolección; y 2) que según la normativa de Producción Integrada, clorpirifos sólo se puede aplicar una vez al año en naranjos y dos en mandarinos.

Los aceites minerales al actuar principalmente por asfixia, en principio deben afectar del mismo modo a todos los estadios. No producen problemas de residuos en la cosecha y por ello se pueden aplicar en todas las generaciones de la campaña. No

se conoce que produzcan resistencias en las poblaciones, pero se debe tener en cuenta su posible fitotoxicidad cuando se emplean a temperatura ambiente alta.



**CAPITULO IV MODELIZACIÓN DE LA RELACIÓN  
DEPOSICIÓN Y EFICACIA BIOLÓGICA  
CONTRA *Aonidiella aurantii***

---



Una manera de reducir la dosis de pesticidas en los tratamientos fitosanitarios consiste en la limitación de los volúmenes de aplicación empleados. Sin embargo, ¿cuánto se pueden reducir estos volúmenes sin que se vea afectada la eficacia de los tratamientos? Para responder a esta cuestión es necesario estudiar las relaciones existentes entre deposición del producto fitosanitario y su eficacia, con el fin de determinar el volumen óptimo de caldo que deposite en los árboles la cantidad suficiente que consiga la máxima eficacia. Además, hay que tener en cuenta que dada la diferente naturaleza de los productos fitosanitarios, su forma de acción, su formulación, etc, es de esperar que dicha relación varíe en función del tipo de producto e incluso de un producto a otro dentro del mismo tipo de productos. En este capítulo se estudia el efecto que el cambio de volumen depositado provoca sobre la distribución de los distintos productos y sobre la eficacia de los tratamientos, con el fin de determinar la relación del patrón de deposición y la eficacia biológica.

Para ello se decidió realizar una serie de experiencias en condiciones de laboratorio donde se puede acotar el número de los factores de estudio y se limita su variabilidad. Por ejemplo, en el laboratorio se pueden controlar las condiciones ambientales en que se desarrollan los insectos. Además, se puede controlar el nivel de infestación y el estadio de desarrollo sobre el que se aplica el tratamiento, ya que se trabaja con una población que se mantiene en el propio laboratorio (Ver Anejo 1). Otras ventajas de realizar estos ensayos en condiciones de laboratorio es que se elimina la interferencia de la acción de los enemigos naturales sobre la población con la que se experimenta y además, la pulverización se puede realizar directamente sobre la plaga, sin obstáculos que impidan que el producto alcance el objetivo y se puede evaluar fácilmente la forma y la cantidad de la deposición.

En este capítulo se describen los ensayos para establecer relaciones entre la deposición de los productos y su eficacia biológica. La metodología y los resultados de estos ensayos se presentan en dos apartados, cada uno de ellos dedicado a un grupo de productos: el primero se realiza con insecticidas organofosforados (extraído de

Garcerá et al., 2011) y el segundo con aceites minerales (extraído de Garcerá et al., 2012).

# **1 EFFECT OF SPRAY VOLUME OF TWO ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES ON COVERAGE AND ON MORTALITY OF CALIFORNIA RED SCALE *Aonidiella aurantii* (MASKELL)**

*Based on the publication in Crop Protection (2011) 30 (6), pp. 693-697*

## **1.1 Introduction**

Organophosphate insecticides have been used worldwide to control CRS in citrus producing regions (Carman, 1977a; Grout and Richards, 1992; Levitin and Cohen, 1998; Martínez-Hervás et al., 2005). Among them, chlorpyrifos has been particularly widely used due to its high efficacy (Grafton-Cardwell et al., 2009). It is well known, however, that their application can have significant adverse environmental effects (FAO, 2008). Moreover, during the last few years some problems with residues of organophosphate insecticides after harvest (especially chlorpyrifos) started to occur in the citrus industry, a problem associated with the repetitive and excessive use of these active ingredients (Coscollá, 2003, 2007).

A way to restrict contamination by pesticides is through the reduction of the amount of active ingredient (a.i.) delivered per unit area of cultivation. This could be achieved by 1) decreasing the concentration of a.i. in the solution whilst maintaining the water volume, or 2) decreasing the water volume applied whilst maintaining the recommended concentration.

Reduction of the concentration does not seem advisable, since concentration is one of the parameters that are tested and established as part of the legal registration of a commercial insecticide (minimal concentration to achieve a certain guaranteed efficacy).

Nowadays, organophosphate field treatments against CRS use high volumes of water to maximize the probability of reaching the insects on the tree canopy.

Nevertheless, it is necessary to know how far these volumes can be reduced without affecting the efficacy of applications.

Some studies have been conducted to analyze the effect of the sprayed volume in the efficacy of control of pesticides but against other pests and/or using other products. McCoy et al. (1989) did not find differences in control efficacy by changing sprayed volumes of different acaricides against *Phyllocoptruta oleivora* Ashmead (Acari: Eriophyidae). In the same way, no differences were found in the control of *Coccus pseudomagnoliarum* Kuwana (Hemiptera: Coccidae) with petroleum derived spray oils by Chueca et al. (2009). Conversely, other authors found differences in efficacy dependent on the sprayed volume at constant concentration: Beattie et al. (2002) for applications of a mineral oil against soft and armoured scales, Grout and Stephen (1993) for applications of a mineral oil against CRS, and Cunningham and Harden (1999) for methidathion applications against this same pest.

Spray volume is the volume of spray solution that is emitted from the nozzles of the sprayer per unit area of ground, but it should be remarked that the important factor as far as efficacy is concerned is which part of this volume reaches the target and how it is distributed on the surface of the plant. It is widely known that physicochemical properties of formulations affect droplet size spectrum (Haq et al., 1983; Yates et al., 1983; Bouse et al., 1990) and thus deposition pattern (Spillman, 1984; Salyani, 1988; Zabkiewicz, 2007).

Because of the above-mentioned facts, this study was carried out to determine the optimal volume of solution to be applied for controlling different stages of CRS when using one of two organophosphate pesticide products containing two different active ingredients registered for citrus against this pest: chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl. Three parameters that describe spray deposition (coverage, average size of impacts and number of impacts per unit area) were studied in order to determine how different applied volumes change these distributions and affect the efficacy of the

treatments. The final goal was to determine the relationship between the deposition pattern and the efficacy of CRS control.

## **1.2 Materials and methods**

Two experiments were conducted to study the effect of spray volume on (1) deposition, and (2) efficacy against different stages of CRS under laboratory conditions. In both experiments, two commercial organophosphate insecticides were used: Dursban® 75 WG (a.i.: chlorpyrifos 750 g/kg WG) (Dow AgroSciences Ibérica, Madrid, Spain) and Reldan® E (a.i.: chlorpyrifos-methyl 224g/l EC) (Dow AgroSciences Ibérica). Both products were used at maximum label concentration, 1.25 g/l for Chlorpyrifos-based product (CBP) and 4 ml/l for Chlorpyrifos-methyl-based product (CMBP). In the efficacy study, a control treatment with water was included. The spray volumes used for both experiments were 1, 2, 3 and 4 ml, applied by means of a Potter Tower. This last volume was the greatest spray volume tested because, at higher volumes, the droplets coalesced producing a surface of liquid that ran off from the target surface. These volumes were used since, in preliminary tests, a wide range of coverage levels that could be achieved in field treatments were obtained with these spray volumes.

As mentioned above, these volumes were applied with a Potter Spray Tower (Burkard Scientific Co., Uxbridge, United Kingdom), fitted with its nozzle giving the finest spraying (internal diameter: 0.762 mm) (Potter, 1952) (See a full description of the equipment in the Annex 2). The pressure was fixed at 0.1 MPa. It was calibrated before each experiment, since the volume of the solution that reached the base of the tower was very low compared with that sprayed at the upper end of the tower. The amount of solution deposited per unit area ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) at the base of the tower for each applied volume was estimated by a series of tests carried out as follows: Different volumes of water were sprayed onto Petri dishes of known surface area. The Petri dishes were weighed before and after application using an analytical balance (XR 205 SM-DR, Precisa Instruments Ltd., Dietikon, Switzerland). The time between spraying

and weighing was very short (around two seconds); therefore, evaporation was so small that it was decided to be disregarded. Five replicates per volume tested were performed. The average increase of weight produced by the deposition of the droplets of the solution per unit area was calculated. From these data, the amount of a.i. per unit area for each organophosphate pesticide treatment was estimated (Table IV-1).

*Table IV-1. Estimated amount of active ingredient deposited per unit area ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (Mean and SE\*) for the four volumes of solution and for each organophosphate pesticide sprayed with the Potter tower onto Petri dishes.*

Sprayed (ml)	Volume		Active ingredient deposition ( $\mu\text{g}/\text{Cm}^2$ )			
	Deposited on the target surface ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ )		Chlorpyriphos		Chlorpyriphos-methyl	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
1	1.008	0.040	0.945	0.037	0.903	0.036
2	2.030	0.079	1.903	0.074	1.819	0.071
3	3.410	0.095	3.197	0.089	3.055	0.085
4	4.722	0.089	4.427	0.083	4.231	0.080

\*SE = Standard Error

### 1.2.1 Study of deposition.

To study the effect of the spray volume on deposition, four spray volumes with three solutions (water, CBP and CMBP) were compared.

White polyvinyl chloride (PVC) collectors (4.5 x 4.5 cm) were used as artificial targets whose drop retention behaviour is similar to that of citrus leaves (Mercader et al., 1995) (Figure IV-1). Collectors were sprayed with the corresponding solution; adding 20 mg/l of iron chelate (Sequestrene 138 Fe G-100, Syngenta Agro S.A., Madrid, Spain) as a dye to produce a high drop/background contrast, required for subsequent image analysis. Five replicates for each combination of solution and spray volume were performed.





*Figure IV-1. Example of spray distribution on a citrus leaf and a PVC collector.*

Sprayed collectors were photographed with 20 pixels/mm resolution with a digital camera (Epson PhotoPC 750Z, Seiko Epson Corporation, Nagano, Japan), assembled to a column (column of the Polaroid MP-4 Land Camera, Minnetonka, Minnesota, U.S.) to adjust the camera to a constant height of 27.5 cm. Pictures were taken under similar illumination conditions. Illumination system consisted of a supportive aluminium hood and two fluorescent circular tubes (Philips, TLE 22W/54 y TLE 32W/54, Philips & Co., Eindhoven, The Netherlands) (Figure IV-2).



*Figure IV-2. Photography set (illumination system, column and digital camera)*

Images were analyzed with specific software (Matrox Inspector, version 2.2, MatroxTM, Dorval, Canada) following the methodology described by Chueca et al.

(2010) (Figure IV-3). A calibration procedure was used each time the software was started to set magnification in both horizontal and vertical directions. Image analysis consisted of three steps. In step 1, a 3- by 3-cm area of each collector was randomly selected for image analysis. In step 2, the pictures were converted to grey scale (from 0 to 255 grey levels). In step 3, the pictures were converted to binary black and white. B&W segmentation was set by adjusting the grey level threshold to each image: the low grey level was always set to white; the upper gray level threshold was set by the operator by toggling the sliding tuner and comparing the size of selected spots both in the grey area selected and the binary image. Adjusting the grey level threshold for each image was necessary. The area corresponding to impacts of droplets was calculated by the software by dividing the total number of black pixels by the total number of pixels in the selected image area. Objects in the image constituted by one single pixel were considered as noise and thus removed. Therefore, impacts less than 50  $\mu\text{m}$  diameter were not necessarily detected. In each image, the program detects all the impacts (deposited droplets produced by the spray over the collector) bigger than  $2.5 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2$ , and then calculates three parameters to describe deposition: coverage (%) (Percentage of the total surface covered by the impacts), mean size of impacts ( $\text{mm}^2$ ) and number of impacts per unit area (No. of impacts/ $\text{cm}^2$ ).

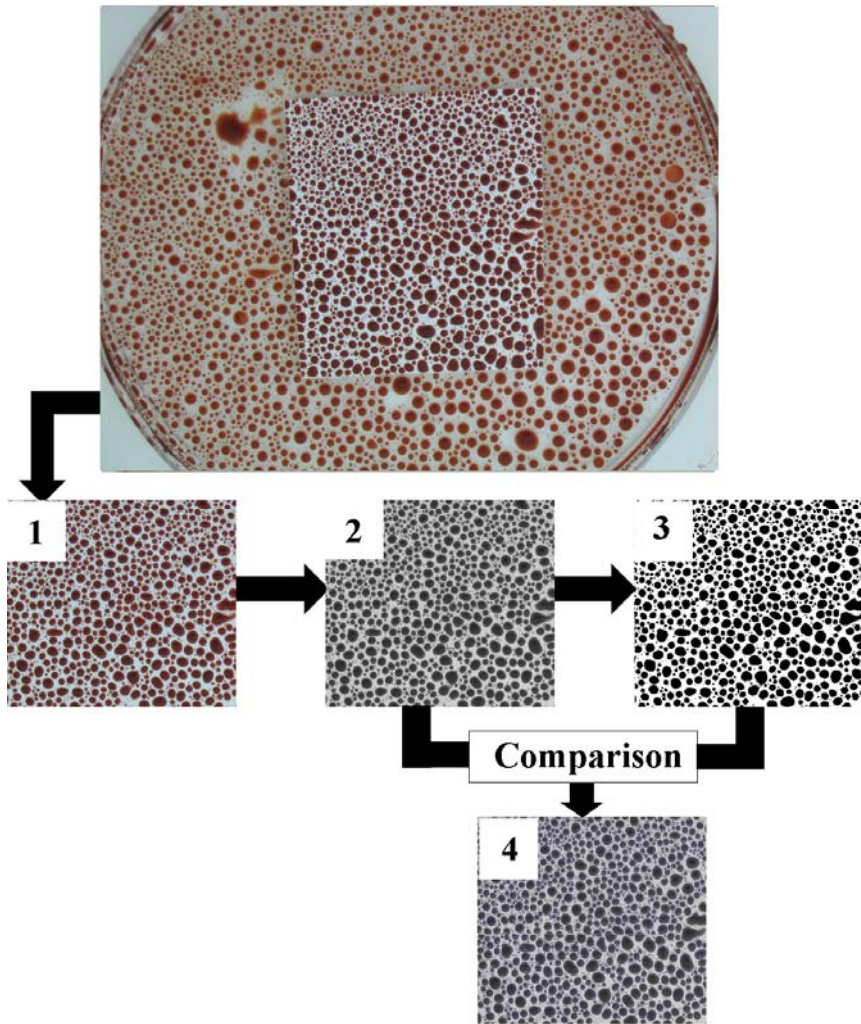


Figure IV-3. 3-steps image-analysis procedure of the pictures taken of the PVC collectors. 1. Trimmed picture; 2. Grey scale picture; 3. Black&White picture; 4. Segmented picture (each impact has a number)

### 1.2.2 Study of biological efficacy.

To study the effect of the different spray volumes on the efficacy of pesticides against CRS, the same four spray volumes of each pesticide solution (CBP and CMBP) were applied on lemons infested with CRS populations in four groups of stages of development. These groups of stages were labeled as follows (each one

included the growth stages shown in brackets): N1 (white cap stage and first molt), N2 (second instar and second molt), N3 (third instar and gravid females) and PP (prepupal and pupa males). A control treatment (only water) was also included. Each lemon fruit was used as one replicate. Five replicates of each combination of stage, solution and spray volume were performed.

Lemons were infested following the protocol developed by Pina (2006): Briefly, clean lemons were partially covered with wax, leaving a clean surface (arena) of about 16 cm<sup>2</sup>, by dipping them in molten paraffin while the long axis of the fruit was held horizontal, so that the level of paraffin slightly surpassed the stem and blossom ends. The paraffin film reduced desiccation and avoided the spreading of CRS individuals. Lemons were big enough relative to the size of the arena so that the arenas could be considered flat. The arenas were kept horizontal during and after spraying.

The infestation procedure was as follows: Each of the waxed lemons was put on the top of black paperboard tubes (10 cm high and 3 cm base diameter) with the unwaxed surface up. On the bottom of each tube, a lemon infested with hundreds of reproducing CRS females, from a colony maintained under laboratory conditions, was put with the unwaxed surface up. Fluorescent lights were placed over this set up to attract crawlers from the infested lemons to the arenas for 24 hours (See Annex 1). After crawlers reached the “white cap” stage, lemons with more than 50 fixed scales were removed and placed in a tray until around 90% of individuals had reached the corresponding stage for each test. This time was around 5 days to reach the N1 stage, 9 days for the N2 and 15 days for the N3 and the PP stages. To guarantee that the corresponding development stage had been reached, the scales on the infested lemons were checked before treatment. Trays and colonies were kept in chambers at a temperature of  $26 \pm 3$  °C,  $50 \pm 5\%$  relative humidity (RH) and continuous light.

Before being sprayed, about 50 healthy scales per lemon of the corresponding stage were circled with a permanent marker (Lumocolor F width, Staedtler Mars

GmbH & Co. KG, Germany) (Figure IV-4). Ten days after treatment, the numbers of dead and live scales from those that have been circled were recorded. N1, N2 and PP scales that had not matured to the next stage were considered dead. N3 scales were considered dead when their body under the shield had a dry, thin and flat appearance. Specifically gravid females, which are completely enclosed, were turned over, their veil was broken and the appearance of the individual was checked. Mortality rates were calculated as the ratio of dead individuals to the total checked individuals (alive and dead).



*Figure IV-4. Scales circled on a lemon skin.*

### 1.2.3 Data analysis.

A two-factorial analysis of variance (MANOVA) was performed for each deposition variable studied (coverage, mean size of impact and number of impacts per square centimetre). The two factors were the “deposited spray volume” and the “pesticide” (CBP, CMBP and water).

In order to study the efficacy of the treatments, Dunnett’s test (Dunnett, 1955) was used to compare N1, N2, N3 and PP mortality of control (only water) and organophosphate treatments for each spray volume. When significant differences were found, efficacies of the two products were calculated using the Schneider-Orelli formula (Schneider-Orelli, 1947) (Equation IV-1). These efficacies were the dependent variable in a two factor MANOVA performed for each pesticide. In these

tests, the factors were “deposited spray volume” ( $\mu\text{l solution/cm}^2$ ) and “CRS stage” (N1, N2, N3 and PP).

$$\% \text{Efficacy} = \frac{\% \text{Mortality in treated} - \% \text{Mortality in control}}{100 - \% \text{Mortality in control}} \times 100 \quad \text{IV-1}$$

Both in the study of deposition and in the study of biological efficacy, the ANOVA assumption of normal distribution of residues was assessed by Shapiro-Wilk test (Shapiro and Wilk, 1965) and the assumption of homocedasticity by Levene’s test (Levene, 1960). After MANOVA in both studies, Fisher's LSD test (Fisher, 1935) was used for mean comparisons. All tests were considered at the 95% confidence level and were carried out with Statgraphics® Plus version 5.1 software (STSC Inc., 1987).

### 1.3 Results

#### 1.3.1 Study of deposition.

The Figure IV-5 shows some collectors sprayed with the different treatments tested.

The interaction between the factors, deposited spray volume and product, was significant for coverage ( $F = 2.51$ ;  $df = 6, 75$ ;  $P = 0.0306$ ), mean size of the impacts ( $F = 1738.82$ ;  $df = 6, 72$ ;  $P < 0.0001$ ) and number of impacts per unit area ( $F = 4.13$ ;  $df = 6, 70$ ;  $P = 0.0016$ ). The increase of spray volume deposited caused an increase of coverage (%) of the three solutions tested (Figure IV-6A). The greatest coverage values were obtained with CMBP for all deposited volumes (from approximately 22% at  $1.01 \mu\text{l/cm}^2$  to approximately 62% at  $4.72 \mu\text{l/cm}^2$ ). CBP produced the lowest coverage values for all spray volumes, except for  $2.03 \mu\text{l/cm}^2$  where CBP produced coverage similar to that of water (from approximately 11% at  $1.01 \mu\text{l/cm}^2$  to approximately 43% at  $4.72 \mu\text{l/cm}^2$ ). The differences of coverage between CBP and CMBP were approximately 10-20%. The values for water were between those of the two pesticide treatments.













<b>Volumen Caldo</b>	<b>1000 <math>\mu</math>l</b>	<b>2000 <math>\mu</math>l</b>	<b>3000 <math>\mu</math>l</b>	<b>4000 <math>\mu</math>l</b>
<b>Agua</b>				
<b>CBP (0.125%)</b>				
<b>CMBP (0.4%)</b>				

Figure IV-5. Example of collectors sprayed with the organophosphate tested solutions

No significant differences of mean size of impacts ( $\text{mm}^2$ ) were found between water and CBP for all deposited volumes, except for the highest ( $4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ), in which CBP produced 3 times larger mean size of impacts than water (Figure IV-6B).

For the lowest spray volume of  $1.01 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ , no significant differences of mean size of impact were found among the three solutions. However, CMBP produced significantly greater values of mean size of impacts than water and CBP for volumes deposited starting from  $2.03 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ . These values ranged from  $3.68 \text{ mm}^2$  at  $3.41 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  to  $19.94 \text{ mm}^2$  at  $4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ .

An increase in deposited spray volume caused a decrease in number of impacts per square centimetre for the three solutions tested (Figure IV-6C). This was because the droplets merged together on the target, thus increasing the size of the impacts. Water produced the greatest number of impacts per square centimetre for all spray volumes (approximately  $770 \text{ impacts}/\text{cm}^2$  at  $1.01 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  and approximately  $270 \text{ impacts}/\text{cm}^2$  at  $4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ). The curve produced by CBP decreased approximately in parallel to that of water treatment, but with a difference of 200-300  $\text{impacts}/\text{cm}^2$  at each volume, with lower values for CBP. CMBP produced the lowest number of impacts per square centimetres at all volumes ( $170 \text{ impacts}/\text{cm}^2$  at  $1.01 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  and  $10 \text{ impacts}/\text{cm}^2$  at  $4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ). There were no significant differences in the number of impacts per square centimetre between the spray volumes of  $1.01$  and  $2.03 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  for any of the tested solutions. For water and CBP solutions, significant differences were found between these volumes and  $3.41 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  and between this and the highest volume ( $4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ). For CMBP, there were no significant differences between the two highest volumes, but there were significant differences between these volumes and the lowest ( $1.01 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ).



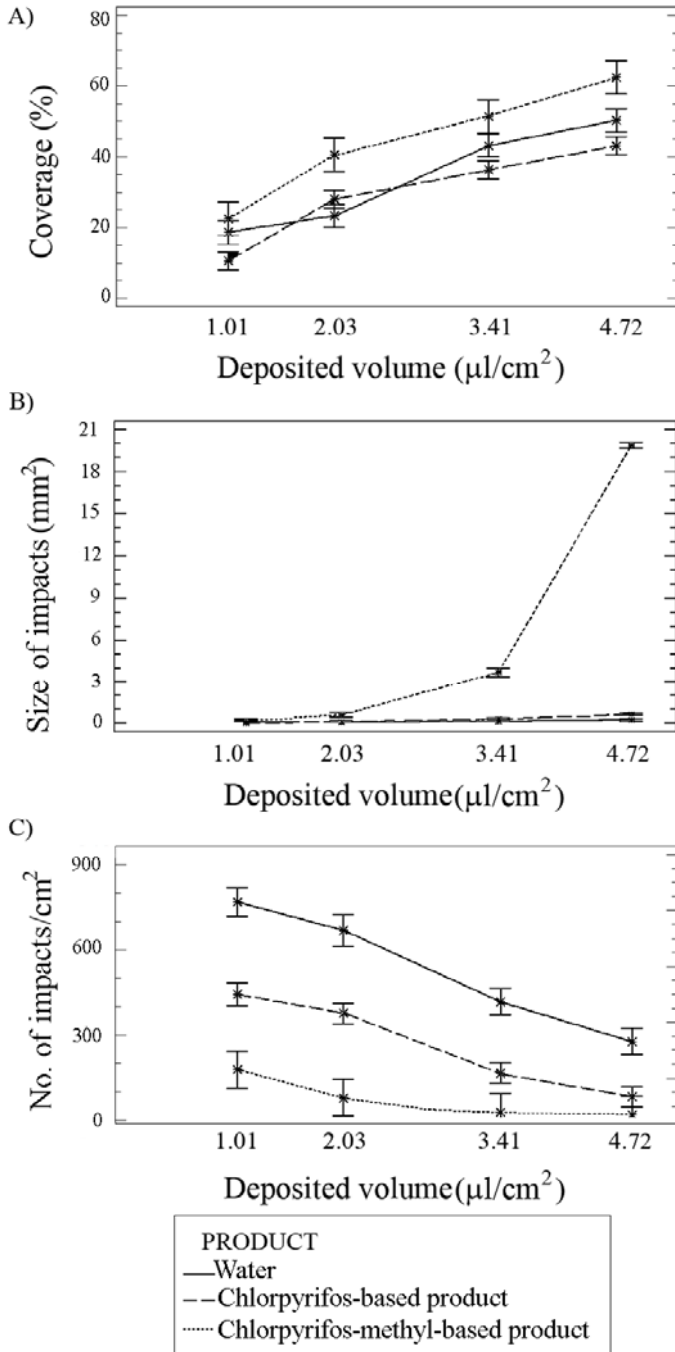


Figure IV-6. Interaction between the factors “deposited volume” and “product” for (A) coverage, (B) mean impact size, and (C) number of impacts per unit area.

### 1.3.2 Study of biological efficacy.

N1, N2, N3 and PP mortalities produced by both pesticide solutions differed significantly from the water control (Dunnett test,  $P < 0.05$ ). The mortality percentages for water controls were 12.50% (SE=3.49%) for N1, 8.42% (SE=1.24%) for N2, 0.8% (SE=0.8%) for N3 and 7.94% (SE=3.59%) for PP.

The effect of spray volume on the efficacy of CBP and CMBP against CRS depended on the stage for both organophosphate pesticides. The interaction of the two factors, spray volume and stage, was significant for CBP ( $F = 5.83$ ;  $df = 9, 82$ ;  $P < 0.0001$ ) (Figure IV-7A) and for CMBP ( $F = 9.83$ ;  $df = 9, 78$ ;  $P < 0.0001$ ) (Figure IV-7B). However, trends apparently differed for the two pesticides.

Differences of spray volume did not statistically affect efficacy against N1 and N2 stages for both insecticides. For these stages, efficacies ranged between 88-100% whatever the spray volume applied.

The effect of volume was significant when CBP was applied against the PP stage. The efficacy increased from 63% with the volume of  $1.01 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  to 85% with  $2.03 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ , but with the subsequent volumes, the efficacy did not increase. When CMBP was applied against PP, there were significant increases of efficacy, from 76% with the volume of  $1.01 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  to 97% with  $3.41 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ . No significant increase of efficacy was found with volumes higher than  $3.41 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ .

The effect of spray volume was also significant for the N3 stage for the two pesticides. In the case of CBP, there were no significant differences between  $1.01 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  and  $2.03 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ , with an average efficacy around 45%. However, an increase in volume to  $3.41 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  did affect efficacy, which increased significantly to 68%. Despite the rise of volume to  $4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ , average efficacy did not change significantly. When CMBP was applied, efficacy against N3 increased significantly at every volume from 4% to 68%, except for the highest volume (significant differences between  $3.41 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  and  $4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  were not found).

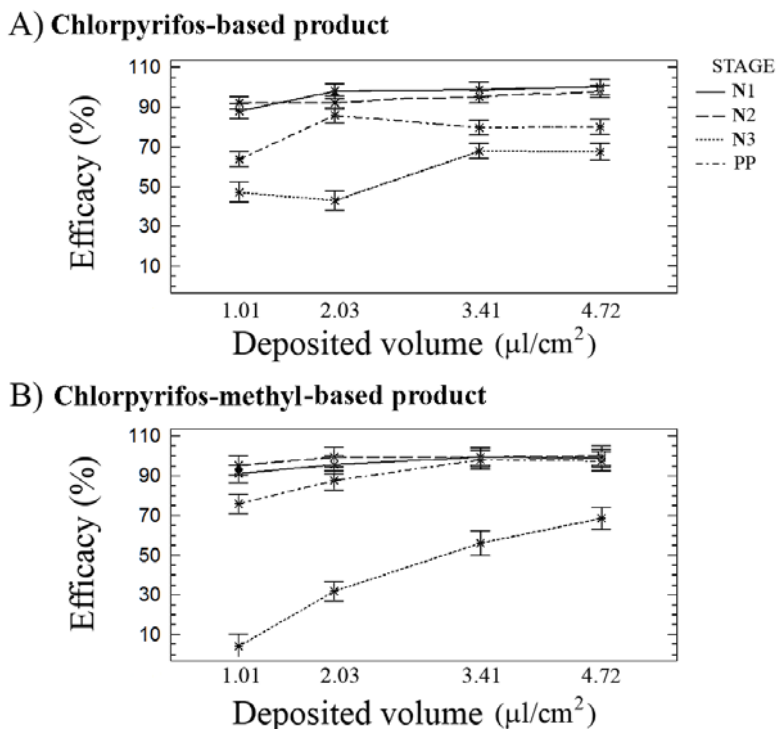


Figure IV-7. Interaction between the factors “deposited volume” and “development stage” for the effectiveness of Chlorpyrifos-based product (A) and Chlorpyrifos-methyl-based product (B).

## 1.4 Discussion and Conclusions

In general, increases in spray volume increased both coverage and mean impact size and reduced the number of impacts. This was due to coalescence of droplets produced when using the Potter Tower. This phenomenon is often observed on other surfaces, with other spraying devices and in field treatments (Salyani and McCoy, 1989a,b; Ebert and Downer, 2006; Chueca et al., 2009).

Clear differences in the relationships between spray volume and deposition pattern of the solutions were found. CMBP produced a greater coverage, larger impacts and a lesser number of impacts per square centimetre than CBP. These results are probably due to differences in the formulation that affect the surface tension of the

solution and hence droplet formation and deposition. This is most likely to be the explanation for the differences in the deposition pattern between water and the other solutions. Other authors have also observed how different formulations affect deposition pattern (Akesson and Gibbs, 1990; Bouse et al., 1990; Akesson et al., 1994; Butler-Ellis et al., 1997).

Both treatments of organophosphates achieved high efficacies (around 89-95%) against N1 and N2 stages, so it was not possible to find a relationship between deposition and efficacy. The minimum-deposited volume ( $1.01 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) of CBP produced 11% coverage and an a.i. deposition of  $0.945 \text{ mg}$  of chlorpyrifos/ $\text{cm}^2$ . CMBP produced greater coverage (22%) but similar deposition of a.i. ( $0.903 \text{ mg}$  of chlorpyrifos-methyl/ $\text{cm}^2$ ). It is assumed that both products produced the same effect on N1 and N2 stages since, even at these low dosages, enough a.i. has been deposited to kill the insects, no matter how the products spread on the target.

At the PP stage,  $2.03 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  of CBP produced 22% coverage and 80-90% efficacy. In the case of CMBP, higher deposited volumes ( $3.41 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) and higher coverage (51%) were required to achieve similar efficacy.

The maximum efficacy on N3 stage with both pesticides was 70%. To reach such a level, it was necessary to deposit  $3.41 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  of CBP (36% coverage) and  $4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  of CMBP (62% coverage). As before, it was observed that more deposition of CMBP than CBP was required to achieve the same effect. This indicated that chlorpyrifos had a higher toxicity.

The results show that N1 and N2 stages are the most sensitive to both products, because maximal efficacies were obtained with the lowest volumes. This conclusion is explained by the fact that these stages are less protected because their shield is thinner compared to that of older stages as has been widely reported in literature (Busvine, 1971; Walker et al., 1990; Asplanato and García-Marí, 2001; Hernández-Penadés et al., 2004). Furthermore, this research shows that greater coverage does not necessarily result in greater efficacy. Experiments carried out in

this work indicated that efficacy of the pesticides under study on adult stages of CRS reached a maximum value that was not surpassed by higher deposition of product. They also showed that this maximum differed for the two products.

In Spanish citrus growing areas, CRS may have 2-4 generations per year depending on climatic conditions. The first generation begins in May when temperatures are optimal for CRS development. At this time, there is a peak of crawlers in the population, so in this first generation the development stages of the insect are more or less homogenous. Therefore, it is recommended to control the pest at the beginning of its first generation because, in the succeeding generations, different stages coexist. Our experiments indicate that treatments carried out at this time should be set up in such a way that 11% coverage is attained on fruit for CBP solutions, or 22% coverage is attained for CMBP solutions. This probably implies the use of lower volumes of water than those that are usually sprayed. And thus, the amount of pesticide delivery could be reduced, decreasing both the environmental impact and the presence of residues in fruit. The next step of this experimentation will be devoted to validating if the proposed deposition attains the expected level of pest control in field conditions and to determine which operative conditions of the machinery (sprayer, pressure, speed, volume, nozzles, etc.) will be capable of producing such deposition in citrus orchards.

This study contributes to the understanding of how the spray volume is deposited and how it affects the efficacy of two organophosphate insecticides for controlling CRS. It shows the relevance of studying the relationship between efficacy of the pesticides against a pest and the deposition patterns of such products.

## **1.5 Acknowledgements**

This research was partially funded by the Ministerio de Ciencia e Innovación de España (project AGL2007-66093-C04) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). C. Garcerá was recipient of a grant from IVIA.



## **2 MODELLING THE SPRAY DEPOSITION AND EFFICACY OF TWO MINERAL OIL-BASED PRODUCTS FOR THE CONTROL OF CALIFORNIA RED SCALE, *Aonidiella aurantii* (MASKELL)**

*Based on the publication in Crop Protection (2012) 31 (1), pp. 78-84*

### **2.1 Introduction**

California red scale, *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Homoptera: Diaspididae) (CRS), is one of the pests with the greatest economic impact in worldwide citrus growing. Its control has been based on organophosphate and carbamate insecticide treatments since the 1940s (Grafton-Cardwell and Vehrs, 1995). However, the extensive and continuous use of these pesticides has caused environmental impact as well as resistance development in this pest (Nel et al., 1979; Collins et al., 1994; Vehrs and Grafton-Cardwell, 1994; Smith D. et al., 1997; Bedford, 1998a, b; Levitin and Cohen, 1998). In recent years, Insect Growth Regulator (IGR) insecticides have begun to be used for controlling CRS (Grout and Richards, 1991; Mendel et al., 1991; Ishaaya et al., 1992; Hattingh and Tate, 1996) and growers alternated between IGR and organophosphate insecticides. Nevertheless, IGRs have an adverse effect on natural enemies, especially Coccinellidae (Loia and Viggiani, 1992; Biddinger and Hull, 1995; Hattingh and Tate, 1995; Magagula and Samways, 2000; Grafton-Cardwell and Gu, 2003). All of these problems, together with health related problems derived from the presence of residues on the fruit and the growing awareness of the society towards more sustainable agriculture, are promoting a change in agricultural management practices.

Other control strategies for this pest such as biological control and mating disruption based on the use of pheromones are commonly employed in integrated management programs (IPM), however these are still under evaluation in Spain (Navarro et al., 2009; Tena et al., 2011; Vacas et al., 2012). Petroleum-derived spray oils (PDSO) are used in IPM worldwide against CRS (Ebeling, 1932; Uygun and

Şekeroğlu, 1984; Grout and Stephen, 1993; Beattie et al., 2002; Benfatto et al., 2002; Childers, 2002; Liang et al., 2002, 2010; Nguyen et al., 2002; Papacek, 2009). New formulations of commercial mineral oils, with high levels of unsulfonated residues, minimize phytotoxicity and provide adequate control. Furthermore, populations of beneficial arthropods are not severely affected because of the short-term residual activity of PDSOs (Riehl, 1981; Davidson, 1991; Childers, 2002; Nguyen et al., 2002; Urbaneja et al., 2008). In Spain, recommendations for PDSO applications are based on a prescribed concentration, specifically 1.0-1.5% (MAGRAMA, 2012a). However, information regarding the volume of water required according to the amount of vegetation in the plant is not provided and is not regulated. This lack of information may lead to waste through overuse or ineffective control as a result of inadequate application.

PDSOs kill arthropod pests mainly by obstructing spiracles and then inducing anoxia (Kallianpur et al., 2002; Taverner, 2002). For this reason and because CRS is mostly distributed on the whole canopy, high water volumes are presumed to be very important in order to completely cover the target insect (Gaskin et al., 2002).

Several researchers have attempted to determine how much volume should be applied in PDSO treatments against CRS, all them under field conditions (Jeppson and Carman, 1974; Riehl, 1981; Grout and Stephen, 1993; Beattie et al., 2002; Grafton-Cardwell and Reagan, 2005, 2006), but the results were not conclusive and sometimes contradictory. The lack of conclusive results is due to the different use of controllable factors under study (PDSO formulation, volume of water, type and setup of the sprayer, etc.) and the different scenarios in the test areas (population level, stage of scales, size and shape of trees, density of canopy, meteorological conditions, etc.), all of these affecting the efficacy of mineral oils treatments against CRS. Furthermore, it is widely known that physico-chemical properties of PDSO formulations affect their droplet size spectrum (Fraser and Eisenklam, 1956; Haq et al., 1983; Yates et al., 1983; Bouse et al., 1990) and their deposition pattern (Salyani,



1988; Spillman, 1984; Zabkiewicz, 2007), affecting thereafter the PDSOs wetting capacity, and consequently the plant-pest interaction and their efficacy (Agnello, 2002; Zabkiewicz, 2002).

The objectives of this study were: (i) to characterize the deposition pattern of two PDSOs applied in different volumes with the same concentration, (ii) to study the efficacy of these treatments on the different stages of CRS under laboratory conditions, and (iii) to model the efficacy as a function of the deposited volume. The final goal is to establish a scientific model to determine the best trade-off between sprayed volume and efficacy in controlling the pest.

## **2.2 Materials and methods**

Two experiments were carried out under laboratory conditions to test the effect of volume on (i) deposition characteristics, and (ii) efficacy of mineral oils-based treatments against different stages of CRS. In both experiments two of the most common PDSOs in Spain were used: Laincoil®, an *n*C21 oil with a content of 83% w/v, unsulfonated residue: 92%, density (20 °C): 0.82-0.86 g/ml and viscosity (40 °C): 14.38 cSt (Lainco, S.A., Barcelona, Spain), hereafter Oil A, and Sunspray Ultrafine®, an *n*C21 with a content of 85% w/v, unsulfonated residue: 92%, density (20 °C): 0.85-0.86 g/ml and viscosity (40 °C): 12.60 cSt (Sun Oil Co., Antwerp, Belgium), hereafter Oil B. Both were used at the maximum prescribed concentration in Spanish field applications against CRS of 1.5%. The spray volumes applied in a Potter Spray tower for both experiments were 0.5, 1, 2, 3 and 4 ml. The maximum spray volume tested was 4 ml because the droplets coalesced at higher volumes, producing a surface of liquid that runoff from the target surface.

As mentioned above, applications were carried out with a Potter Spray Tower fitted with its finest nozzle (internal diameter: 0.762 mm) (Burkard Scientific, Uxbridge, United Kingdom) (Potter, 1952). The pressure was fixed at 0.1 MPa.

The Potter Spray Tower was calibrated before each experiment. The volume of solution deposited per unit area ( $\text{ml}/\text{cm}^2$ ) on the tower base for each spray volume was estimated by a series of tests. Different volumes of water were sprayed over Petri dishes of known area ( $63 \text{ cm}^2$ ). Petri dishes were weighed before and after the application using an analytical balance (XR 205 SM-DR, Precisa Instruments Ltd., Dietikon, Switzerland). Five replicates were used per volume tested. The average increase-of-weight produced by the deposition of droplets per unit area was measured. From these data, the amount of active ingredient (a.i.) per unit area was estimated for each PDSO (Table IV-2).

*Table IV-2. Estimated amount of active ingredient deposited per unit area ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (Mean and SE\*) for the five volumes of solution and for each PDSO sprayed with the Potter tower onto Petri dishes*

PDSO solution volume			Mineral oil quantity ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )			
Spray Volume (ml)	Deposited volume ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ )		Oil A		Oil B	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
0.5	0.455	0.024	5.416	0.299	5.546	0.306
1	1.008	0.040	12.550	0.498	12.852	0.510
2	2.030	0.079	25.274	0.984	25.883	1.007
3	3.410	0.095	42.455	1.183	43.478	1.211
4	4.722	0.089	60.943	1.108	62.411	1.015

\*SE: Standard Error

### 2.2.1 Deposition pattern.

In order to study the deposition pattern, the five volumes were tested with two PDSO solutions (Oil A and Oil B), with 3 replicates per treatment.

White PVC-sheet  $4.5 \times 4.5 \text{ cm}$  pieces were used as artificial collectors of the spray solution. PVC drop retention behaviour is similar to that of citrus leaves (Mercader et al., 1995). Moreover, it was considered that these collectors also produce a distribution pattern similar to that produced on lemon skins. Mature leaf wax deposits range from  $20 \text{ mg}/\text{cm}^2$  to  $31 \text{ mg}/\text{cm}^2$  and mature fruit wax deposits range from  $25 \text{ mg}/\text{cm}^2$  to  $35 \text{ mg}/\text{cm}^2$  depending on the species of citrus. Despite there

being some differences in the surface of both citrus leaves and fruit it seems likely that wax deposits on both the leaves and fruit favour the retention and subsequent redistribution of lipoid-soluble materials (Baker et al., 1975).

Collectors were sprayed with the corresponding solution (distilled water + PDSO), plus 2% of chelated iron (Sequestrene 138 Fe G-100, Syngenta Agro S.A., Madrid, Spain) as a dye to produce sufficient drop/background contrast for subsequent image analysis. Collectors were then photographed in controlled light conditions. Colour pictures were segmented using a thresholding procedure and blobs were counted and measured with commercial software, as described by Chueca et al. (2010). Three parameters were measured from each collector to describe deposition: (i) coverage (%), expressed as percentage of area occupied by impinging droplets (henceforth impacts) against the total area; (ii) mean size of impacts (mm<sup>2</sup>), estimated by the mean of the area of all the impacts on the collector; and (iii) number of impacts per unit area (No. of impacts/cm<sup>2</sup>).

### 2.2.2 Efficacy against CRS stages.

Five volumes of both solutions (Oil A and Oil B) were tested as well as a water control. Experimental trials were conducted on lemons infested with CRS populations at different stages. The insect's life cycle was divided into four groups of stages: N1 (white cap and first molt), N2 (second instar and second molt), N3 (third instar and gravid females) and PP (prepupal and pupa males).

CRS-infested lemons were obtained from colonies reared in chambers at  $26 \pm 3$  °C,  $50 \pm 5\%$  relative humidity (RH) and continuous light, following the protocol developed by Pina (2006). To infest the target lemons, clean lemons were partially covered by wax, leaving a clean surface of about 16 cm<sup>2</sup> where CRS developed. Lemons were big enough relative to the size of this area in order for the surface to be considered flat. A series of lemons infested with crawler-producing females from the colony was put in the base of a box with the unwaxed area upward. A black paperboard tube (10 cm high and 3 cm base diameter) was put over the infested area

of each lemon. On the top of black paperboard tubes, the waxed clean lemons were put with the infestation areas upward. Fluorescent lights were placed over this setup for 24 h. Since crawlers show positive phototropism, the light attracts and stimulates them to move from the infested lemons to the clean lemons. After crawlers reached the “whitecap” stage, lemons with more than 50 fixed scales were removed and placed in a tray during a period long enough to allow around 90% of individuals to reach one of the desired stages. This period was about 5 days for N1, 9 days for N2 and 15 days for N3 and PP, checking before the applications whether they had really reached the required stage.

Before the PDSO treatment, about 50 living individuals per lemon were circled with a permanent marker (Staedtler permanent Lumocolor, Staedtler, Germany). After this, the lemons were sprayed and during and after spraying the unwaxed areas were kept horizontal. Ten days after treatment the scale cover of circled individuals were inverted and the number of dead scales was recorded. N1, N2 and PP scales that had not matured to the next stage were considered as dead. N3 scales were considered dead when the body under the shield had a dry, thin and flat appearance. Specifically gravid females, which are completely enclosed, were turned over, their veil was broken and the appearance of the individual was checked. Percentage mortality was calculated from these data as the ratio of dead individuals to the total checked individuals (alive and dead).

The experimental design consisted of 44 treatments: five volumes x four stages x two PDSOs plus control treatment. Each treatment was replicated 5 times, and one lemon was used for each replicate. Hence, 220 lemons were used. In each replicate, treatments were applied in a random order.

### 2.2.3 Data analysis.

Multiple linear regression (MLR) was used to model the relationship between the volume deposited on the target, which will be referred to hereafter as variable  $D$  (deposited volume, ml solution/cm<sup>2</sup>), and the parameters that characterize the

deposition pattern (coverage, mean impact size and number of impacts per unit area). One MLR model was generated for each parameter. Quadratic and cubic terms of the independent variable  $D$  were also taken into account. In order to study if the tested PDSOs differ in their deposition pattern, an indicator variable called  $I_{OIL\_A}$  was also considered, taking the value 1 for the experimental data corresponding to Oil A and 0 otherwise.











Regarding the mortality data obtained with infested lemons, Dunnett's test (Dunnett, 1955) was used to compare the percentage mortality in the control treatment (only water) versus the mortality of PDSO treatments for each CRS stage and each spray volume. When significant differences were found, efficacies were calculated using the Schneider-Orelli formula (Schneider-Orelli, 1947). MLR was also used to study the effect of  $D$ , PDSO and stage on efficacy. The same methodology to generate the regression models was followed to study the inclusion of the quadratic term  $D^2$  as well as the interaction between  $I_{OIL\_A}$ ,  $D$  and  $D^2$ . In order to assess whether there was a different response exhibited by any stage, the inclusion of three additional indicator variables was also studied:  $I_{PP}$ ,  $I_{N3}$  and  $I_{N2}$ , as well as their interactions with the rest of variables. These variables take the value 1 for the experimental data corresponding to the stage that is referenced in the subscript and 0 otherwise. Given that the number of variables was quite high in this case, stepwise MLR was used to identify those with a statistically significant effect on efficacy. When the indicator variables were found significant, the model could be expressed as a set of equations that depended on the PDSO and the stage.

In all fitted models the assumptions of linear regression were checked. No outliers were identified. All analyses were performed with Statgraphics® Plus version 5.1 (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, Virginia, USA).

## 2.3 Results

### 2.3.1 Deposition pattern.

The Figure IV-8 shows some collectors sprayed with the different treatments tested.

	<b>4000</b> $\mu\text{l}$		
	<b>3000</b> $\mu\text{l}$		
	<b>2000</b> $\mu\text{l}$		
	<b>1000</b> $\mu\text{l}$		
	<b>500</b> $\mu\text{l}$		
<b>Volumen Caldo</b>		<b>Oil A (1.5%)</b>	<b>Oil B (1.5%)</b>

*Figure IV-8. Example of some collectors sprayed with the oil solutions*

Equation IV-2 describes the effect of  $D$  on coverage, with a coefficient of determination  $R^2 = 0.889$ . The coefficients of both independent variables, as well as the interaction of the indicator variable with  $D$ , were statistically significant (Table IV-3). Neither the coefficient of the indicator variable  $I_{OIL\_A}$  (p-value = 0.8128) nor its interaction with  $D^2$  (p-value = 0.8419) were statistically significant, so they were not included in the model.

$$\text{Coverage (\%)} = -0.410 + 21.854 \cdot D - 2.712 \cdot D^2 + 1.736 \cdot D \cdot I_{OIL\_A} \tag{IV-2}$$

Table IV-3. Regression coefficients of the MLR equation for coverage as a function of  $D$  (deposited volume,  $\mu\text{l solution}/\text{cm}^2$ ) ( $R^2 = 0.889$ )

Parameter	Estimate	Standard Error	P
Constant	-0.410	2.839	0.8862
$D$	21.854	2.792	<0.0001
$D^2$	-2.712	0.508	<0.0001
$D \cdot I_{OIL\_A}$ <sup>1</sup>	1.736	0.714	0.0223

<sup>1</sup> $I_{OIL\_A} = 1$  for data obtained with Oil A and 0 for Oil B

Equation IV-2 can also be expressed as two equations, one for each PSDO (Equations IV-3 and IV-4). Because these equations are more intuitive and simpler for the reader, hereafter all the models will be expressed this way.

$$\text{Coverage (\%)}_{OIL\_A} = -0.410 + 23.590 \cdot D - 2.712 \cdot D^2 \tag{IV-3}$$

$$\text{Coverage (\%)}_{OIL\_B} = -0.410 + 21.854 \cdot D - 2.712 \cdot D^2 \tag{IV-4}$$

The fitted equations are depicted in Figure IV-9A. It is shown that in the tested range of volumes, the increase of coverage is very low for  $D > 3.5 \text{ ml}/\text{cm}^2$ , reaching a maximum value of approximately 50% with Oil A and 44% with Oil B.

Besides the difference in coverage produced by the two PSDOs, they also differed in the way that this coverage was achieved, since the interaction of the indicator variable  $I_{OIL\_A}$  and  $D$  was statistically significant in the model obtained for the mean impact size ( $R^2 = 0.823$ ), as well as the indicator variable  $I_{OIL\_A}$  being

significant in the model for the number of impacts per unit area ( $R^2 = 0.750$ ) (Table IV-4 and Table IV-5).

In the mean impact size model it was found that the relationship between deposited volume and mean impact size was adequately described by a linear model (Table IV-4), since the quadratic term was not significant (p-value = 0.7750). The regression coefficient of the variables  $I_{OIL\_A}$  (p-value = 0.9480) and  $D^2 * I_{OIL\_A}$  (p-value = 0.8805) were not statistically significant, which implied that these responses could be described by two equations IV-5 and IV-6, one for each PDSO.

$$\text{mean area}_{OIL\_A} (\text{mm}^2) = 0.0046 + 0.026 \cdot D \tag{IV-5}$$

$$\text{mean area}_{OIL\_B} (\text{mm}^2) = 0.0046 + 0.016 \cdot D \tag{IV-6}$$

Table IV-4. Regression coefficients of the MLR equation for mean impact size as a function of  $D$  (deposited volume,  $\mu\text{l solution}/\text{cm}^2$ ) ( $R^2 = 0.823$ )

Parameter	Estimate	Standard Error	P
Constant	0.0046	0.0055	0.4144
$D$	0.0166	0.0022	<0.0001
$D^2 * I_{OIL\_A}^1$	0.0094	0.0024	0.0005

<sup>1</sup> $I_{OIL\_A} = 1$  for data obtained with Oil A and 0 for Oil B

These models are depicted in Figure IV-9B. The slope for Oil A was significantly higher than for Oil B since the regression coefficient of the variable  $D * I_{OIL\_A}$  was significant (Table IV-4). This result suggests that increases in  $D$  resulted in a greater size of impacts in Oil A applications.

Regarding the number of impacts per unit area, both PDSOs showed an increasing trend between  $D = 0.46$  and  $D = 1 \text{ ml}/\text{cm}^2$ . However, the number of impacts decreased between  $D = 2$  and  $D = 3.4 \text{ ml}/\text{cm}^2$  (Figure IV-9C). This was probably due to coalescence of droplets, since the nozzle was static with respect to the target. In this case, the variable  $I_{OIL\_A}$  was statistically significant (Table IV-5), which implies differences between the two PDSOs. As a result, the model can be described



by two parallel equations, one for each PDSO (Equations IV-7 and IV-8). Oil B produced a higher number of impacts in all volumes tested compared to Oil A.

$$\left(\text{impacts/cm}^2\right)_{\text{OIL}_A} = 310.633 + 647.683 \cdot D - 302.665 \cdot D^2 + 34.654 \cdot D^3 \quad \text{IV-7}$$

$$\left(\text{impacts/cm}^2\right)_{\text{OIL}_B} = 570.102 + 647.683 \cdot D - 302.665 \cdot D^2 + 34.654 \cdot D^3 \quad \text{IV-8}$$

*Table IV-5. Regression coefficients of the MLR equation for number of impacts per unit area as a function of D (deposited volume,  $\mu\text{l}$  solution/ $\text{cm}^2$ ) ( $R^2 = 0.750$ )*

Parameter	Estimate	Standard Error	P
Constant	570.102	110.803	<0.0001
$I_{\text{OIL}_A}$ <sup>1</sup>	-259.469	47.239	<0.0001
D	647.683	194.222	0.0027
D <sup>2</sup>	-302.665	86.766	0.0018
D <sup>3</sup>	34.654	10.751	0.0035

<sup>1</sup> $I_{\text{OIL}_A}$  = 1 for data obtained with Oil A and 0 for Oil B

Thus, considering all results, Oil B generated smaller but more numerous impacts than Oil A, generating a slightly lower coverage.

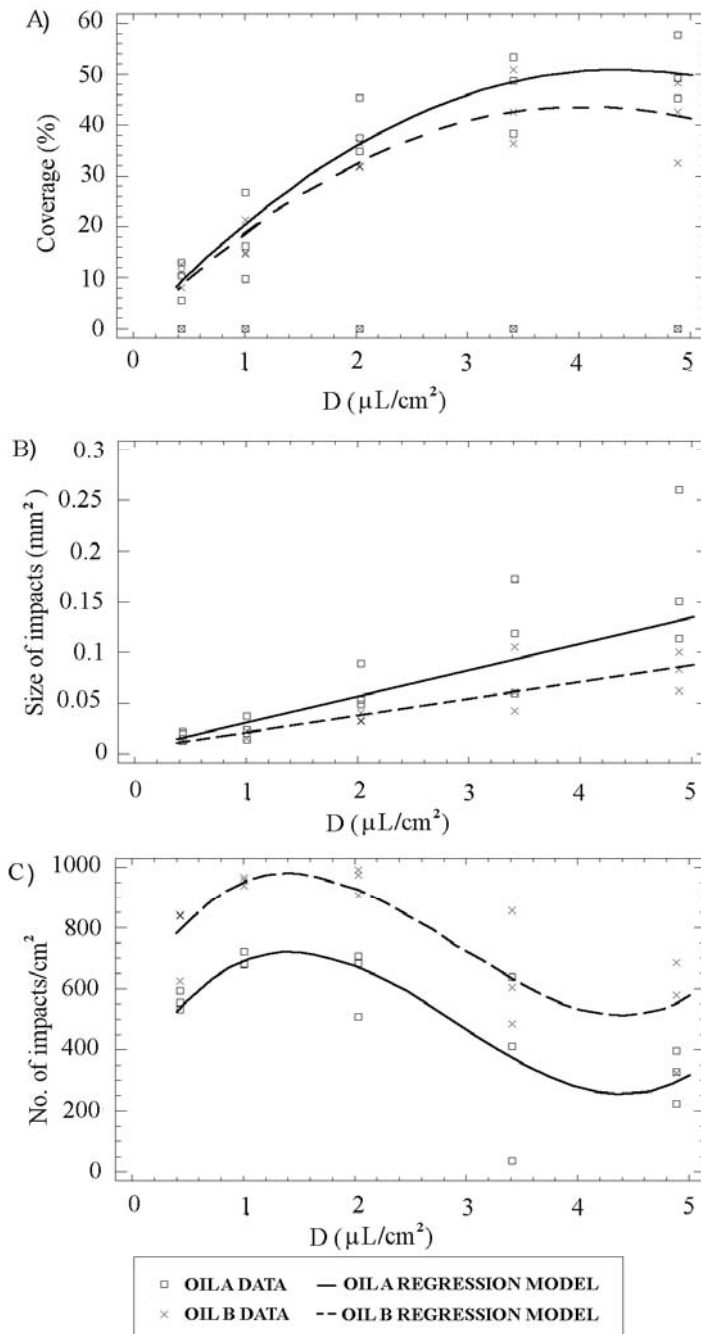


Figure IV-9. Experimental data and regression curves for coverage (A), mean impact size (B) and number of impacts per unit area (C) as a function of  $D$  ( $\mu\text{l}$  solution/ $\text{cm}^2$ ) for each PDSO.

### 2.3.2 Efficacy against CRS stages.

N1, N2, N3 and PP mortalities resulting from both PDSOs were significantly different from the water control (Dunnett's test,  $P < 0.05$ ), except in the lowest treatment with 0.46 ml solution/cm<sup>2</sup> of Oil A. This resulted in negative values of efficacy (%) for this treatment when using the Schneider-Orelli formula, as reflected in Figure IV-10. The percentage mortalities of the water controls were 12.00% (SE = 2.00%) for N1, 11.33% (SE = 2.40%) for N2, 7.42% (SE = 2.63%) for N3 and 19.09% (SE = 1.57%) for PP.

The best MLR model for efficacy had  $R^2 = 0.826$  (Table IV-6). The quadratic term  $D^2$  was statistically significant as well as its interaction with several indicator variables ( $P < 0.011$ ). As a consequence, this model can be expressed as a set of five equations (Equations IV-9 - IV-13), depending on the PDSO and the stage (fitted curves are in Figure IV-10).

#### a) Oil A

$$\% \text{ Efficacy}_{N1/N2} = -10.099 + 41.613 \cdot D - 4.349 \cdot D^2 \quad \text{IV-9}$$

$$\% \text{ Efficacy}_{N3} = -10.099 + 41.613 \cdot D - 5.288 \cdot D^2 \quad \text{IV-10}$$

$$\% \text{ Efficacy}_{PP} = 11.886 + 17.047 \cdot D - 0.634 \cdot D^2 \quad \text{IV-11}$$

#### b) Oil B

$$\% \text{ Efficacy}_{N1/N2/N3} = -10.099 + 49.816 \cdot D - 6.087 \cdot D^2 \quad \text{IV-12}$$

$$\% \text{ Efficacy}_{PP} = 11.886 + 25.250 \cdot D - 2.373 \cdot D^2 \quad \text{IV-13}$$

Table IV-6. Regression coefficients of the MLR equation for efficacy as a function of  $D$  (deposited volume,  $\mu\text{l}$  solution/ $\text{cm}^2$ ) ( $R^2 = 0.826$ )

Parameter <sup>1</sup>	Estimate	Standard Error	P
Constant	-10.099	3.343	0.0029
$I_{PP}$	21.985	6.846	0.0016
$D$	49.816	3.594	<0.0001
$D^* I_{OIL\_A}$	-8.203	2.818	0.0041
$D^* I_{PP}$	-24.566	6.683	0.0003
$D^2$	-6.087	0.696	<0.0001
$D^2* I_{OIL\_A}$	1.739	0.672	0.0106
$D^2* I_{PP}$	3.714	1.227	0.0029
$D^2* I_{OIL\_A} * I_{N3}$	-0.939	0.296	0.0018

<sup>1</sup>Indicator variables are the following:  $I_{OIL\_A}$  (value 1 for data obtained with Oil A and 0 for Oil B),  $I_{PP}$  (value 1 for the phase PP and zero otherwise), and  $I_{N3}$  (value 1 for the phase N3 and zero otherwise).

The efficacy of both PDSOs against N1 and N2 was close to 90% for the highest tested volumes, and no significant differences were observed between those stages. The difference between the two PDSOs depended on the amount of deposited volume required to reach the maximum efficacy. Oil A required a deposit close to 4 ml solution/ $\text{cm}^2$  to reach 90% efficacy while Oil B needed less (3.5 ml solution/ $\text{cm}^2$ ) to reach similar efficacy (92%).

Stage N3 followed the same regression model as N1 and N2 in the experiments with Oil B. However, Oil A caused lower efficacy against N3 for the highest volumes, with maximum efficacy close to 70%. This result suggests that Oil B was more effective than Oil A against stage N3, since it caused similar efficacy to that obtained for younger stages.

For both PDSOs, efficacy against stage PP followed a different model and maximum observed efficacy was 80%. Generally, the efficacy on PP was lower than for the other stages at higher deposit levels.

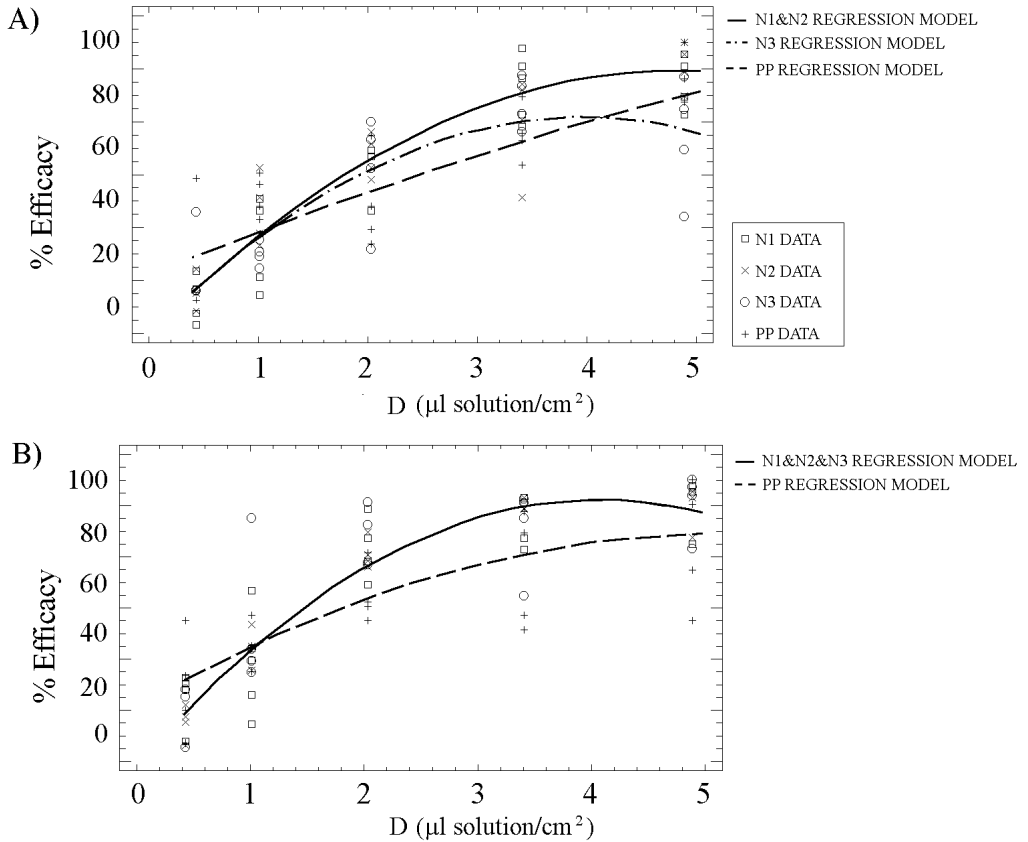


Figure IV-10. Experimental data and regression curves for efficacy (%) as a function of  $D$  ( $\mu\text{l solution/cm}^2$ ) for Oil A (A) and Oil B (B).

## 2.4 Discussion

In this work models to relate the deposited spray volume with both the deposition characteristics and the efficacy against different CRS stages of two PDSO were developed. These models are important because they can be used to determine which deposited volume is needed to reach the highest efficacy. Furthermore, the deposited volume, a difficult parameter to measure, is related to coverage, a parameter much easier to estimate in the field (even a trained expert can assess it visually).

Indeed, these results are the necessary first step to determine how much water volume should be applied in PDSO treatments against CRS. The volume to be sprayed can be calculated from the data of volume per unit surface, the leaf area density and the efficiency of the application. This efficiency is the portion of the volume sprayed that is deposited on the intended target and depends on the application technique, the weather conditions, the vegetation, the pruning method and other uncontrolled factors (Ganzelmeier et al., 1995; Gil et al., 2007; Salyani et al., 2007a,b; Chueca et al., 2011). For example, our experiments indicate that to obtain around 90% efficacy with treatments carried out at the moment of predominance of young stages, treatments should be setup in such a way that 50% coverage is attained on fruit for Oil A solutions, or 44% coverage is attained on fruit for Oil B solutions, which correspond to a deposited volume of 4.72 or 3.41 ml/cm<sup>2</sup>, respectively. To reach these deposits in field conditions, for example in a Lanelate navel orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) orchard with a canopy volume of 19 m<sup>3</sup> and leaf area density of 4 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>, and considering a 100% efficiency of application, a volume of 3.58 l/tree for Oil A and 2.59 l/tree for Oil B should be applied.

Consistently with the literature (Riehl, 1981), the efficacy models developed in this work show that younger stages of CRS were more susceptible than adult stages but, in addition, developed models estimate the quantity of deposit per unit surface required to reach the highest efficacy in each stage.

The number of generations of CRS per year depends on the region and its climatic conditions (Avidov and Harpaz, 1969; Luck, 1995; Smith D. et al., 1997; Bedford, 1998b). In Spanish citrus growing areas, CRS may have 2-4 generations per year (Rodrigo and García-Marí, 1990; García-Marí and Rodrigo, 1995; Girona, 2004) and the first generation of CRS usually occurs in May. At this time, early stages of the insect are clearly majority in the population because the overwintering male and female stages produce a synchronous crawler emergence. However, in the succeeding generations, the composition of the population changes and individuals at different

growing stages coexist. For this reason, it is recommended to control the pest at the beginning of its first generation. Various authors (Riehl and LaDue, 1952; Riehl et al., 1958; Riehl, 1981; Herron et al., 1995) established that the LD<sub>95</sub> for mineral oils ranges from 55 to 115 mg oil/cm<sup>2</sup> for CRS. The lowest value is similar to that obtained with the maximum deposited volume of 4.9 ml/cm<sup>2</sup> at concentration of 1.5% in our experiments (Table IV-2). Taking into account that higher volume applications will produce run-off, the highest value of 115 mg oil/cm<sup>2</sup> reported in the literature would only be attained in the field, under Spanish conditions, by increasing the oil concentration to more than 2.8%, which could potentially cause phytotoxicity, thus rendering it an unrealistic application.

The models also demonstrate that the oils used in our experiment behave differently regarding both their deposition pattern and their efficacy, which also differently affects the mortality of the various stages. Total coverage was significantly higher for Oil A compared to Oil B, but Oil A had lower efficacy. In parallel, Oil B produced smaller but more numerous impacts. PDSO formulation normally contains a specific mineral oil as a.i. mixed with a wide range of emulsifiers and surfactants. Mineral oils are characterized by parameters that may affect their efficacy such as viscosity, gravity, unsulfonated residue, pour point, distillation temperature and n-paraffin carbon number (*nC*) (Agnello, 2002). Because mineral oils of both PDSOs studied have the same unsulfonated residue and n-paraffin carbon number (*nC*) and similar density and viscosity, the results suggest that differences in deposition and efficacy are due to other factors. It is speculated that coadjuvants might play a significant role in these differences. In the same sense, the relationships between coverage and deposited volume may also change when using different spraying methods and models would need re-adjustment.

Thus, more studies of commercial PDSOs are needed because both spray distribution and efficacy are dependent on the commercial formulations, not only on the mineral oil on which they are based, as well as the spraying technique. However,

the methodology proposed could be a useful tool to compare the efficacy of other commercial PDSOS under laboratory conditions. This information, together with their market price could be a valuable tool for citrus growers when choosing the most cost effective PDSO as well as for pesticide manufacturers to improve product quality.

Because this work describes both the total deposition volume and the deposition pattern of deposits, and relate them to efficacy, it is possible to relate the results obtained in laboratory to other reported studies, even to those conducted in field conditions if deposition or coverage data are shown.

In conclusion, models to relate the deposited spray volume with both the deposition characteristics and the efficacy against different CRS stages of two PDSO were developed. These models could be used as the preliminary step to determine the necessary coverage in field conditions to obtain the highest efficacy, bearing in mind that efficacy under field conditions may be influenced by uncontrolled factors that have not been taken into account in this study, such as meteorological conditions, the lack of coverage uniformity on the tree canopy, presence of predators, mixing of CRS stages, etc. Moreover, different relationships can be derived when using different spraying methods.

## **2.5 Acknowledgements**

This research was partially funded by the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (project AGL2007-66093-C04) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). C. Garcerá was recipient of a grant from IVIA.



**CAPITULO V VALIDACIÓN DE LOS MODELOS DE  
CONTROL DE *Aonidiella aurantii* EN  
CONDICIONES DE CAMPO**

---



Una vez establecido el modelo que relaciona la deposición y la eficacia de control para cada tipo de producto es necesario validarlo en condiciones de campo. Para ello se ha evaluado la calidad y eficacia de los tratamientos realizados siguiendo recomendaciones de aplicación basadas en los modelos frente a los tratamientos convencionalmente realizados hasta punto de goteo, teniendo en cuenta que todos ellos se aplican en el momento oportuno de desarrollo de la plaga, para maximizar su eficacia. Con ello se trata de comprobar, por un lado, si la eficacia de las aplicaciones realizadas en base a los modelos disminuye respecto a los tratamientos convencionales y, por otro lado, conocer si con los medios actuales se consiguen las deposiciones mínimas necesarias para controlar la plaga en todas las zonas del árbol y estudiar si este hecho afecta a la eficacia conseguida, estudiando si hay otros factores relativos a la aplicación y la vegetación implicados en la eficacia de las aplicaciones.

En el presente capítulo la metodología y resultados de los ensayos se presentan en dos apartados, cada uno de ellos enfocado en un grupo de productos diferente. En el primero de ellos se trabaja con insecticidas organofosforados (extraído de Garcerá et al., 2013), y en el segundo con aceites minerales.



# **1 EFFECT OF SPRAY APPLICATION VOLUME ON COVERAGE AND EFFICACY OF ORGANOPHOSPHATE INSECTICIDES FOR CONTROL OF CALIFORNIA RED SCALE, *Aonidiella aurantii* (MASKELL), IN SPAIN**

*Based on the publication in Pest Management Science (2013, doi: 10.1002/ps.3515)*

## **1.1 Introduction**

Citrus growers use organophosphate pesticides to control CRS worldwide (Carman, 1977a; Grout and Richards, 1992; Levitin and Cohen, 1998; Martínez-Hervás et al., 2005), in particular chlorpyrifos on account of its high efficacy (Grafton-Cardwell et al., 2009). However, excessive amounts of pesticide residue, associated with the overuse of these active ingredients, have started to appear on the fruit in the last few years (Coscollá, 2003, 2007). The application of these pesticides can adversely affect the environment (FAO, 2008), especially considering that organophosphate field treatments against CRS in citrus are normally applied with high volumes of water, because farmers intend to ensure coverage in very dense and difficult-to-reach vegetation. These high volumes increase the risks of run-off and drift. Moreover, overuse also leads to an increase in pesticide resistance, causing these broad-spectrum insecticides to lose their effectiveness, and results in considerable economic losses. Similarly to what has happened in South Africa (Georgala, 1975, 1988; Nel et al., 1979; Bedford, 1998a,b), Israel (Rosen, 1995), California (Grafton-Cardwell and Vehrs, 1995; Vehrs and Grafton-Cardwell, 1994), and Australia (Abdelrahman, 1973; Smith D. et al., 1997). In Spain, one survey estimated the susceptibility of CRS to chlorpyrifos and revealed important differences between orchards (Martínez-Hervás et al., 2006) but no further research has been conducted.

The spray application volume is the volume of spray solution per ground unit area that is emitted from the nozzles of the sprayer during a treatment. In Spain, as in

many other countries, pesticide labels only indicate the allowed concentration of pesticide, and do not recommend an application volume. Reduction of the spray application volume results in a reduction of applied dose of pesticide per unit area because the concentration is constant; however, because this reduction affects not only the amount but also the distribution of pesticide in the canopy, measures must be taken to ensure that an adequate control of the pest is maintained. For instance, Salyani et al. (2007a,b) did not find a significant effect of the application volume on the amount of product deposited on the ground, when it was expressed as a percentage of the application volume, but these researchers found a significant effect of the application volume on the deposition when it was expressed as deposited amount of active ingredient (a.i.) per unit ground area. Thus, a reduction in the application volume would clearly decrease the negative risk of treatments.

It is also important to note that not all of the applied plant protection product reaches the intended target, and that the distribution of the product on the plant's surface after the treatment plays an important role in the efficacy of the treatment. In this regard, it has been widely reported that the application volume can influence the penetration and deposition of the spray in the canopy. Several authors have concluded that lower spray volumes increase both the amount of deposition, on account of decrease in run-off, and the deposition variability (Salyani and McCoy, 1989b; Whitney et al., 1989; Hoffmann and Salyani, 1996). However, others have found that, the higher the volume of spray, the higher are the deposit, the foliar coverage and the uniformity of deposition (Cunningham and Harden, 1998a,b; Ramos et al., 2007). This phenomenon is particularly difficult to assess in the case of citrus because mature trees become taller, broader and denser as they grow, which can complicate penetration and uniformity of deposition (Johnson, 1997).

Few studies have analysed the effect of the spray application volume on the efficacy of pesticides used in citrus, and there has not been a conclusive result. Several authors have not found differences in control levels (McCoy et al., 1989;

Grafton-Cardwell and Reagan, 2007, 2009; Liang et al., 2010; Stansly, 2011), but others have found differences (Grout and Stephen, 1993; Beattie et al., 2002). Even fewer works have studied the influence of the application volume on the efficacy and the distribution and coverage of the spray in the canopy at the same time. Salyani et al. (1988) found that increasing the spray application volume did not have a significant effect on mean deposition or on the control of *Phyllocoptruta oleivora* Ashmead when applying different acaricides, but this approach did increase coverage uniformity. Chueca et al. (2009) did not find any influence of spray application volume on the control of *Coccus pseudomagnoliarum* Kuwana (Hemiptera: Coccidae) using petroleum-derived spray oils, but they did find differences in coverage. Cunningham and Harden (1999) found differences on both deposit patterns and efficacy that may be attributed to the spray volume in methidathion applications against CRS.

Undoubtedly, coverage and deposition uniformity have a practical significance on biological efficacy (Ebert and Downer, 2006). Coverage and deposition uniformity depend on the physicochemical characteristics of the plant protection product. Efficacy depends not only on how and when the product is applied and how it reaches the arthropod to be controlled, but also on its biology (e.g. development stage, morphology) and its natural behaviour (e.g. location preferences, mobility, natural defences, tendency to aggregate in colonies). In the case of scales, which are sessile in many of their development stages, it has been stated that adequate control requires a threshold concentration of the appropriate pesticide on the surface of susceptible tissues (Stover et al., 2002). In the present authors' opinion, divergences in the results reported in the literature demonstrate the need to conduct particular studies of each set of pests, pesticides, application methods and agricultural ecosystems to obtain conclusions for dose adjustments that could be reasonably generalised.

This work is aimed at providing scientific evidence for reducing pesticide dosage against CRS for citrus grown in Spain. The study examines the effect of the spray application volume on both the coverage and the biological efficacy against CRS of two organophosphate pesticides widely used in Spain that have chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl, respectively as an active ingredient. The very close relationship between deposition and efficacy of these two organophosphate pesticides has already been demonstrated at laboratory level (Garcerá et al., 2011) and an attempt has been made to relate these results to those obtained in the field. In this regard, the minimum deposition needed to reach a certain level of control of CRS in the laboratory has been used to calculate the theoretical efficiency of such a deposition, which has been compared to the actual efficiency observed in the field.

## **1.2 Material and methods**

### **1.2.1 Experimental sites**

Experiments were carried out in three commercial citrus orchards in Valencia (Spain) with previous CRS problems. Technicians in charge of the orchards have not observed resistance problems in past years, and recognised that organophosphate insecticides still maintained the pest under acceptable levels. The characteristics of each orchard are shown in Table V-1. Figure V-1 shows the location, the aerial view and a representative tree of each orchard.

It was observed that orange orchards planted with the same cultivar had very different tree configurations, possibly owing to the different pruning systems. Trees in orchard B were much smaller and had almost uniform leaf density in the whole canopy. Trees in orchard C were higher with most of the foliar mass on the external part of the canopy, and with uneven vegetation and a lack of leaves in the interior. In turn, trees in mandarin orchard had an intermediate size, with smaller leaves and very dense and uniform canopy.



Table V-1. Characteristics of trial orchards

Orchard	Location		Plant material	Row direction	Area (ha)	Tree spacing (m)	Canopy dimensions (m) (Height x Diameter 1 x Diameter 2)	Apparent canopy volume* (m <sup>3</sup> /tree)
	Town	Geographic coordinates						
A	El Puig	39° 37' 7.25" N 0° 38' 2.54" W	Clementine cv. Clemenvilla	East-West	0.66	5.6 x 5	2.3 x 3.8 x 3.8	17.65
B	Alzira	39° 9' 7.84" N 0° 30' 58.76" W	Orange cv. Navel	North-South	0.31	5.6 x 2.7	2.9 x 2.3 x 3.3	11.74
C	Chiva	39° 27' 19.94" N 0° 25' 7.94" W	Orange cv. Navel	North-South	0.52	6 x 5	3.2 x 4.4 x 4.3	32.21

\* Considering citrus canopy as an ellipsoid

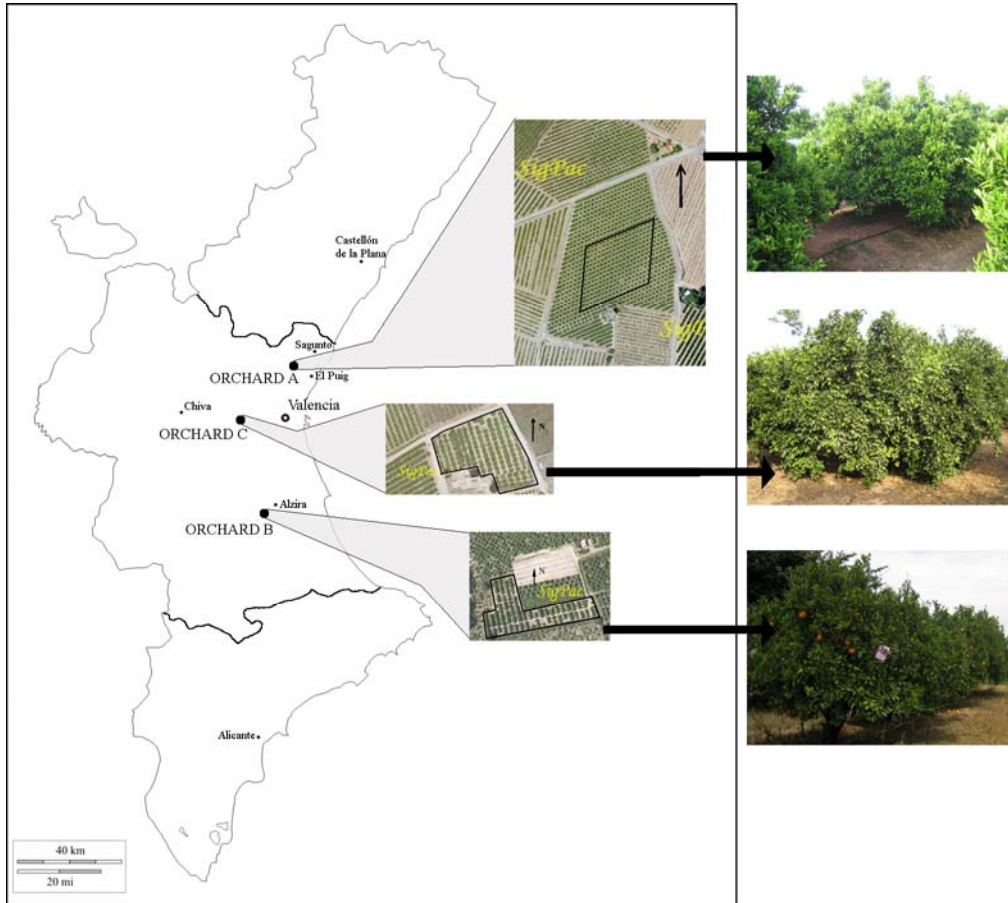


Figure V-1. Location and aerial views of orchards A, B and C (Source: SigPac Viewer of the Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente).

### 1.2.2 Description of the treatments and the sprayer

The experiments were conducted to study the effect of the spray application volume of two organophosphate insecticides on (1) coverage and (2) efficacy against CRS under field conditions. Organophosphate insecticides applied were those used in laboratory trials (Chapter IV, section 1). The chlorpyrifos-based product (CBP) was Dursban® 75 WG (a.i.: chlorpyrifos 750 g/kg WG) (Dow AgroSciences Ibérica,

Madrid, Spain) and the chlorpyrifos-methyl-based product (CMBP) was Reldan® E (a.i.: chlorpyrifos-methyl 224 g/l EC) (Dow AgroSciences Ibérica).

Both organophosphate pesticides, applied in the range of registered label concentrations at two application volumes, were compared with an untreated control, hereafter referred to as the “Control treatment”, and a positive control, hereafter referred to as the “Standard treatment”. CBP treatments were applied at 1-1.25 g/l and CMBP at 3-4 ml/l. Organophosphate treatments were applied in the same manner to the first and second generations of CRS. The Standard treatment involved the application of a mix of CBP (1 g/l) and a pyriproxyfen-based product (PBP) (0.75 ml/l) (Atominal® 10 EC, a.i.: 100 g/l EC. Sumimoto Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan) to the first generation of CRS, and a mix of CBP (1 g/l) and a petroleum-derived spray oil (PDSO) (10 ml/l) (Laincoil®, nC21 oil content: 8300 g/m<sup>3</sup>; unsulfonated residue: 92%; density at 20 °C: 820-860 kg/m<sup>3</sup>; viscosity at 40 °C: 1.438·10<sup>-5</sup> m<sup>2</sup>/s. Lainco, S.A., Barcelona, Spain) to the second generation. All of these treatments were applied at two spray application volumes. The heaviest application was deduced from a series of interviews with farmers and technicians. For this pest, they commonly apply approximately 5000 l/ha. The lowest application was deduced from the models relating deposition and efficacy, focussing on the necessities of deposition for the second-generation treatments, since these are the most deposit-demanding scenarios. The final application volume was averaged from the ones calculated in each orchard taking into account the tree spacing, the apparent canopy volume and the double of the leaf area density (LAD), in order to consider both faces of the leaves. In orchard A, LAD was experimentally assessed, having a mean value of 5 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>, while in the other orchards, this parameter was estimated from literature references, and also taking into account their canopy and pruning characteristics, such as the cultivar, the holes inside the canopy, the age, etc. Thus, values of around 4.5-5 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> for orchard B and 3-3.5 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> for orchard C were considered. Since the optimal coverage is around 40% when applying CBP (minimum deposit of 3.41 µl/cm<sup>2</sup>), and 60% when applying CMBP (minimum deposit of 4.72 µl/cm<sup>2</sup>), the

lowest application volume for all the orchards resulted in values around 2500-3500 l/ha, so 3000 l/ha was applied in all of the orchards, resulting in a 40% reduction compared to the higher volume. In none of the experiments run-off was observed.

In orchard A, both CBP and CMBP treatments were performed; in orchard B, only the CBP treatments were tested, and in orchard C, only the CMBP treatments were tested. The Control and Standard treatments were applied in all three orchards.

Organophosphate applications were always replicated ten times, and the others (the Control and Standard treatments) were replicated five times. Each replication consisted in the spraying of three adjoining trees in the same row.

Treatments were applied by means of a handgun hydraulic sprayer (mod. ML-65, Mañez y Lozano S.L., Alginet, Valencia, Spain) fitted with ceramic nozzles and operating at 3 Mpa in the manifold and with an opening angle of 28-30° (Figure V-2).



*Figure V-2. Handgun hydraulic sprayer employed for the application of the treatments.*

The two application volumes, 3000 and 5000 l/ha, were applied with nozzles of different diameters, 1.5 mm and 1.8 mm respectively, with the pressure and the opening angle kept constant to ensure that change in the spray time per tree on each orchard was as little as possible, regardless of the application volume. These nozzles were selected because in previous laboratory assay they showed similar impact size spectra collected on water sensitive paper (WSP). For the 1.5 mm nozzle, the Number

Median Diameter ( $D_{n0.5}$ ) was 347  $\mu\text{m}$ , the tenth percentile of the number-based diameter ( $D_{n0.1}$ ) was 170  $\mu\text{m}$  and the 90<sup>th</sup> percentile ( $D_{n0.9}$ ) was 867  $\mu\text{m}$ . For the 1.8 mm nozzle the  $D_{n0.5}$  was 353  $\mu\text{m}$ , the  $D_{n0.1}$  was 170  $\mu\text{m}$  and the  $D_{n0.9}$  was 847  $\mu\text{m}$ .

Owing to differences in tree spacing across orchards, the applied volume per tree was adjusted to obtain the desired application volume with each nozzle (Table V-2). Consequently, the same application volume, expressed as the volume per ground unit area, involved different spray volumes applied per tree. Furthermore, the same volume also implied different spray volumes per unit volume of canopy, because the mean sizes of the canopies in each orchard were different.

Table V-2. Operative characteristics of treatments

Spray application rate (l/ha)	Orchard	Applied volume	
		l/tree	$\text{l/m}^3$ canopy
3000 (nozzle 1.5)	A	8.4	0.47
	B	4.5	0.38
	C	9	0.28
5000 (nozzle 1.8)	A	14	0.79
	B	7.6	0.65
	C	15	0.46

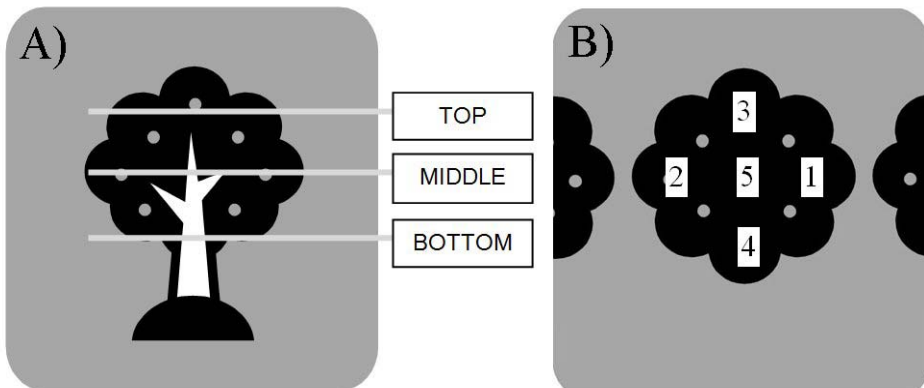
### 1.2.3 Application timing

CRS may have 2-4 generations per year in Spanish citrus conditions (Rodrigo and García-Marí, 1992). Treatments against this pest are usually applied to the first and second generations. It is widely known that application time affects the efficacy of treatments because the sensitivity to pesticides is not the same for all stages, with the early stages (N1 and N2) being the most sensitive (Asplanato and García-Marí, 2001; Garcerá et al., 2011). All treatments were applied when the percentage of sensitive stages reached its maximum in each generation. Weekly samplings of leaves and twigs were performed, beginning at the end of March, to calculate the percentage of individuals in each stage. Counting and determination of the developmental stage was made by skilled operators. In the first generation, the maximum of sensitive stages in the population was assumed to coincide with the moment when they

represented 60-70% of the total sample. In the second generation, it was established that the maximum of sensitive stages was reached when they represented 50-60% of the sample, because the distribution of stages in the population is naturally less homogeneous in this generation (Vanaclocha et al., 2009).

#### 1.2.4 Spray distribution in the canopy

Spray distribution in the canopy was evaluated by estimating the coverage obtained after the applications. For this purpose, in three trees on each orchard 30 pieces of 7.6 x 2.6 cm water sensitive paper (WSP) (TeeJet, Spraying Systems Co.) were distributed in the 15 zones of the canopy, which was arbitrarily divided. These zones resulted from dividing the canopy into three heights (Figure V-3A) and five locations (Figure V-3B). Locations 1 to 4 were located 50 cm from the edge of the canopy, whereas location 5 was in the centre of the tree. WSP were stapled to two randomly selected leaves.



*Figure V-3. A) Side view of a standard tree. Distribution of WSP in height. B) Top view of a standard tree. Distribution of WSP at each height.*

Tap water without pesticides was sprayed during these experiments. Once the trees were sprayed and the WSP had dried, the pieces were collected and stored in dry conditions. In the laboratory, collectors were photographed, and these images were analysed with specific software (Matrox Inspector, version 2.2, Matrox, Dorval,

Canada) following the methodology described by Chueca et al. (2010). The images were taken with 20 pixels mm<sup>-1</sup> resolution. Objects in the image that comprised a single pixel were considered noise and therefore removed. Therefore, impacts of less than 50 µm diameter were not detected. In each image, the programme detects all impacts (deposited droplets produced by the spray over the collector) larger than 2.5·10<sup>-3</sup> mm<sup>2</sup> and later calculates the coverage, which is the percentage of the total surface covered by the impacts.

Once the estimated coverage of each WSP was obtained, the mean coverage of locations 1 to 4 was calculated for each height, thereby obtaining the value of the coverage at 50 cm depth. To study the effect of the spray application volume on the coverage at the different levels of height and depth, a one-way Analysis of Variance (ANOVA) was performed at each combination of height and depth.

Because it was established that each of the WSP sampling zone into which the tree had been divided represented a certain percentage of the total volume of the canopy, to estimate the overall coverage in the trees with each application volume, the so-called Weighted Coverage (WC) was calculated. Each of the heights in the central part of the canopy was considered to represent 5% of the total volume, and those volumes corresponding to sampling locations at 50 cm depth accounted for 25% of the total volume in the upper and lower positions and the 35% at the Middle height.

Following this reasoning, the Weighted Coverage can be expressed by Equation V-1:

$$WC (\%) = 0.05 (\%Cov_{TC} + \%Cov_{MC} + \%Cov_{BC}) + 0.25(\%Cov_{T50} + \%Cov_{B50}) + 0.35\%Cov_{M50} \quad V-1$$

where

$\%Cov_X$  is the mean Coverage (%) of zone X of the canopy

T/M/B are the Top / Middle / Bottom heights

C/50 are the depths at the Centre of the tree / at 50 cm from the edge of the canopy

Finally, the significance of the spray application rate on the Weighted Coverage was studied by means of a one-way ANOVA.

### 1.2.5 Study of the biological efficacy of treatments

The efficacy of each treatment was evaluated by estimating the level of infestation prior to harvest using the so-called Infestation Index (II). This parameter was obtained by counting the scales present in 20 random fruits around the canopy of each tree. These fruits were taken from the central tree of each replicate, using the outer trees as a buffer between treatments.

The infestation of each fruit was evaluated according to a growing scale of seven levels of infestation intensity: 0 (without scales over the fruit), 1 (from 1 to 10 scales), 2 (from 11 to 20 scales), 3 (from 21 to 30 scales), 4 (from 31 to 40 scales), 5 (from 41 to 50 scales), 6 (from 51 to 100 scales) and 7 (more than 100 scales). Finally, the Infestation Index of each tree was calculated, with the infestation intensity of each fruit and the frequency of each level (number of fruits at each level of infestation intensity) taken into account, by means of the Townsend-Heuberger formula (Townsend and Heuberger, 1943) (Equation V-2).

$$\text{Infestation Index (\%)} = 100 \times \frac{\sum_{i=0}^7 n_i \times v_i}{N \times V} \quad \text{V-2}$$

where

$n_i$  is the number of fruits at the  $i$ th level of infestation intensity

$v_i$  is the  $i$ th level of infestation intensity

$N$  is the total number of fruits evaluated in a tree (20)

$V$  is the maximum level of infestation (7)



Study of the biological efficacy of the treatment in each orchard was performed using the following steps:

- Tests to establish whether the IIs of all the treatments were significantly different from that of the Control treatment;
- Tests to establish whether the organophosphate treatments differed from the Standard treatment;
- A study to establish whether the spray application rate affected the II;
- Determination of which parameters affected the II and whether they were different for each treatment.

To test whether the treatments were effective, the II of all treatments, including the Standard treatment, were studied using Dunnett's test (Dunnett, 1955) in order to determine whether they differed significantly from that of the Control treatment in each orchard. A significant difference would indicate that they could be considered effective. Similarly, the II of CBP and CMBP treatments were compared with the II of the Standard treatment to determine whether they differed significantly. Again, Dunnett's test was used.

Next, the effect of the spray application volume on the II was studied. For this purpose, three separate ANOVA tests of the II were performed using the spray application volume as a factor: one for the CBP treatment data, one for the CMBP treatment data and one for the Standard treatment data. Fisher's LSD test (Fisher, 1935) was used for mean comparisons.

In all of these studies, the assumption of normal distribution of data was assessed using Shapiro-Wilk test (Shapiro and Wilk, 1965), and the assumption of homoscedasticity using Levene's test (Levene, 1960).

In the next step, an attempt was made to discover the parameters that had more influence on the Infestation Index. Multiple Linear Regression (MLR) was used

to study the relationship between the II of the treatments (dependent variable) and the Infestation Index of the Control treatment ( $II_{\text{CONTROL}}$ ), the Weighted Coverage (%), the spray application volume (l/ha), the water volume applied per tree (l/tree) and/or the water volume applied per volume unit of canopy ( $l/m^3$ ) as independent variables.

In order to test whether the relationship between the Infestation Index and the different parameters was affected by the products, indicator variables were included in the regression model. An indicator variable is one that takes the value 0 or 1 to indicate the absence or presence of a categorical effect that may be expected to shift the outcome. When an indicator variable has  $n$  categories, only  $(n-1)$  indicator variables are introduced in order to avoid multicollinearity. The category for which the indicator is not assigned is known as the base group (Suits, 1957; Gujarati, 2003). In the present case, it was the CBP treatment. Indicator  $I_{\text{CMBP}}$  was used, which took a value of 1 for the experimental data corresponding to CMBP treatments and a value of 0 otherwise. If  $I_{\text{CMBP}}$  or an interaction with  $I_{\text{CMBP}}$  is statistically significant, the relationship between the dependent variable and the independent variables for CMBP treatments is different from the rest of treatments. Similarly,  $I_{\text{STAND}}$  was used for assessing the influence of the Standard treatments, taking a value of 1 for the experimental data corresponding to Standard treatments and a value of 0 otherwise.

MLR analysis followed an iterative process in which all the experimental data were included. It started by including the independent variables, the two indicator variables and their interactions in the model. Then the variable with the highest, non-significant p-value ( $\alpha > 0.05$ ) was eliminated and the model was recalculated until all variables present in the model had significant coefficients.

In all fitted models, all the assumptions of linear regression were checked. No outliers were identified.

### 1.2.6 Proposing a parameter to evaluate the quality of the treatments

This section is aimed at proposing a method for assessing the quality of the coverage by determining whether the observed coverage in the experiments would be adequate to achieve a certain level of control of CRS. For this purpose, a new parameter was defined, called the theoretical efficiency of deposition, based on the minimum deposit needed to achieve the maximum level of control of CRS in the laboratory and an evaluation was carried out to establish whether it had a statistically significant relationship with the Infestation Index.

#### *1.2.6.1 Definition of the theoretical efficiency of deposition*

In Garcerá et al. (2011) the amount of deposited solution per unit surface of CBP and CMBP was related to coverage and mortality at different development stages of CRS. In these experiments, PVC collectors were used as artificial targets to measure coverage because their drop retention behaviour was similar to that of citrus leaves (Mercader et al., 1995). In contrast, water sensible papers were used in field trials because they are easy to handle, do not need dye for their processing and this may be postponed until arriving to the laboratory. Therefore, in field tests it is easier and faster to use this type of collectors, so that its use is widespread and is very accessible. However, they have a number of limitations that must be taken into account when interpreting the results, related to the deformation of the impact of the drop. By the very nature of the material, liquid is absorbed by the paper and the impact spreads. Therefore, to relate coverage data obtained in laboratory and in field, a regression model was established (See Annex 3).

In the present work, the theoretical efficiency of deposition (TE, %) in one of the arbitrary zones in which the canopy was divided was defined as the percentage of collectors reaching the minimum deposit that achieved the maximum efficacy in the above-mentioned work.

It is important to note that the proportion of individuals in a particular developmental stage varies during the season. In the first treatments, targeting the first generation of CRS, younger states predominate. The minimum deposit to control the pest with both organophosphate products in this stage in laboratory trials was  $1.01 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ , which entailed 11% coverage on the PVC collectors for CBP and 22% for CMBP. These data were used to calculate the TE in the first treatments ( $TE_1$ ).

However, because there is not a clear predominance of young individuals and proportion of adult stages is higher in the second treatments, data concerning the efficacy on adults were used. Based on the laboratory results, it was concluded that the minimum necessary deposit increased to  $3.41 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  in treatments with CBP, which entailed 40% coverage on the PVC collectors, and a deposit of  $4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  and 60% coverage in treatments with CMBP. These data were used to calculate the TE in the second treatments ( $TE_2$ ).

The methodology used to calculate the TE in each orchard was as follows. Firstly, the coverage that would have been obtained on PVC was estimated from the data observed on WSP because laboratory experiments were performed on PVC. The Equation V-3 (See Annex 3) was used:

$$\text{Coverage PVC (\%)} = \frac{\ln\left(1 - \frac{\% \text{ Coverage WSP}}{102}\right)}{-0.032} \quad \text{V-3}$$

Next, with account taken of all the collectors located in each zone of the canopy of all tested trees in an orchard, the percentage of those collectors that reached the stated minimum coverage for each treatment ( $TE_1$  and  $TE_2$ ) was calculated. Finally, a weighted TE for each generation ( $WTE_1$  and  $WTE_2$ ) and each product was calculated for the whole canopy by means of the Equation V-4.

$$WTE (\%) = 0.05(\%TE_{TC} + \%TE_{MC} + \%TE_{BC}) + 0.25(\%TE_{T50} + \%TE_{B50}) + 0.35\%TE_{M50} \quad \text{V-4}$$

where

$\%TE_X$  is the Theoretical Efficiency (%) of zone X of the canopy

T/M/B are the Top / Middle / Bottom heights

C/50 are the depths at the Centre of the tree / at 50 cm from the edge of the canopy

*1.2.6.2 Testing the relationship between observed efficacy and theoretical efficiency of deposition*

Multiple Linear Regression was employed to study the relationships between the observed efficacy in the field, as represented by the II, and the theoretical efficiency of the deposition, as represented by  $WTE_1$  and  $WTE_2$ . For this purpose, models were generated in which the IIs of the treatments in each orchard was the dependent variable, and the II of the Control treatment,  $WTE_1$ , and  $WTE_2$  were the independent variables. The II of the Control treatment was included because it was known to have an influence on efficacy.

Standard treatments were not included in the study because there was no information available about their TEs. Again, in all fitted models, the assumptions of linear regression were checked. No outliers were identified.

All statistical analyses performed in this work were considered at the 95% confidence level and were carried out with Statgraphics® Plus v5.1 software (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, Virginia, USA).

## **1.3 Results**

### **1.3.1 Analysis of spray distribution in the canopy**

In orchard A, in spite of a positive relationship between the spray application volume and coverage (Figure V-4), significant differences than could be attributed to applied volume were found only in the Middle height (Table V-3).

In orchard B, a positive relationship between spray application volume and coverage was also observed, except in the Middle height. However, coverage

differences due to application volume were only significant at the Top height and at a depth of 50 cm. Figure V-4 shows that the canopy reached the lowest coverage at the Top when 3000 l/ha was applied. Coverage of the Middle height was already near saturation with the lowest volume. It is worth noting that coverage was close to 90-100% in all cases when 5000 l/ha of water was applied, so it can be assumed that coverage by the formulations will be very high.

A positive relationship between spray application volume and coverage was also observed in orchard C (Figure V-4), but differences in coverage were significant only at a depth of 50 cm, both in the Middle and the Bottom of the canopy, and in the centre at Bottom height (Table V-3). At the Bottom of the trees, coverage increased almost to saturation.

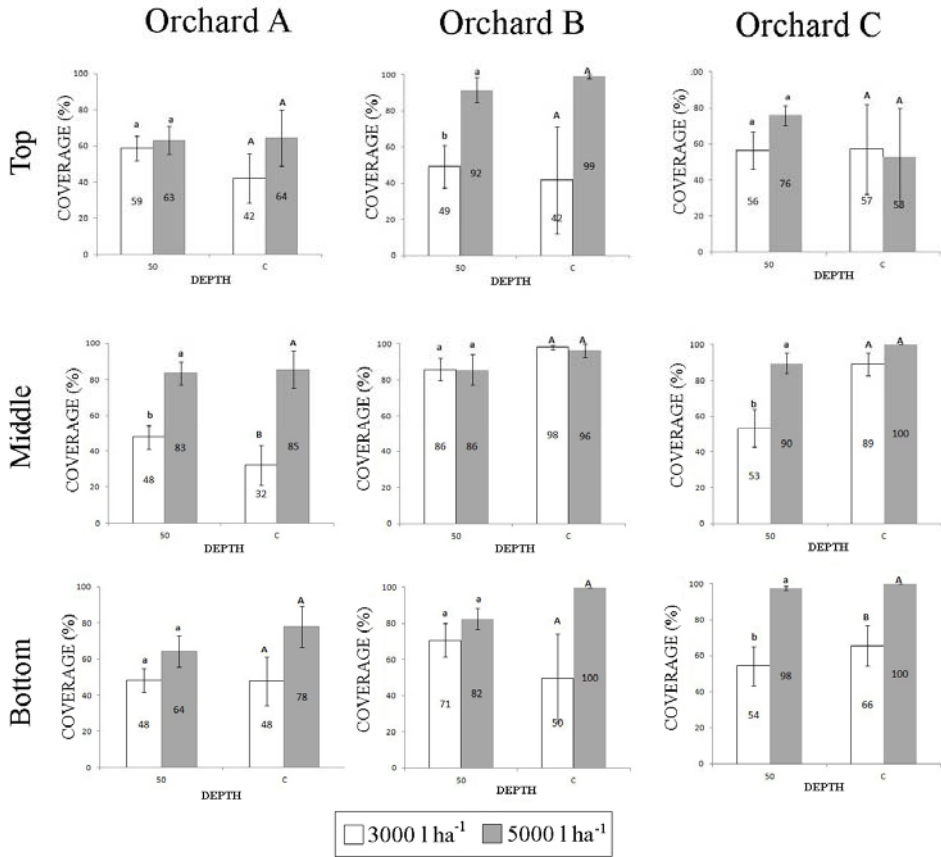


Figure V-4. Coverage (%) at each height and depth (mean  $\pm$  SE) in orchards A, B and C. Means within each combination height x depth with different letters are significantly different (LSD test,  $P < 0.05$ ).

Table V-3. Significance of the spray application volume on coverage for each height and depth in each orchard

Orchard	Height	Depth	F	Df	P
A	Top	50	0.18	1, 60	0.6758
		C	1.09	1, 17	0.3110
	Middle	50	12.87	1, 60	0.0007*
		C	11.83	1, 18	0.0031*
	Bottom	50	2.20	1, 59	0.1430
		C	2.64	1, 18	0.1223
B	Top	50	11.20	1, 19	0.0036*
		C	3.80	1, 5	0.1232
	Middle	50	0.00	1, 22	0.9918
		C	0.19	1, 5	0.6870
	Bottom	50	1.15	1, 23	0.2942
		C	4.20	1, 5	0.1097
C	Top	50	2.85	1, 22	0.1064
		C	0.01	1, 5	0.9090
	Middle	50	9.11	1, 23	0.0063*
		C	3.00	1, 5	0.1583
	Bottom	50	15.48	1, 23	0.0007*
		C	9.39	1, 5	0.0375*

\*There are significant differences between spray application volumes (LSD test,  $P < 0.05$ ).

Based on these results, in orchard A, the Weighted Coverage achieved (mean  $\pm$  SE) was  $51.46 \pm 7.95\%$  when 3000 l/ha was applied and  $74.78 \pm 7.94\%$  when 5000 l/ha was applied, although this difference was not significant ( $F = 4.08$ ;  $df: 1, 18$ ;  $P = 0.0594$ ). In orchard B, the Weighted Coverage achieved (mean  $\pm$  SE) was  $69.32 \pm 5.55\%$  for 3000 l/ha and  $87.80 \pm 4.76\%$  for 5000 l/ha, which were not significantly different either ( $F = 6.39$ ;  $df: 1, 5$ ;  $P = 0.0648$ ). In contrast, in orchard C, the Weighted Coverage achieved with each spray application volume differed significantly, with values of  $56.96 \pm 6.06\%$  for 3000 l/ha and  $87.26 \pm 0.32\%$  for 5000 l/ha ( $F = 24.92$ ;  $df: 1, 5$ ;  $P = 0.0075$ ). This may be due to the fact that orchard C had double the apparent canopy volume of the other orchards. Because the canopies were bigger, the surface to be wetted could be assumed to be also bigger and the differences in coverage to be greater than in the other orchards.



### 1.3.2 Biological efficacy of the treatments

#### 1.3.2.1 *Efficacy of organophosphate treatments versus the Control and the Standard treatments*

The Infestation Index (mean  $\pm$  SE) of Control treatment was  $58.86 \pm 7.16\%$  in orchard A,  $46.57 \pm 6.77\%$  in orchard B and  $37.57 \pm 1.33\%$  in orchard C. Dunnett's test showed that the Standard treatments significantly lowered the II compared to the Control treatment in all orchards. In the treatments with CBP, the two spray application volumes tested significantly reduced the II compared with the Control treatment, except for those applied at 3000 l/ha in orchard B. CMBP treatments IIs were not significantly different from that of the Control treatment, except for treatment at 5000 l/ha in orchard C (Table V-4). However, it is noteworthy that in the Control treatment there appeared to be a greater number of fruits with high infestation levels (level 6-7) and treated trees had more fruits without scales or with an infestation of up to 10 scales per fruit (level 0-1) (data not shown).

In comparing organophosphate treatments against Standard treatments, Dunnett's test found significant differences only in orchard A. Moreover, the IIs of organophosphate treatments in this orchard were higher than those achieved in the other orchards (Table V-4).

Table V-4. Infestation Index (%) of each treatment in each orchard (mean±SE). Significance of the differences of I.I. of CBP, CMBP and Standard applications with the Control and of CBP and CMBP applications with the Standard ones (Dunnett's test). Significance of spray application rate for each treatment in each orchard (ANOVA & LSD test)

Spray application volume (l/ha)	Infestation Index (%) <sup>1</sup>						
	CBP		CMBP		Standard		
	A	B	A	C	A	B	C
3000	40.92±4.35 *,** a	30.07±5.06 a	46.93±4.90 ** a	26.75±4.09 a	18.86±2.54 * a	15.86±3.79 * a	16.28±1.73 * a
5000	39.21±3.62 *,** a	21.78±2.37 * a	47.57±2.93 ** a	24.14±3.21 * a	10.14±2.37 * b	17.14±2.78 * a	13.57±3.79 * a
F	0.09	2.20	0.01	0.26	6.28	0.07	0.42
Df	1, 19	1, 19	1, 19	1, 18	1, 9	1, 9	1, 9
P	0.7652	0.1557	0.9116	0.6192	0.0366	0.7915	0.5331

\*There are significant differences with the Control in the same orchard (Dunnett's test, P<0.05)

\*\*There are significant differences with the Standard in the same orchard (Dunnett's test, P<0.05)

<sup>1</sup>Means within a column followed by a different letter are significantly different (LSD test, P < 0.05)

### 1.3.2.2 Influence of the Spray application volume

There were no significant differences between the IIs of the organophosphate treatments applied at 3000 and 5000 l/ha (Figure V-5). The only significant differences were found in the Standard treatment in orchard A, where treatment at 3000 l/ha reached a significantly higher infestation than treatment at 5000 l/ha. It is worth noting that the Infestation Index observed with both application volumes resulted in economically acceptable control of CRS, because after fruit conditioning in the packing house, technicians reported that there were no significant differences in the amount of downgraded fruits with respect to those coming from other orchards of the same farming.

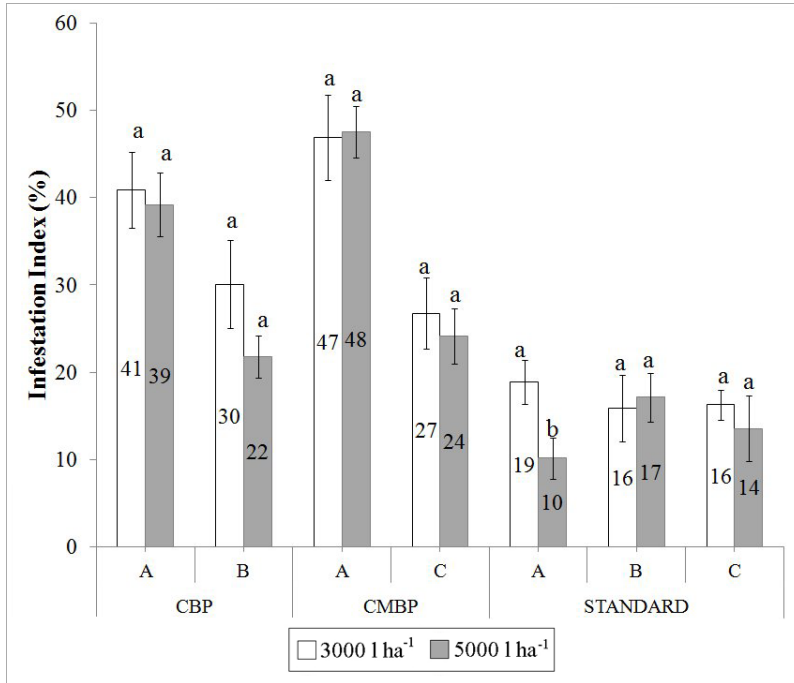


Figure V-5. Infestation Index (%) of treatments prior to harvest (mean  $\pm$  SE), for CBP, CMBP and Standard treatments for orchard A, B and C respectively. Means within each combination product  $\times$  orchard with a different letter are significantly different (LSD test,  $P < 0.05$ ).

### 1.3.2.3 Factors that influence the Infestation Index

Table V-5 shows the results of the regression analysis after eliminating variables with regression coefficients that were not significant. MLR analysis shows that a significant linear relationship ( $P_{\text{MODEL}} < 0.0001$ ; R-squared adjusted = 0.568; number of data points = 119) was found between IIs of treatments, the II of the Control treatment and the water volume applied per unit volume of canopy. It is important to note that neither the Weighted Coverage nor the spray application volume made a significant contribution to II in the MLR model ( $P_{\text{WC}} = 0.8876$ ;  $P_{\text{SprayAppVol}} = 0.7205$ ). Although the value of R-square is not high, this study did not aim to construct a predictive model for the Infestation Index but to find relationships between it and the other independent variables. As  $P_{\text{MODEL}}$  is lower than 0.0001, it can be concluded that significant linear relationships have been found between the

Infestation Indexes of the treatments, the IIs of the Control treatments and the water volume applied per unit volume of canopy.

Table V-5. MLR results: regression coefficients for II (%) as a function of  $II_{CONTROL}$  (%), applied volume per unit canopy ( $l/m^3$ ) and products ( $R^2 = 0.586$ )

Parameter	Estimate	Standard Error	P
Constant	-16.557	6.842	0.0171
Volume ( $l/m^3$ )	-16.377	6.875	0.0189
$II_{CONTROL}$	1.123	0.154	<0.0001
$I_{STAND}^1$	33.999	11.691	0.0056
$(II_{CONTROL}) * I_{STAND}^1$	-0.976	0.228	<0.0001
Volume ( $l/m^3$ ) * $I_{CMBP}^2$	13.014	4.201	0.0025

<sup>1</sup> $I_{STAND}$ = 1 for data obtained with Standard treatments, 0 otherwise  
<sup>2</sup> $I_{CMBP}$ = 1 for data obtained with CMBP treatments, 0 otherwise

The significance and sign of the regression coefficients that appear in Table V-5 indicate that the higher the  $II_{CONTROL}$  in an orchard, the higher are the II of the treatments. Moreover, these findings also indicate that an increase in water volume applied per unit volume of canopy significantly lowered the II. This suggests that this variable has more influence on II values than simply the spray application volumes. It has to be considered that, although the water volume applied per unit volume of canopy is calculated from the spray application volume, it also includes information about the tree density and average size of trees.

Analysis of the regression coefficients also shows that the IIs of Standard treatments depended less on  $II_{CONTROL}$  than the IIs of organophosphate treatments. By comparing CBP, CMBP and Standard treatments, it is noted that in CMBP treatments the influence of the volume on the II is lower than in CBP and Standard treatments, which may be because the product is less effective.

1.3.2.4 *Proposing a parameter to evaluate the quality of the treatments*

1.3.2.4.1 Assessment of the theoretical efficiency of deposition (TE)

a) CBP treatments.

Applications in orchard A at 3000 l/ha almost doubled the TE in the outer canopy in relation to the TE in the internal part of the tree (Figure V-6). However, these differences disappeared in the treatments at 5000 l/ha. The lowest effect of the spray volume is observed at the Top of the canopy. The spray volume of 3000 l/ha stands out because the low values of TE at the Middle height of the centre of the canopy.

In orchard B, all of the TE values were generally higher than in orchard A. This could be because estimated LAD in this orchard was higher than the actual one, so with the lowest application volume most of the canopy already reached the minimum deposit. It is remarkable that at the Middle height, both spray volumes reached 100% of TE, whereas when 3000 l/ha applied at the Top height and in the centre, only 33% of TE was obtained.

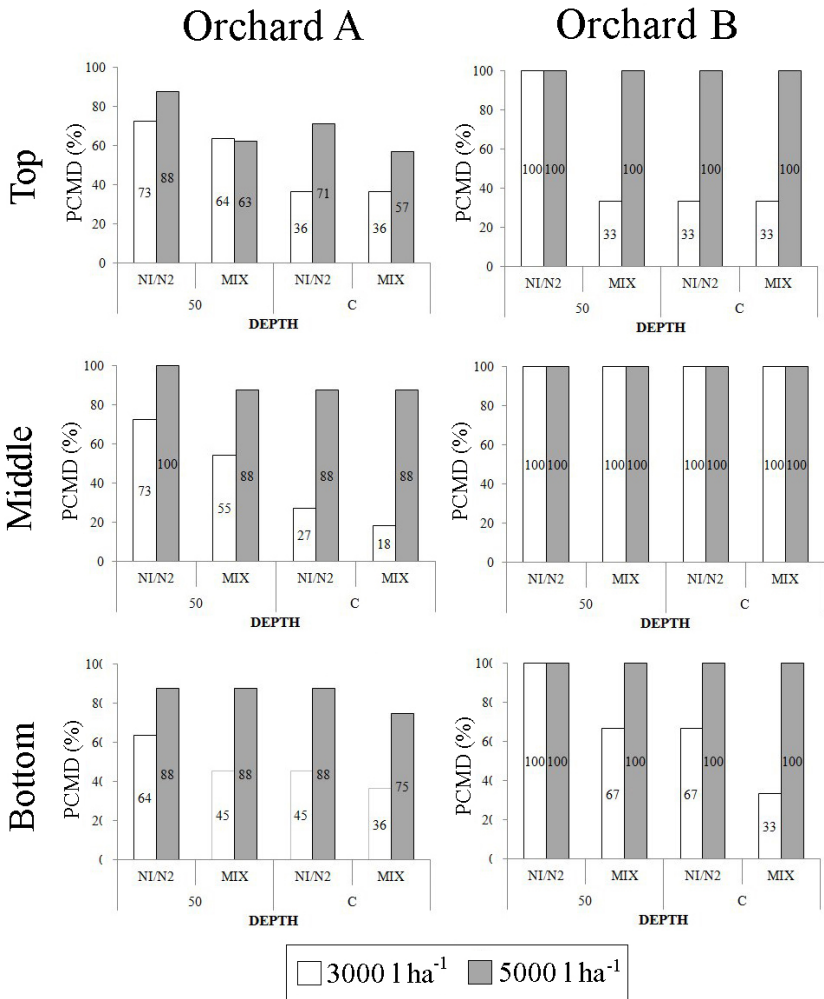


Figure V-6. TE (%) of treatments with CBP against the first generation of CRS (predominance of N1/N2 stages, TE<sub>1</sub>) and the second generation (coexistence of a stages mix, TE<sub>2</sub>) for each height and depth in orchards A and B.

WTE was increased in all cases by increasing the spray application volume (Table V-6). The increase was between 40 and 50% in orchard A in the treatments to the first and second generations. In orchard B, the values were in all cases higher, reaching 100% with 5000 l/ha.

b) CMBP treatments

In orchard A, both inside and outside, at the Middle height an increase in spray volume increased TE, while at the Top part it had virtually no effect (Figure V-7).

In orchard C, a TE value of almost 50% was reached in all zones when 3000 l/ha was applied. The TE value was increased to 100% by applying 5000 l/ha, except at the Top, where there was no increase. Again, it seems that the estimated LAD in this orchard was higher than the actual one.

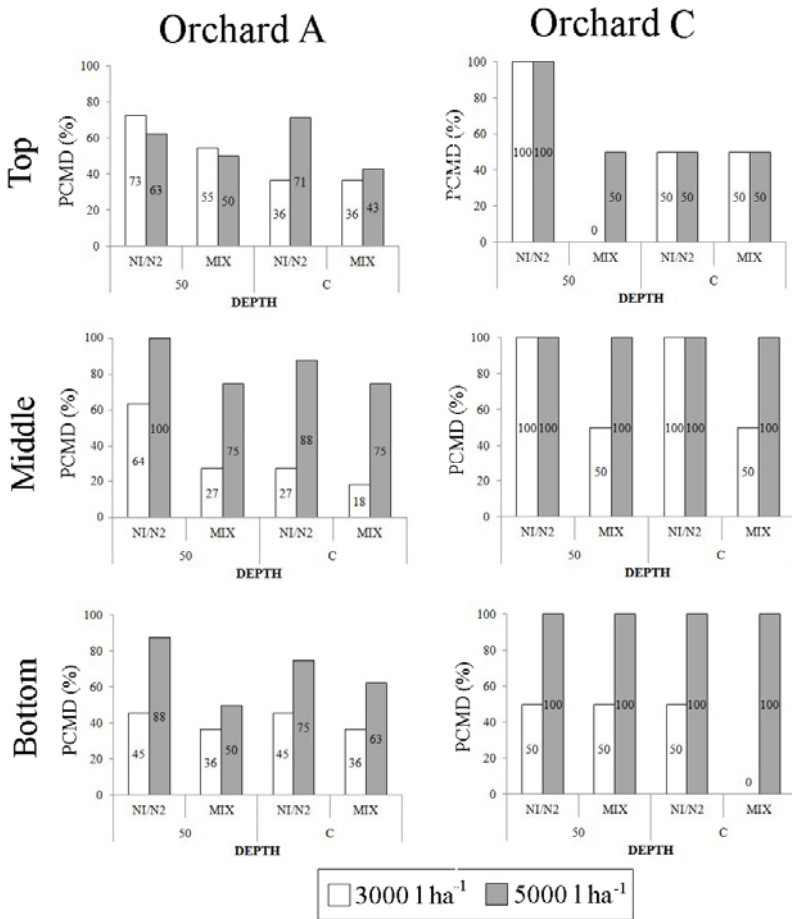


Figure V-7. TE (%) of treatments with CMBP against the first generation of CRS (predominance of N1/N2 stages, TE<sub>1</sub>) and the second generation (coexistence of a stages mix, TE<sub>2</sub>) for each height and depth in orchards A and C.

As in CBP treatments, WTE was increased in all cases by increasing the volume (Table V-6). However, values were lower with CMBP, and the increase caused by spray volume increase was not as high as with CBP.



Table V-6. WTE (%) of treatments with CBP and CMBP against the first generation of CRS (predominance of, WTE<sub>1</sub>) and the second generation (coexistence of a mix of stages, WTE<sub>2</sub>) in orchards A, B and C.

Spray application volume (l/ha)	CBP				CMBP			
	A		B		A		C	
	WTE <sub>1</sub>	WTE <sub>2</sub>	WTE <sub>1</sub>	WTE <sub>2</sub>	WTE <sub>1</sub>	WTE <sub>2</sub>	WTE <sub>1</sub>	WTE <sub>2</sub>
3000	65.00	50.91	95.00	68.33	57.27	36.82	82.50	35.00
5000	91.07	79.11	100.00	100.00	84.20	60.27	97.50	85.00

#### 1.3.2.4.2 Testing the relationship between field efficacy and theoretical efficiency of deposition

Table V-7 shows the results of the regression after removing the variables whose regression coefficients were not significant. The significance and sign of the regression coefficients that appear in Table V-7 indicate again that the higher the  $\Pi_{\text{CONTROL}}$  in an orchard, the higher are the  $\Pi$  of the treatments ( $P_{\text{MODEL}} < 0.0001$ ; R-squared adjusted = 0.35; number of data points = 79). Moreover, the regression coefficient of WTE<sub>2</sub> was also significant, but the coefficient of WTE<sub>1</sub> ( $P = 0.6601$ ) was not.

Table V-7. Regression coefficients of the MLR for  $\Pi$  (%) as a function of  $\Pi_{\text{CONTROL}}$  (%) and WTE ( $R^2 = 0.367$ )

Parameter	Estimate	Standard Error	P
Constant	-6.142	8.722	0.4835
$\Pi_{\text{CONTROL}}/10$	0.995	0.156	<0.0001
WTE <sub>2</sub> /100	-0.146	0.064	0.0258

## 1.4 Discussion and Conclusions

In general, it was observed that increase in the spray application volume increased mean coverage and distribution uniformity in the canopy. Differences in coverage were only statistically significant in certain cases and at different locations inside the canopy, which could be caused by differences in foliar density, canopy size

and pruning (Stover et al., 2002). The lowest values of coverage were always found at the Top of the canopy, showing that this was the most difficult area for the operators to treat. The highest levels of coverage were achieved at the Middle height, especially in orchards B and C, probably because these parts of the canopy were easier to reach by the operators. As expected, because of the dense foliage, the inner canopy obtained lower coverage than the outer canopy, but this difference decreased when the highest application volume was applied. Similar results were observed using airblast sprayers (Salyani and McCoy, 1989b; Whitney et al., 1989; Hoffmann and Salyani, 1996; Chueca et al., 2009).

It is important to state that, so as not to affect the experiment, coverage was measured by spraying only water without adding pesticides. Laboratory trials showed that, for the same deposited volume, CBP and CMBP gave higher coverage than water (Garcerá et al., 2011); therefore, it is possible that actual values of coverage produced by the applications were greater than the ones shown. Nevertheless, the authors believe that the present results provide a good approximation of how the pesticides were distributed in the canopy.

No significant differences in biological efficacy against CRS were found between the two spray application volumes tested, although they differed by 40%: this finding is not shared by other authors. Differences among studies could be attributed to not only differences in shape, size and canopy density of trees, but also to the different active ingredients used and their different toxicities, modes of action and formulations. This difference should be noted because the results of different works are often compared in the literature without considering how the products act against the pest or how they are distributed in the tree. As Stover et al. (2002) noted, biological efficacy is not only a consequence of the different sizes of the impacts and uniformity in the deposition. Moreover, the differentiating point in this work is that the lower volume has been deduced from the efficacy model specifically developed

for the pest and the product, thus supporting its applicability in the application volume decision.

Many authors have found a positive relationship between the spray application volume and the efficacy of control of scales; for instance, Cunningham and Harden (1999), who used the organophosphate methidathion, which could be less effective than those employed in this work, as has already been stated (Cunningham, 1996). Similarly Beattie et al. (2002) and Grout and Stephen (1993) found efficacy differences depending on the spray application volume, but they applied mineral oils that affect insects in a very different way. The routes of entry of organophosphates are through ingestion, absorption or inhalation and cause the inhibition of acetylcholinesterase. Mineral oils cause anoxia to the individuals by covering their respiration organs; therefore, their efficacy may depend more on coverage than on the deposited amount of product, even though both parameters are frequently related (Kallianpur et al., 2002; Taverner, 2002; Garcerá et al., 2012).

Conversely, Chueca et al. (2009) using mineral oils, did not find any influence of application volume in the control of *Coccus pseudomagnoliarum* Kuwana; neither did Grafton-Cardwell and Reagan (2007, 2009), using spirotetramat against CRS. In the present authors' opinion, this finding underlines not only the importance of the route of entry and the mode of action of the pesticide but also the biology of the target pest in all of these studies. Furthermore, this result highlights the difficulty of generalising results obtained with different plant protection products and under specific tree spacing and canopy architectures that produce different deposition and coverage distributions.

Although increase of the application volume from 3000 l/ha to 5000 l/ha produced an increase of coverage, it did not affect the Infestation Index in each orchard in the present experiments. Furthermore, it is important to note that the volume of pesticide applied per unit volume of canopy significantly affected the Infestation Index. This effect was more evident in CBP treatments. This result may

indicate that the differences between orchards that caused differences in spray volume per unit volume of canopy played a more important role in affecting Infestation Indexes than mere application volumes. This result underpins the idea that the influence of vegetation must be taken into consideration when recommending a dose. It is proposed that this information should be included in the label of the plant protection products.

It has been shown that the Infestation Index in the Control trees was very different in each orchard, indicating great differences in the level of initial infestation of each orchard. It has also been demonstrated that this variable was strongly related to the efficacy of the treatments in each orchard. This fact highlights the importance of the initial infestation level on the control achieved by organophosphate treatments against CRS.

A method has been proposed for assessing the quality of application by means of the so-called theoretical efficiency of the treatment, based in previous laboratory experiments. The present studies have shown that this parameter calculated in the second generation of CRS, had a significant relationship with the final II value, thus proving its potential interest for further modelling of the efficacy of treatments. The authors are aware that the efficiency of field treatments is not necessarily the same as that observed in the laboratory (the more adverse conditions in the field may reduce the survival expectancy of the pest, and on the other hand, the susceptibility of wild CRS populations to these pesticides could be lower). However, the results suggest that some relationship between laboratory and field efficacies could be found.

Finally, this research shows that greater coverage did not result in greater efficacy, raising the possibility that the quantity of organophosphate pesticides used can be reduced by optimising the spray application volume, on the basis of the volume of the target canopy.

## **1.5 Acknowledgements**

This research was partially funded by Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (projects AGL2007-66093-C04-01 and AGL2010-22304-C04-01) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). C. Garcerá was recipient of a grant of IVIA.



## **2 VALIDACIÓN DEL MODELO DOSIS-RESPUESTA PARA ACEITES MINERALES CONTRA EL PIOJO ROJO DE CALIFORNIA EN CONDICIONES DE CAMPO**

### **2.1 Introducción**

Los modelos de respuesta de dosis-eficacia de CRS para los aceites minerales muestran una relación de dependencia entre ambos parámetros. Estas curvas permiten determinar cuál es el depósito que se debería alcanzar para conseguir la eficacia máxima posible. A partir de estos datos es posible determinar el volumen de caldo que se debería utilizar en condiciones de campo. Sin embargo, existe una gran cantidad de factores externos que pueden influir tanto en la deposición del caldo en el árbol como en la eficacia.

En los tratamientos con organofosforados en campo se demuestra que el volumen de aplicación empleado en los experimentos no afecta significativamente a la eficacia de los tratamientos. Sin embargo, la eficacia está influida por la relación entre el volumen de caldo aplicado y el volumen de vegetación a tratar. Además, se ha verificado que es posible calcular parámetros que permiten evaluar la calidad de los tratamientos a partir de la relación existente entre el depósito de producto y la eficacia observada en laboratorio.

En este apartado se realiza un estudio similar, pero aplicado a los aceites minerales, y se analiza si hay diferencias entre ambos tipos de productos.

Se estudia el efecto del volumen de aplicación (l/ha) en la eficacia de control de CRS cuando se utilizan aceites minerales (PDSO) en condiciones de campo y se determina qué parámetros de la aplicación afectan a la eficacia final.

Por último, se explora el potencial de los parámetros extraídos a partir de la relación existente entre depósito y eficacia para evaluar la calidad de los tratamientos en cuanto a la eficacia que se espera obtener con un determinado depósito.

## 2.2 Materiales y métodos

Se llevaron a cabo una serie de experimentos siguiendo la misma metodología del punto anterior. Las particularidades de estos ensayos se detallan a continuación.

### 2.2.1 Parcelas experimentales

Se llevó a cabo un ensayo en dos parcelas comerciales en Valencia (España) con problemas de CRS previos. Una de ellas fue la parcela A descrita en el punto anterior. Las características de la segunda parcela, que se denomina parcela D, se muestran en la Tabla V-8. En la Figura V-8 se muestra la localización de las parcelas A y D en la Comunidad Valenciana (España) y sus imágenes aéreas.

*Tabla V-8. Características de la Parcela D*

Parcela	Localización		Material vegetal	Dirección de las filas	Área (ha)	Marco (m)	Dimensiones de la vegetación (m) <sup>1</sup>	Volumen aparente de copa <sup>2</sup> (m <sup>3</sup> /árbol)
	Municipio	Coordenadas geográficas						
D	Bétera	39° 35' 9.21" N 0° 24' 36.91" O	Clementina cv. Clemenules	Este-Oeste	0.65	5.1 x 4.9	2.1 x 2.9 x 2.7	8.82

<sup>1</sup>Altura x Diámetro 1 x Diámetro 2

<sup>2</sup>Considerando la copa de los cítricos como un elipsoide



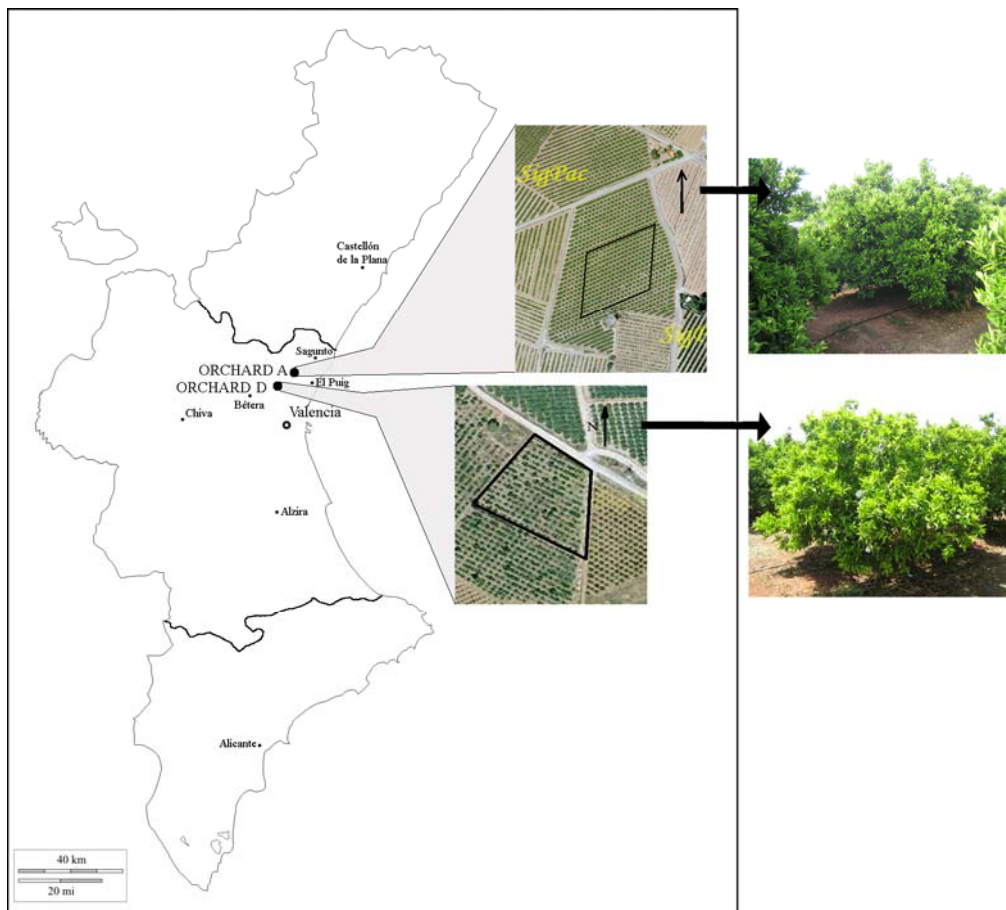


Figura V-8. Localización e imágenes aéreas de las parcelas A y D (Fuente: Visor de SigPac del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente).

## 2.2.2 Tratamientos aplicados y equipo de pulverización

Se llevaron a cabo los experimentos con los dos aceites empleados en los ensayos de laboratorio (Capítulo IV, apartado 2): Laincoil<sup>®</sup>, de aquí en adelante denominado Aceite A, y Sunspray Ultrafine<sup>®</sup>, denominado de aquí en adelante Aceite B.

Las aplicaciones de los aceites minerales, empleados a la concentración de registro, se compararon con un control negativo, es decir, un tratamiento al que no se realizó ninguna aplicación, denominado a partir de ahora Control. Además en la

parcela A también se aplicó un control positivo, denominado tratamiento Estándar, descrito en el punto anterior. Los tratamientos con aceites minerales se aplicaron con una concentración de 15 ml/l, tanto en primera como en segunda generación de CRS. Todos los tratamientos se realizaron a dos volúmenes de aplicación. El volumen más alto se decidió tras consultar con el técnico encargado de la parcela, y se corresponde con el volumen que se alcanza al punto de goteo. El más bajo es el volumen calculado en base a los depósitos mínimos determinados en los experimentos de recubrimiento-dosis y eficacia-dosis descritos en el Capítulo IV-apartado 2 para las generaciones de la plaga en las que hay mayor heterogeneidad de estadios (son las que requieren más depósito). En dicho apartado se observa que los recubrimientos óptimos en hoja son del 50% cuando se aplica Aceite A y 45% cuando se aplica Aceite B (depósitos mínimos necesarios de  $4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  en los dos casos). La parcela A tiene un volumen de vegetación aparente de  $17.65 \text{ m}^3/\text{árbol}$  y una densidad de superficie foliar estimada experimentalmente de  $5 \text{ m}^2/\text{m}^3$ . A efectos de la aplicación de tratamientos fitosanitarios se considera el doble de esta superficie para tomar en cuenta las dos caras de las hojas. Para alcanzar los recubrimientos mencionados, en el caso de los tratamientos con Aceite A, sería necesario un mínimo de  $0.47 \text{ l}/\text{m}^3$  ( $8.33 \text{ l}/\text{árbol}$ , o  $2975 \text{ l}/\text{ha}$ ). En la parcela D, de una variedad similar, y con un volumen de vegetación de  $8.82 \text{ m}^3/\text{árbol}$ , considerando una densidad foliar similar, los volúmenes mínimos a aplicar por unidad de volumen de vegetación serían los mismos. Como las copas son más pequeñas, los volúmenes de aplicación se reducirían a  $4.16 \text{ l}/\text{árbol}$ , que implican  $1666 \text{ l}/\text{ha}$ . Como resultado, se decidió ensayar en la parcela A los volúmenes de  $3000$  y  $5000 \text{ l}/\text{ha}$ , y en la parcela D los volúmenes de  $2000$  y  $3000 \text{ l}/\text{ha}$  (Tabla V-9). Los tratamientos se aplicaron con el mismo equipo y las mismas condiciones operativas que los descritos en los tratamientos con organofosforados. Igualmente, los dos volúmenes se aplicaron con boquillas de diferente diámetro.

Tabla V-9. Características operativas de los tratamientos

Parcela	Volumen de aplicación (l/ha) y boquilla utilizada	Volumen aplicado	
		l/árbol	l/m <sup>3</sup> vegetación
A	3000 (boquilla 1.5)	8.4	0.47
	5000 (boquilla 1.8)	14	0.79
D	2000 (boquilla 1.2)	5	0.57
	3000 (boquilla 1.5)	7.5	0.85

En la parcela A se ensayó el Aceite A en las campañas 2006 y 2007, con cinco repeticiones de cada tratamiento. En esta parcela cada repetición consistió en la pulverización de 3 árboles adyacentes de la misma fila. En la parcela D, se ensayaron ambos aceites, A y B, durante las campañas 2007 y 2008, con cuatro repeticiones de cada tratamiento. En esta parcela cada repetición consistió en la pulverización de cinco árboles adyacentes de la misma fila.

### 2.2.3 Distribución de la pulverización en la vegetación

Para evaluar la distribución de la pulverización en el árbol en la parcela A se empleó agua, ya que se realizó en una época distinta a las de tratamiento. En la parcela D la evaluación se realizó simultáneamente a la aplicación de los tratamientos del ensayo sobre los árboles por lo que el caldo fue una mezcla de agua y aceite.

La copa del árbol se dividió en 21 zonas de muestreo, resultado de 3 alturas (Figura V-9A) y 7 localizaciones por altura (Figura V-9B). En cada zona se colocó de manera aleatoria un papel hidrosensible grapado a una hoja. Un árbol fue considerado una repetición y se realizaron 6 repeticiones por parcela.

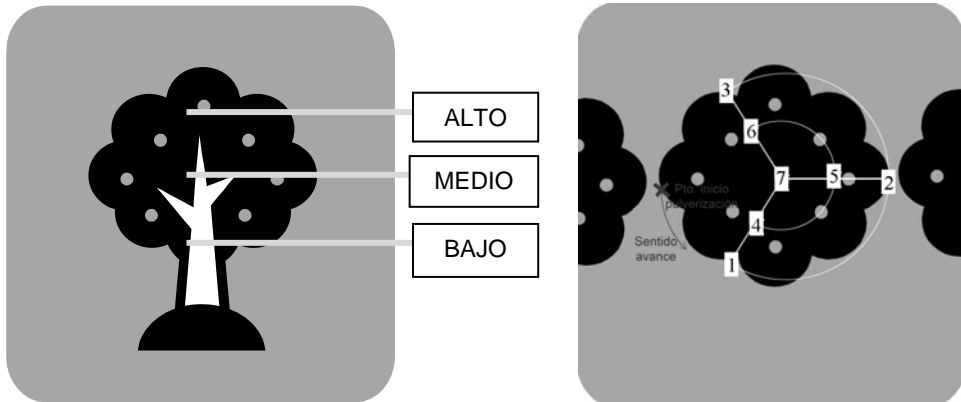


Figura V-9. A) Vista lateral de un árbol tipo. Distribución de los WSP en altura. B) Vista superior de un árbol tipo. Distribución de los WSP en cada altura.

Una vez estimado el recubrimiento obtenido en cada WSP, se procedió a evaluar la distribución del caldo en el árbol en función de la profundidad de vegetación. En la parcela A se calculó el recubrimiento medio de las 3 localizaciones en el exterior de la copa (1-3), que se definió como profundidad 0, y de las 3 localizaciones a 50 cm de profundidad (4-6), que se definió como profundidad 50. El recubrimiento obtenido en la localización 7 se definió como central. En la parcela D, dado que los árboles presentaban un tamaño 50% menor que los de la parcela A, se consideraron dos niveles de profundidad, Exterior, promediando las 3 localizaciones del exterior de la copa (localizaciones 1-3), e Interior, considerando conjuntamente las 3 localizaciones a 50 cm de profundidad y en el centro del árbol (localizaciones 4-7).

Posteriormente se estimó el recubrimiento global de los árboles conseguido con cada volumen de aplicación, lo que denominamos Recubrimiento Ponderado (WC). Para ello, en la parcela A se consideró que cada altura de la parte central del árbol representaba el 5% del volumen total, las zonas de muestreo a 50 cm de profundidad representaban el 19% del volumen total en las alturas Alta y Baja y el 26% en la altura Media, y las zonas del exterior de la copa representaban el 6% del volumen total en las alturas Alta y Baja y el 9% en la altura Media. En la parcela D se

consideró que la altura Media del interior del árbol representaba el 22% del volumen total, y los volúmenes correspondientes a las alturas Alta y Baja del interior eran del 13% respectivamente. Por otro lado, los volúmenes correspondientes al exterior de la copa representaban un 28% del volumen total en la altura Media y un 12% en las alturas Alta y Baja.

Según este razonamiento, en este ensayo el Recubrimiento Ponderado en la parcela A se expresa según la Ecuación V-5:

$$WC(\%) = 0.05(\%Rec_{AC} + \%Rec_{MC} + \%Rec_{BC}) + 0.19(\%Rec_{A50} + \%Rec_{B50}) + 0.26\%Rec_{M50} + 0.06(\%Rec_{A0} + \%Rec_{B0}) + 0.09\%Rec_{M0} \quad V-5$$

donde

$\%Rec_X$  es el recubrimiento medio (%) en la zona X de la copa

A/M/B son las alturas Alta / Media / Baja

C/50/0 son las profundidades de centro del árbol / 50 cm desde el borde de la vegetación / Exterior de la copa

Y el Recubrimiento Ponderado en la parcela D se expresa según la Ecuación V-6:

$$WC(\%) = 0.22\%Rec_{MI} + 0.13(\%Rec_{AI} + \%Rec_{BI}) + 0.28\%Rec_{ME} + 0.12(\%Rec_{AE} + \%Rec_{BE}) \quad V-6$$

donde

$\%Rec_X$  es el recubrimiento medio (%) en la zona X de la copa

A/M/B son las alturas Alta / Media / Baja

I/E son las profundidades Interior / Exterior de la copa

#### 2.2.4 Estudio de la eficacia biológica de los tratamientos

La eficacia de los tratamientos se evaluó estimando el Índice de Infestación (II), como se hizo en el ensayo de organofosforados (ver página 90). A continuación se realizó el estudio de la eficacia biológica de los tratamientos siguiendo los mismos pasos que en este ensayo (ver página 91).

## 2.2.5 Propuesta de un parámetro para evaluar la calidad de los tratamientos

En este apartado se pretende comprobar si el parámetro propuesto para evaluar la calidad de los tratamientos, la Eficiencia Teórica de deposición (TE), es adecuado en el caso de los aceites minerales.

### 2.2.5.1 Estimación de la eficiencia teórica de deposición (TE)

A partir de las curvas de eficacia-deposición de los aceites minerales (Capítulo IV, apartado 2) obtenidas en laboratorio se estableció el depósito mínimo necesario para controlar lo máximo posible a CRS. En los tratamientos de primera generación, cuando predominan los estadios más jóvenes, el depósito fue de alrededor de  $4 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  para el Aceite A, lo que implicó un recubrimiento del 50% sobre PVC, y de alrededor de  $3.4 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  para el Aceite B, lo que implicó un recubrimiento del 44% sobre PVC. Con estos datos se calculó  $TE_1$ .

En los tratamientos contra la segunda generación, cuando hay presentes estadios adultos de CRS, el depósito mínimo necesario para ambos aceites aumentó a  $4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ , que implica un recubrimiento del 50% en los tratamientos con Aceite A y 45% con Aceite B. Con estos datos se calculó  $TE_2$ .

Para calcular TE, en primer lugar se convirtieron los datos de recubrimiento obtenidos sobre papel hidrosensible (WSP) a recubrimiento sobre colectores de PVC utilizando la Ecuación V-7 (Anejo 3) que los relaciona.

$$\text{Recubrimiento PVC (\%)} = \frac{\ln\left(1 - \frac{\% \text{ Recubrimiento WSP}}{102}\right)}{-a} \quad \text{V-7}$$

donde

a= Parámetro que depende del caldo empleado [Agua: 0.032; Aceite A: 0.03; Aceite B: 0.041]

A continuación, teniendo en cuenta todos los colectores situados en cada zona de muestreo de la copa en todos los árboles evaluados, se calculó el porcentaje de estos que alcanzaron el mínimo recubrimiento en cada zona de la copa para cada tratamiento ( $TE_1$  y  $TE_2$ ). Finalmente, se calculó la TE Ponderada (WTE) para toda la copa, para cada generación ( $WTE_1$  y  $WTE_2$ ) y cada aceite.

De modo que la Eficiencia Teórica Ponderada en la parcela A, para el Aceite A, se expresa según la Ecuación V-8:

$$WTE(\%) = 0.05(\%TE_{AC} + \%TE_{MC} + \%TE_{BC}) + 0.19(\%TE_{A50} + \%TE_{B50}) + 0.26\%TE_{M50} + 0.06(\%TE_{A0} + \%TE_{B0}) + 0.09\%TE_{M0} \quad V-8$$

donde

$\%TE_X$  es la Eficiencia Teórica (%) en la zona X de la copa

A/M/B son las alturas Alta / Media / Baja

C/50/0 son las profundidades de Centro del árbol / 50 cm desde el borde de la vegetación / Exterior de la copa

Y la Eficiencia Teórica Ponderada en la parcela D, para los Aceites A y B, se expresa según la Ecuación V-9:

$$WTE(\%) = 0.22\%TE_{MI} + 0.13(\%TE_{AI} + \%TE_{BI}) + 0.28\%TE_{ME} + 0.12(\%TE_{AE} + \%TE_{BE}) \quad V-9$$

donde

$\%TE_X$  es la Eficiencia Teórica (%) en la zona X de la copa

A/M/B son las alturas Alta / Media / Baja

I/E son las profundidades Interior / Exterior de la copa

2.2.5.2 *Análisis de la relación entre la eficacia observada y la eficiencia teórica de deposición*

Siguiendo la misma metodología empleada en el ensayo de organofosforados (página 95), se empleó la Regresión Lineal Múltiple para estudiar las relaciones entre la eficacia observada en el campo, representada por  $II$ , y la eficiencia teórica de deposición, representada por  $WTE_1$  y  $WTE_2$ .

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Análisis de la distribución del caldo en la vegetación

En la parcela A, el aumento de volumen en la mayoría de las zonas evaluadas conllevó un aumento de recubrimiento medio, sin embargo, este aumento sólo resultó significativo en la altura Media, tanto a 50 cm de profundidad como en el centro de la copa (Figura V-10, Tabla V-10). También se observa que al aplicar 3000 l/ha el recubrimiento disminuye al aumentar la profundidad, pero al aplicar 5000 l/ha estas diferencias se reducen.

En la parcela D, prácticamente no se observan diferencias entre volúmenes ni entre profundidades, únicamente se observa efecto significativo del volumen en el Exterior de la altura Media (Figura V-10, Tabla V-10). Las mayores diferencias se debieron a la altura, alcanzando el mayor recubrimiento en la altura Media y el menor en la altura Baja con los dos volúmenes ensayados. El aumento de volumen provocó que la altura Media alcanzase valores de recubrimiento próximos a la saturación en las dos profundidades consideradas.

Basándonos en estos resultados, en la parcela A se obtuvo un valor de recubrimiento ponderado de  $73.03 \pm 6.18\%$  al aplicar 3000 l/ha y de  $90.06 \pm 2.95\%$  al aplicar 5000 l/ha (media  $\pm$  EE), diferencia que resultó significativa ( $F= 5.39$ ; g.l.: 1, 10;  $P= 0.0454$ ). En la parcela D se obtuvo un recubrimiento ponderado (media  $\pm$  EE) de  $78.16 \pm 2.00\%$  para 2000 l/ha y de  $88.28 \pm 1.66\%$  para 3000 l/ha, diferencia que también resultó significativa ( $F = 15.08$ ; g.l.: 1, 17;  $P= 0.0013$ ).



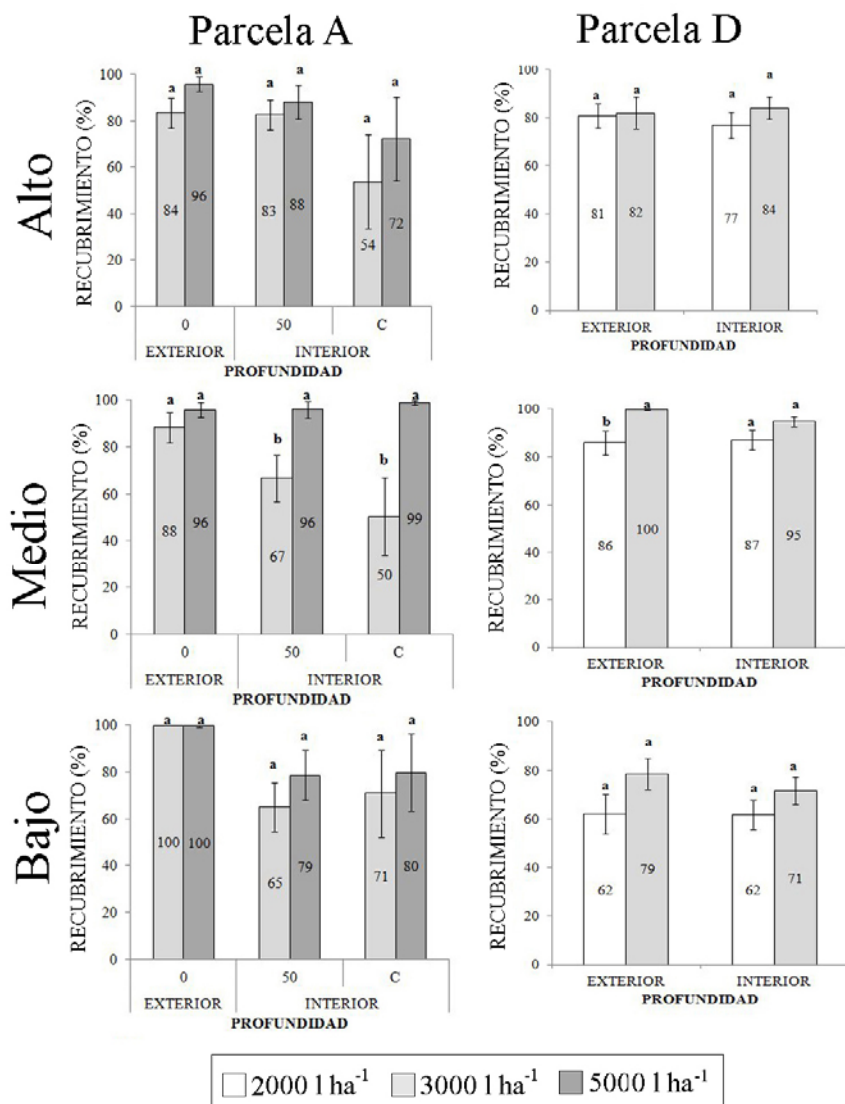


Figura V-10. Recubrimiento (%) a cada altura y profundidad (media  $\pm$  EE) en las parcelas A y D. Medias dentro de cada combinación altura x profundidad con letras diferentes son significativamente diferentes (test LSD,  $P < 0.05$ ).

Tabla V-10. Significación del volumen de aplicación sobre el recubrimiento para cada altura y profundidad en cada parcela

Parcela	Altura	Profundidad	F	g.l.	P	
A	Alto	0	2.28	1, 30	0.1420	
		50	0.32	1, 30	0.5732	
		C	0.45	1, 10	0.5201	
	Medio	0	0.88	1, 29	0.3562	
		50	6.34	1, 31	0.0174*	
		C	7.00	1, 10	0.0267*	
	Bajo	0	1.29	1, 29	0.2664	
		50	0.75	1, 29	0.3934	
		C	0.12	1, 10	0.7344	
	D	Alto	Exterior	0.02	1, 52	0.8911
			Interior	0.96	1, 67	0.3296
		Medio	Exterior	7.62	1, 53	0.0079*
Interior			2.76	1, 70	0.1010	
Bajo		Exterior	2.68	1, 52	0.1080	
		Interior	1.46	1, 70	0.2306	

### 2.3.2 Eficacia biológica de los tratamientos

#### 2.3.2.1 Eficacia de los tratamientos con aceites minerales respecto a los tratamientos Control y Estándar

El índice de infestación (media  $\pm$  EE) del Control en la parcela A fue de 58.86 $\pm$ 7.16% en la campaña 2006 y de 24.00 $\pm$ 3.62 % en la campaña 2007 y en la parcela D fue de 73.57 $\pm$ 4.47% en la campaña 2007 y de 71.07 $\pm$ 4.89% en la campaña 2008.

En la parcela A los tratamientos Estándar disminuyeron significativamente el índice de infestación respecto al Control en las dos campañas, alcanzando los valores medios de II más bajos (Tabla V-11). En los tratamientos con Aceite A, en la campaña de 2006 los dos volúmenes ensayados disminuyeron significativamente el índice de infestación frente al del Control. En la campaña de 2007 sólo se diferenció significativamente del Control el tratamiento aplicado a 5000 l/ha. Por otro lado se observa que en las dos campañas los tratamientos con Aceite A se diferenciaron significativamente de los tratamientos Estándar.

Tabla V-11. Índice de Infestación (%) de cada tratamiento en la parcela A (media ± EE). Significación de las diferencias de II de las aplicaciones de Aceite A y Estándar con el Control y de las aplicaciones de Aceite A con las Estándar (test de Dunnett). Significación del volumen de aplicación para cada tratamiento en cada campaña (ANOVA & test LSD)

Volumen de aplicación (l/ha)	Índice de Infestación (%) <sup>1</sup>			
	2006		2007	
	Aceite A	Estándar	Aceite A	Estándar
3000	35.14±4.35*,** a	18.86±2.54* a	15.28±3.00** a	8.57±2.15* a
5000	34.71±5.18*,** a	10.14±2.37* b	12.43±1.16*,** a	5.14±1.42* a
F	0.00	6.28	0.79	1.77
g.l.	1, 9	1, 9	1, 9	1, 9
P	0.9510	0.0366	0.4008	0.2204

\*Existen diferencias significativas con el Control (test de Dunnett, P<0.05)

\*\* Existen diferencias significativas con los tratamientos Estándar (test de Dunnett, P<0.05)

<sup>1</sup>Medias dentro de cada columna seguidas por letras diferentes son significativamente diferentes (test LSD, P < 0.05)

En la parcela D, los tratamientos a 3000 l/ha, tanto con el Aceite A como con el Aceite B, se diferenciaron significativamente del Control en las campañas 2007 y 2008. Sin embargo, los tratamientos a 2000 l/ha sólo se diferenciaron significativamente cuando se aplicó Aceite A en la campaña 2007 (Tabla V-12).

Tabla V-12. Índice de Infestación (%) de cada tratamiento en la parcela D en cada campaña (media±EE). Significación de las diferencias de II de las aplicaciones de Aceite A y Aceite B con el Control (test de Dunnett). Significación del volumen de aplicación para cada aceite en cada campaña (ANOVA & test LSD)

Volumen de aplicación (l/ha)	Índice de Infestación (%) <sup>1</sup>			
	2007		2008	
	Aceite A	Aceite B	Aceite A	Aceite B
2000	33.39±6.54* a	49.82±7.71 a	48.21±7.62 a	51.96±8.43 a
3000	38.57±6.98* a	39.46±8.23* a	38.75±9.05* a	31.61±9.54* a
F	0.29	0.84	0.64	2.55
g.l.	1, 7	1, 7	1, 7	1, 7
P	0.6078	0.3940	0.4541	0.1611

\* Existen diferencias significativas con el Control (test de Dunnett, P<0.05)

<sup>1</sup>Medias dentro de cada columna seguidas por letras diferentes son significativamente diferentes (test LSD, P < 0.05)

### 2.3.2.2 Efecto del Volumen de Aplicación en la eficacia de control de CRS

En la parcela A, a pesar de que el II es más bajo en los tratamientos realizados a 5000 l/ha que a 3000 l/ha, no se han observado diferencias significativas de II entre

los dos volúmenes en ninguno de los escenarios ensayados y en ninguno de los tratamientos, excepto en los tratamientos Estándar en la parcela A en la campaña 2006, donde el tratamiento a 5000 l/ha alcanzó una infestación significativamente inferior al aplicado a 3000 l/ha (Figura V-11, Tabla V-11).

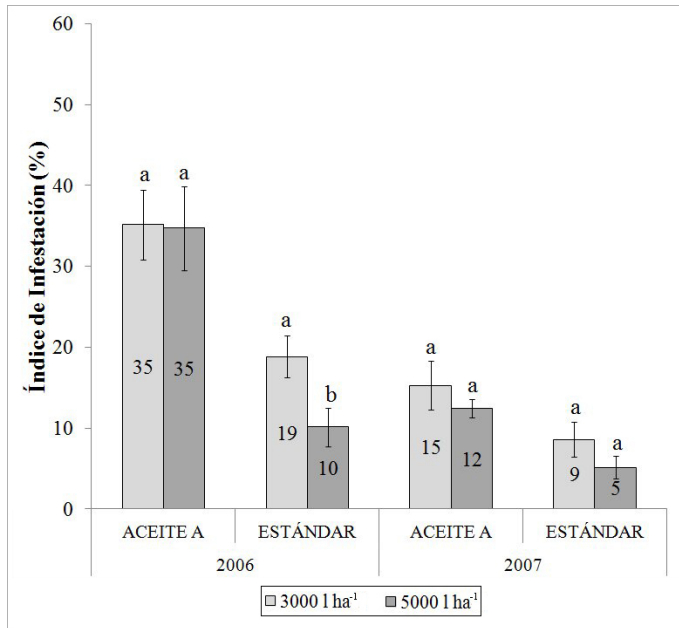


Figura V-11. Índice de infestación (%) de los tratamientos antes de la cosecha (media  $\pm$  EE) en la parcela A. Medias de cada combinación campaña  $\times$  tratamiento con una letra diferente son significativamente diferentes (test LSD,  $P < 0.05$ ).

En la parcela D se observa que, a pesar de no existir diferencias significativas entre los II de los dos volúmenes ensayados en ninguno de los tratamientos, en general el aumento de volumen produce una disminución del II medio (Figura V-12, Tabla V-12).

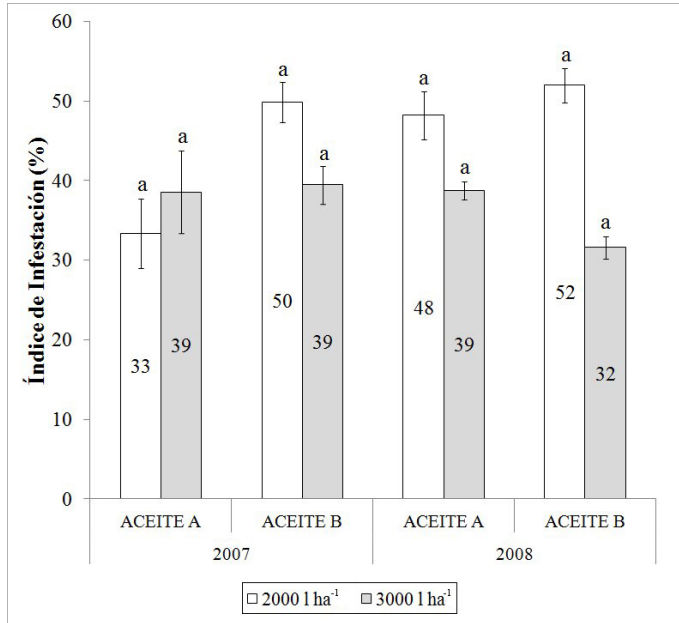


Figura V-12. Índice de infestación (%) de los tratamientos antes de la cosecha (media  $\pm$  EE) en la parcela D. Medias de cada combinación campaña  $\times$  tratamiento con una letra diferente son significativamente diferentes (test LSD,  $P < 0.05$ ).

Al evaluar los factores que influyeron en conjunto en las diferencias de infestación observadas entre tratamientos y parcelas se determinó que existía una relación significativa ( $P_{\text{MODELO}} < 0.0001$ ;  $R^2$  ajustado = 0.608; Número de datos = 72) entre el II de los tratamientos y el II del Control y el volumen de caldo por unidad de volumen de vegetación ( $\text{l/m}^3$ ) (Tabla V-13). Además se obtuvo que el recubrimiento ponderado y el volumen de aplicación por unidad de superficie tratada,  $\text{l/ha}$ , no fue significativo ( $P_{\text{WC}} = 0.3850$ ;  $P_{\text{Volumen\_l/ha}} = 0.8435$ ). La relación con  $\text{II}_{\text{CONTROL}}$  es de forma que cuanto mayor fue el nivel de infestación del Control en una parcela, mayor infestación se alcanzó en esa parcela. En cambio, el aumento de volumen aplicado por unidad de volumen de vegetación implicó disminución de la infestación. Destaca que la relación de la infestación del Control y la infestación de los tratamientos Estándar resultó ser menos fuerte que para los aceites minerales.

Tabla V-13. Coeficientes de regresión del RLM para II (%) como función de  $II_{CONTROL}$  (%), Recubrimiento Ponderado (WC, %) y los tratamientos ( $R^2 = 0.624$ )

Parámetro	Estimación	Error Estándar	P
Constante	12.358	6.798	0.0735
Volumen (l/m <sup>3</sup> )	-19.108	8.898	0.0353
$II_{CONTROL}$	0.591	0.070	<0.0001
$(II_{CONTROL}) * I_{STAND}^1$	-0.346	0.067	<0.0001

<sup>1</sup> $I_{STAND} = 1$  para los datos obtenidos con los tratamientos Estándar y 0 en el resto de casos

### 2.3.3 Propuesta de un parámetro de evaluación de la calidad de los tratamientos con aceites minerales

#### 2.3.3.1 Cálculo de la Eficiencia teórica de deposición: TE

En la Figura V-13 se observa que en la parcela A los tratamientos a 3000 l/ha obtuvieron menores valores de TE conforme aumentaba la profundidad en el árbol para todas las alturas. En la zona centro, a media altura, TE obtuvo el valor más bajo, de 33, es decir, que únicamente el 33% de esta zona alcanzó la deposición mínima para conseguir la máxima eficacia. En la parte alta y baja del centro del árbol los valores fueron de 50 y 67% respectivamente, muy similares a los alcanzados en la profundidad de 50 (entre 56-72%), mientras que en la parte exterior se alcanzaron valores de 92-100%. Estas diferencias de TE respecto a la profundidad de la copa desaparecieron al aumentar el volumen de caldo a 5000 l/ha. Con este volumen se alcanzaron valores altos de TE, entre 75-100% en todas las profundidades y alturas.

En la parcela D, al evaluar los depósitos conseguidos con Aceite A, la zona Baja de la copa presentó menor TE que el resto de alturas con los dos volúmenes ensayados, de forma que el aumento de volumen consiguió que un 60% del exterior de la zona Baja alcanzara el depósito mínimo, mientras que en la parte Alta de la copa este porcentaje ya se alcanzó con el menor volumen, aumentando hasta valores por encima del 70% con el volumen más alto, y la altura Media, que presentó el mayor TE con los dos volúmenes, ya que más del 70% de la zona alcanzó la deposición

mínima para conseguir la máxima eficacia al aplicar 2000 l/ha, mientras que prácticamente el 100% la alcanzó al aumentar el volumen a 3000 l/ha.

Al evaluar los depósitos de Aceite B en la parcela D, las diferencias entre alturas y profundidades para los volúmenes ensayados siguen las mismas tendencias que con el Aceite A, pero en todo caso alcanzando mayores valores de TE, debido a las diferencias en el patrón de deposición de ambos aceites.

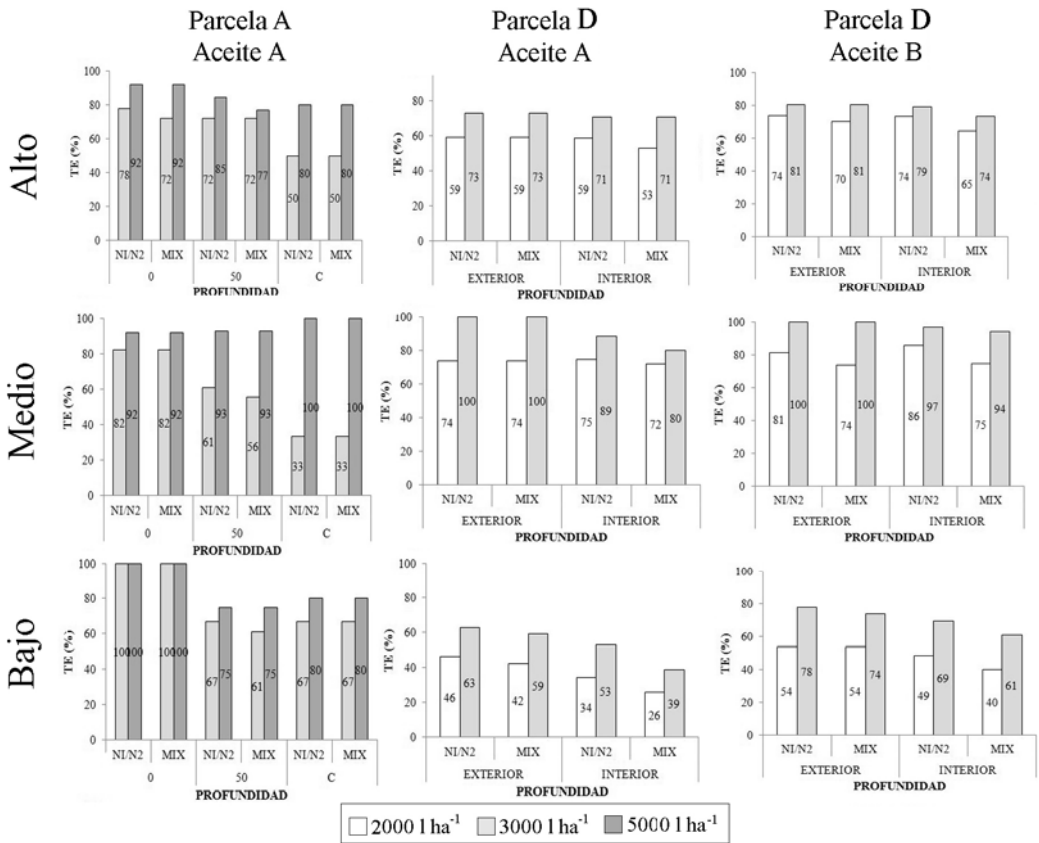


Figura V-13. TE (%) de los tratamientos contra la primera generación de CRS (predominio de estadios NI&N2, TE<sub>1</sub>) y la segunda generación (coexistencia de una mezcla de estadios, TE<sub>2</sub>) para cada altura y profundidad en las parcelas A y D.

La WTE en los tratamientos con aceites aumentó en todos los casos al aumentar el volumen (Tabla V-14). El aumento fue de aproximadamente un 30% en

la parcela A en los tratamientos de primera y segunda generación. Y en la parcela D el aumento estuvo entre el 20 y el 30%. Con ambos aceites se alcanzaron valores de alrededor del 60-70% con el volumen más bajo aplicado en cada parcela y de alrededor del 80-90% con el volumen más alto. La similitud de valores de WTE entre ambas parcelas indica que la densidad foliar estimada en la parcela D debe estar muy cercana a la real, y que el ajuste de volumen realizado consigue similares depósitos en ambas parcelas.

A diferencia de lo ocurrido con los organofosforados, las diferencias entre  $WTE_1$  y  $WTE_2$  no son muy grandes, debido a que las necesidades de deposición en cada uno de los tratamientos no son muy diferentes entre sí.

*Tabla V-14. WTE (%) de los tratamientos contra la primera generación de CRS (predominio de estadios N1&N2,  $WTE_1$ ) y la segunda generación (coexistencia de una mezcla de estadios,  $WTE_2$ ) en las parcelas A y D.*

Volumen de aplicación (l/ha)	Parcela A		Parcela D			
	Aceite A		Aceite A		Aceite B	
	N1/N2	MIX	N1/N2	MIX	N1/N2	MIX
2000	-	-	61.99	59.04	72.98	65.76
3000	67.86	65.02	79.85	75.71	87.75	84.33
5000	87.32	85.85	-	-	-	-

### 2.3.3.2 Evaluación de la relación entre la Eficiencia Teórica de deposición y la eficacia biológica en campo

Se determinó que no existía una relación significativa entre el II de los tratamientos ni con la eficiencia ponderada en el tratamiento de primera generación,  $WTE_1$  ( $P= 0.3131$ ), ni con la eficiencia ponderada en el tratamiento de segunda generación,  $WTE_2$  ( $P= 0.2120$ ).

## 2.4 Discusión y conclusiones

El aumento de volumen de aplicación implicó un aumento del recubrimiento y una distribución más homogénea en la copa, aunque el volumen sólo afectó significativamente al mojado en la altura Media, siendo además la zona de la copa que mayor recubrimiento presentó en ambas parcelas, alcanzando niveles de



saturación con los volúmenes más altos. Las zonas que menores niveles de recubrimiento alcanzaron en todos los casos son aquellas más difíciles de alcanzar para el aplicador, lo que puede deberse principalmente al tamaño de la copa. Destaca que en cuanto al recubrimiento ponderado, en ambas parcelas se alcanzaron niveles similares y elevados a pesar de haber aplicado volúmenes muy diferentes, lo que se debe al hecho de haber ajustado los volúmenes de aplicación teniendo en cuenta el volumen de la copa.

Al igual que otros autores que también han aplicado aceites minerales sobre cochinillas, a pesar de las diferencias de recubrimiento, no se han encontrado diferencias significativas en la eficacia de control de CRS entre los volúmenes de aplicación ensayados (Liang et al., 2002; Chueca et al., 2009). En cambio, en este mismo trabajo, Liang et al. (2002) sí que encontraron diferencias significativas entre volúmenes de aplicación en el control de otra cochinilla, *Unaspis citri* Comstock (Hemiptera: Diaspididae), demostrando las diferencias de respuesta entre plagas y las diferentes necesidades de depósito. Otros autores también encontraron relación entre el volumen aplicado y la eficacia biológica contra cochinillas en tratamientos con aceites minerales (Beattie et al., 1991, 2002; Grout et al., 1992; Grout y Stephen, 1993). Sin embargo, en estos trabajos para variar el volumen de aplicación se cambiaron parámetros que también pueden afectar la eficacia, como el equipo de aplicación, la presión de trabajo, la distribución de boquillas en el arco del pulverizador y la velocidad de avance, por lo que puede existir una confusión de efectos que impide relacionar las diferencias de eficacia únicamente con el volumen de aplicación. La falta de significación de las diferencias de volumen sobre la eficacia indican que, dado que el menor volumen aplicado se calculó en base a los depósitos mínimos necesarios, ajustándolo a las características de la vegetación objetivo, el aumento de depósito generado con el aumento de volumen no aumenta la eficacia del tratamiento.

Es importante destacar el hecho de que se ha encontrado una relación positiva entre el Índice de Infestación y el volumen aplicado por unidad de volumen de vegetación y no con el volumen de aplicación por unidad de superficie, por lo que las recomendaciones de productos fitosanitarios para tratamientos arbóreos deberían modificarse en este sentido. Asimismo, y como ya se comprobó en los ensayos con organofosforados, el Índice de Infestación de los árboles Control también está altamente relacionado con la eficacia biológica de los tratamientos.

El parámetro de Eficiencia Teórica Ponderada para evaluar la bondad de los tratamientos no ha resultado estar significativamente relacionado con el II final de los tratamientos. Esto podría deberse a que los valores son muy similares entre ambas parcelas, y dado que en ningún caso las diferencias de volumen han afectado significativamente la eficacia de los tratamientos, esto lleva a que las diferencias de WTE entre volúmenes tampoco afectan significativamente. Esto indica que en el caso de los aceites minerales, alcanzar por encima del 60-70% de la copa con el depósito mínimo no aumenta significativamente la eficacia.

## **CAPITULO VI DISCUSIÓN GENERAL**

---



A la hora de diseñar la aplicación de un tratamiento para el control de un insecto, uno de los parámetros más importantes a decidir es el volumen de aplicación, ya que en España la concentración viene fijada en las condiciones de aplicación de los productos. Con el fin de evitar emisiones innecesarias al ambiente, disminuir la influencia sobre los enemigos naturales y ahorrar costes, es importante determinar el volumen mínimo necesario que proporcione un control adecuado de la plaga.

Además, en el diseño del tratamiento hay que tener en cuenta qué producto se va a emplear, ya que, como se ha demostrado en esta tesis, el volumen mínimo necesario depende del producto. Esta tesis ha permitido demostrar que esto se debe a que el patrón de deposición del caldo pulverizado está enormemente influido por el producto fitosanitario que se emplee y, por otro lado, a que las curvas respuesta de eficacia son diferentes.

Se han encontrado diferencias significativas en los patrones de deposición de los cuatro productos ensayados. En el caso de los insecticidas organofosforados, las diferencias en el patrón de deposición podrían atribuirse a la influencia de la formulación y al modo de presentación de los productos: CMBP, que es un concentrado emulsionable, genera mayor recubrimiento y mayores impactos que CBP, que es un granulado dispersable en agua, que a su vez produce una distribución de impactos similar a la obtenida con el agua. En el caso de los aceites minerales las diferencias en el patrón de deposición se podrían atribuir a los diferentes coadyuvantes incluidos en el producto, puesto que el modo de presentación es el mismo (ambos son concentrados emulsionables con similar contenido en aceite e igual residuo insulfonable). Dado que se ha cuantificado la curva respuesta de parámetros de pulverización para cada producto, concretamente del recubrimiento, el tamaño de los impactos y el número de impactos por unidad de superficie frente al volumen depositado, se pueden relacionar estos parámetros fácilmente y hablar de uno u otro indistintamente.

En cuanto a la eficacia de los distintos productos, una aportación relevante de esta tesis es la obtención de las curvas respuesta de eficacia sobre los distintos estadios del piojo rojo de California en función del volumen de caldo depositado por unidad de superficie para cada producto. Estas relaciones ponen de manifiesto diferencias de comportamiento entre los tipos de productos y entre cada uno de los productos ensayados. De hecho, en general se observa que los dos insecticidas organofosforados producen una respuesta en la plaga prácticamente independiente de la cantidad de caldo depositado, mientras que en el caso de los aceites minerales existe una fuerte relación dosis-respuesta.

Las pulverizaciones con los dos insecticidas organofosforados sobre los estadios jóvenes (N1 y N2), alcanzan una eficacia de alrededor del 90% con todas las dosis evaluadas. Sin embargo, en las fases de desarrollo posteriores se encuentran grandes diferencias entre los dos productos. Para CBP el aumento de dosis produce un efecto muy débil sobre el aumento de la eficacia, mientras que con el CMBP, aunque el aumento de eficacia sobre los individuos machos es muy pequeño, es muy elevado sobre las hembras adultas (de una eficacia de control de alrededor del 10% con la menor dosis, se alcanza el 70% con la dosis máxima). Es importante mencionar que con ninguno de los dos productos se superó el 70% de eficacia contra las hembras, seguramente porque son las que mayor protección presentan gracias al desarrollo completo del escudo dorsal y a la presencia del escudo ventral.

En el caso de los aceites minerales la eficacia depende del volumen y se ha obtenido un modelo de regresión que los relaciona. Además, se ha demostrado que esta relación es diferente según el aceite y el estadio considerados.

Las relaciones establecidas de recubrimiento-dosis y eficacia-dosis han permitido relacionar la eficacia con el recubrimiento. Esta relación es muy importante ya que puede servir para determinar de manera sencilla y con base científica la calidad de un tratamiento realizado en campo. El recubrimiento es un parámetro que se utiliza ampliamente para medir la calidad de un tratamiento, sin embargo es

importante saber qué nivel de recubrimiento en hoja es el adecuado para controlar la plaga. Con esta tesis se puede responder a esta pregunta de manera objetiva y cuantificada, definiendo no sólo el nivel de recubrimiento mínimo, sino también la cantidad de caldo por unidad de superficie foliar que se debe alcanzar para conseguir la máxima eficacia posible. Para obtener una eficacia de alrededor del 90% en los tratamientos contra la primera generación de la plaga, en la que predominan los estadios jóvenes, es necesario alcanzar un recubrimiento en las hojas del 11% cuando se aplica CBP y del 22% cuando se aplica CMBP (equivalen en ambos casos a un volumen depositado de  $1.01 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ), 50% cuando se aplica Aceite A ( $4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) y 40% cuando se aplica Aceite B ( $3.41 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ). En el caso de los tratamientos aplicados contra las generaciones siguientes, en las que hay heterogeneidad de estadios, los recubrimientos óptimos son del 40% cuando se aplica CBP (depósitos mínimos necesarios de  $3.41 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ), 60% cuando se aplica CMBP, 50% cuando se aplica Aceite A y 45% cuando se aplica Aceite B (depósitos mínimos necesarios de  $4.72 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  en todos los casos).

Una vez conocida cual es la deposición óptima que se debe conseguir sobre la superficie del cultivo, en esta tesis se responde a la cuestión de cuál es el volumen de caldo que se debe emplear para lograr esas deposiciones. En la actualidad se aplican volúmenes de caldo basados en afirmaciones empíricas, que sobreestiman las necesidades reales con el fin de asegurar el resultado, por tanto, también se plantea la duda de si el volumen de caldo que se emplea actualmente en los tratamientos fitosanitarios en cítricos contra esta plaga es adecuado. A partir de los modelos de control definidos se puede realizar una estimación del volumen a emplear, teniendo en cuenta el volumen de copa y la densidad de superficie foliar de la vegetación a la que se dirige el tratamiento.

Siguiendo este razonamiento, se puede comprobar que los volúmenes habitualmente aplicados en los tratamientos contra piojo rojo de California superan en mucho los volúmenes calculados a partir de las deposiciones mínimas necesarias,

tanto en primera como en segunda generación. Esto plantea la posibilidad de reducir el volumen de caldo, y por tanto, la cantidad de producto fitosanitario y evaluar si esto afecta a la eficacia del tratamiento. Asimismo, se plantea si es necesario alcanzar en todas las zonas del árbol los depósitos mínimos establecidos y si sería posible evaluar la calidad de un tratamiento efectuado y predecir la eficacia que con él se va a conseguir.

Se ha demostrado que los cambios de volumen de aplicación no afectaron significativamente a la distribución de la pulverización en las copas de los árboles, ya que, a pesar de producir medias de recubrimiento diferentes, la variabilidad en los datos eliminó la significación de esas diferencias. De igual forma, también se observó que esos cambios de volumen no afectaron significativamente a la eficacia biológica, aún a pesar de producir medias de eficacia diferentes, y que de nuevo la variabilidad en los datos eliminó la significación de esas diferencias.

Al evaluar conjuntamente los datos de todas las parcelas, se ha demostrado que la infestación observada al final de la temporada depende del nivel alcanzado en el control no tratado, lo que indica que la eficacia de cualquier tratamiento realizado dependerá de la presión de piojo rojo de California en la finca. La infestación final de los árboles tratados también ha resultado estar relacionada con el volumen aplicado por unidad de volumen de vegetación. Paralelamente, la metodología desarrollada en esta tesis para determinar la calidad del tratamiento basada en el cálculo de WTE (Eficiencia Teórica de deposición Ponderada) ha permitido comprobar que los cambios de volumen de aplicación provocaron cambios en el porcentaje de copa que recibió el depósito mínimo mencionado y que esto está relacionado con la eficacia final conseguida.

Esto podría explicar la variabilidad de datos en cuanto a eficacia y recubrimiento dentro de cada parcela, ya que indicaría que las diferencias individuales entre árboles en una parcela en cuanto a poda, densidad foliar, tamaño de la copa y ubicación dentro de la parcela genera diferentes niveles de recubrimiento,



diferentes niveles de WTE, y distintos niveles de presión de plaga a combatir, lo que implica diferencias de eficacia entre árboles. Sin embargo, como se ha demostrado en esta tesis, las diferencias dentro de cada parcela no resultan significativas sobre el resultado de los tratamientos. Esto indica que se podría reducir el volumen respecto a los volúmenes actualmente empleados.

En ningún caso los tratamientos consiguieron alcanzar todas las zonas del árbol con el depósito mínimo definido, especialmente los tratamientos basados en el modelo, pero como se ha demostrado esto no resulta necesario. Las zonas donde se han alcanzado en todos los casos los menores porcentajes de hojas con este depósito están en la parte interior de la copa, indicando que para conseguir un resultado satisfactorio de control de CRS no es estrictamente necesario llegar hasta esta zona con este nivel de deposición.

Todo ello abunda en el hecho de que no se puede recomendar volúmenes de aplicación por unidad de superficie cultivada, sino que el volumen aplicado debe adecuarse a la vegetación objetivo: volumen de vegetación y densidad foliar. Por ello sería necesario que esta información apareciera en las etiquetas de los productos, en el apartado referente a las recomendaciones del volumen a emplear en las aplicaciones.

A diferencia de las recomendaciones basadas en TRV, que consideran las filas de vegetación como un seto continuo de forma cúbica, el volumen de vegetación calculado en esta tesis tiene en cuenta la geometría elipsoidal de las copas de los cítricos, y también el hecho de que habitualmente existen huecos entre árboles de una misma fila, lo que conduce a que a menudo las filas no se pueden considerar como setos paralelepípedicos continuos. De esta forma, el volumen de vegetación por unidad de superficie cultivada que hemos considerado es menor que el que se obtendría aplicando la fórmula para el cálculo del TRV. En este sentido, la aproximación propuesta por Gil E. et al. (2007) y Llorens et al. (2010) para viña, en la que se estima el volumen de fila de viña (Vine Row Volume, VRV) a partir de

medidas de la anchura en tres alturas distintas, parece más aplicable al caso de los cítricos, aunque este método tampoco tiene en cuenta los huecos.

En esta tesis se ha propuesto y validado la Eficiencia Teórica de deposición como un parámetro para evaluar la calidad de un tratamiento con insecticidas organofosforados basándonos en el recubrimiento conseguido, ya que ha resultado estar relacionado con la eficacia de los tratamientos tanto en el caso de los insecticidas organofosforados como en el caso de los aceites minerales. Esto indica que podría emplearse en un futuro modelo que permitiese predecir la eficacia de control del piojo rojo de California de un determinado tratamiento conociendo la deposición generada en la copa y la respuesta de la plaga a ese nivel de deposición. Sin embargo, en el caso de los aceites minerales solamente se ha podido establecer un mínimo para este parámetro, que estaría alrededor del 65%.

## **CAPITULO VII CONCLUSIONES**

---



This thesis provides scientific evidence to support the conclusion that it is not necessary to achieve full coverage of the canopy to achieve adequate control of California red scale. This is true both for organophosphate insecticides and mineral oils, although they behave differently, because the proposed reduced spray application volume did not significantly decrease efficacy with respect to traditional treatments until run-off. This indicates that it is possible to reduce the application volume if treatments are applied at the right developmental stage of the pest, thereby reducing the emission of pesticides to the environment, whenever the minimum deposit and coverage found in this thesis are achieved, and no pesticide resistance phenomena appear.

These minimum deposit and coverage have been established in this thesis thanks to developed models that relate deposition and efficacy. It has been demonstrated that these relationships depend on the product and on the predominant developmental stage at the moment of application, since it has been shown that each stage has different sensitivity to each product. This paper also highlights the importance of studying how each specific product actuates and how it is deposited, in order to obtain a model of deposition and biological efficacy on the plant surface.

Furthermore, this thesis shows the importance of including the volume of the canopy and the required minimum deposit per unit area in the recommendations of spray application volumes. Moreover, a new method to assess the quality of a treatment against California red scale has been developed, because the efficacy can be estimated from the deposition reached in the canopy by means of the deposition-against-efficacy models but it cannot be forgotten that the population pressure of the pest significantly affects the results of the treatments.



## **CAPITULO VIII TRABAJOS FUTUROS**

---





En esta tesis se ha demostrado que la eficacia de un tratamiento depende del volumen de caldo aplicado por unidad de volumen de vegetación. Para poder establecer recomendaciones basadas en el volumen de vegetación, partiendo de los datos de deposición mínima necesaria establecidos en esta tesis, es necesario conocer la densidad foliar de los árboles objeto de tratamiento ( $\text{m}^2$  de hoja/ $\text{m}^3$  de vegetación), y así poder traducir el depósito de caldo expresado por unidad de superficie en volumen de caldo por unidad de volumen de vegetación. Para ello se propone realizar un estudio por variedad, edad, nivel de poda, etc, convirtiendo las diferentes variables a escalas o categorías agrupadas según la densidad foliar determinada, y con este dato y en función del producto a aplicar, definir un volumen a aplicar por unidad de volumen de vegetación. A continuación sería interesante estudiar qué parámetros geométricos del árbol, que puedan medirse de manera sencilla (altura, diámetro, etc), están más relacionados con el volumen de vegetación, para poder estimar este parámetro en el campo de manera rápida y por personal no cualificado.

A partir del volumen de caldo por unidad de volumen de vegetación recomendado en el paso anterior, se podría determinar el volumen de caldo a aplicar a cada árbol y calcular el volumen total de aplicación por hectárea considerando el marco de plantación. Incluso sería posible realizar una dosificación precisa utilizando la información del volumen aparente de la vegetación que proporcionan las máquinas equipadas con sensores electrónicos de vegetación y actuadores proporcionales (Li et al, 2001; Moltó et al., 2001; Tumbo et al., 2002; Wei y Salyani, 2004; Zaman y Salyani, 2004; Wei y Salyani, 2005; Zaman y Schumann, 2005; Zaman et al., 2005; Rosell et al., 2009).

Es importante avanzar en la generación de modelos que permitan predecir el nivel de control de la plaga en base a la deposición conseguida, conociendo cómo responde la plaga a ese nivel de deposición, es decir, evaluar la calidad de un tratamiento aplicado en campo estimando la eficacia que se va a conseguir. Para ello hay que profundizar en el estudio del parámetro de la Eficiencia de deposición teórica

y quizás establecer una WTE óptima para alcanzar un determinado nivel de control. Para ello sería necesario realizar aplicaciones de un rango de volúmenes lo suficientemente amplio como para generar diferentes niveles de deposición y de eficacia y aumentar la potencia predictiva de este parámetro.

También es de gran interés utilizar la metodología desarrollada en otros productos que también se emplean en el control del piojo rojo de California. Así, se podrían estudiar productos que tienen otros modos de actuación como el piriproxifen, producto de contacto que actúa como regulador del crecimiento, o el spirotetramat, producto sistémico que actúa sobre la formación de lípidos del insecto, recientemente registrado para el control de CRS en España (27/07/2012), y que se considera respetuoso con los enemigos naturales (Planes et al., 2013; Vanaclocha et al., 2013). También sería interesante estudiar las mezclas de organofosforados con aceites minerales que habitualmente se emplean en muchos países.

El método de trabajo desarrollado también se puede emplear para evaluar los efectos de los fitosanitarios sobre los enemigos naturales.

Por último, dado que se ha demostrado que el método de trabajo desarrollado en esta tesis es un método coherente que permite alcanzar resultados consistentes sería interesante explotarlo, aplicándolo a otros cultivos arbóreos, otros productos y otras plagas o enfermedades. Para ello es necesario realizar una serie de consideraciones previas para adecuar el método a las características del agente patógeno y el cultivo de interés. En primer lugar habría que implementar un bioensayo ajustando el método de aplicación al patógeno (plaga o enfermedad) al que se dirige el tratamiento y el producto que se aplica. En cuanto al patógeno hay que tener en cuenta su movilidad, sustrato y condiciones de crecimiento, estadios de desarrollo, etc. En cuanto al producto hay que considerar su formulación y modo de actuación. También sería necesario encontrar colectores artificiales con características de distribución del caldo similares a las de la vegetación objetivo, y establecer su

relación con los resultados obtenidos sobre papel hidrosensible, ya que éste se emplea en la evaluación de la calidad de los tratamientos en todo tipo de cultivos.



## **CAPITULO IX BIBLIOGRAFÍA**

---



- Abdelrahman, I. 1973. Toxicity of malathion to California red scale, *Aonidiella aurantii* (Mask.) (Hemiptera: Diaspididae). Aust. J. Agric. Res. 24, 111-118.
- Abdelrahman, I. 1974. The effect of extreme temperatures on California red scale, *Aonidiella aurantii* (Mask.) (Hemiptera: Diaspididae), and its natural enemies. Aust. J. Zool. 22, 203-212.
- Agnello, A. 2002. Petroleum-derived spray oils: chemistry, history, refining, and formulation, en: Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. (Eds.), *Spray Oils Beyond 2000*. University of Western Sydney, New South Wales, Australia, 2-18.
- Akesson, N.B., Gibbs, R.E. 1990. Pesticide drop size as a function of spray atomizers and liquid formulations, en: Bode, L.E., Hazen, J.L., Chasin, D.G. (Eds.), *Pesticide Formulations and Application Systems*. 10<sup>th</sup> volume. ASTM STP 1078, American Society for Testing and Materials. Philadelphia, 170-183.
- Akesson, N.B., Steinke, W.E., Yates, W.E. 1994. Spray atomization characteristics as a function of pesticide formulations and atomizer design. J. Environ. Sci. Health Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes 29, 785-814.
- Albrigo, L.G., Timmer, L.W., Townsend, K., Beck, H.W. 1997. Copper fungicides-residues for disease control and potential for spray burn. Proceedings of the 110th Annual Meeting of the Florida State Horticultural Society 110, 67-70.
- Alexandrakis, V. 1983. Données biologiques sur *Aonidiella aurantii* Mask. (Hom. Diaspididae) sur agrumes en Crète. Fruits 38, 831-838.
- Alfaro, F., Cuenca, F.J., Ferrer, C. 1993. Piojo rojo de California. Levante Agrícola 2º Trimestre 1993, 101-108.
- Alfaro, F., Cuenca, F.J., Serra, J.M. 2003a. Ensayos de eficacia de diversos aceites insecticidas contra piojo rojo de California, *Aonidiella aurantii* Maskell, en cítricos. Levante Agrícola 1er Trimestre 2003, 60-65.

- Alfaro, F., Cuenca, F.J., Esquivia, M., 2003b. Problemática actual del piojo rojo de California en la Comunidad Valenciana. *Comunidad Valenciana Agraria* 13, 21-28.
- Armstrong-Cho, C., Chongo, G., Wolf, T., Hogg, T., Johnson, E., Banniza, S. 2008. The effect of spray quality on ascochyta blight control in chickpea. *Crop Prot.* 27, 700-709.
- Asplanato, G. 2000. Estudios poblacionales de la cochinilla roja californiana *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Homoptera: Diaspididae) en cítricos de Uruguay. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. España
- Asplanato, G., García-Marí, F. 2001. Ciclo estacional de la cochinilla roja californiana, *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Homoptera: Diaspididae) en naranjos del sur de Uruguay. *Agrociencia* V, 54-67.
- Avidov, Z., Harpaz, I. 1969. *Plant pests of Israel*. Israel University Press. Jerusalem, 549 pp.
- Baker, E.A., Procopiou, J., Hunt, G.M. 1975. The cuticles of citrus species. Composition of leaf and fruit waxes. *J. Sci. Food Agric.* 26, 1093-1101.
- Battaglia, D., Viggiani, G. 1982. Osservazioni sulla distribuzione e sulla fenologia dell'*Aonidiella aurantii* (Mask.) (Homoptera: Diaspididae) e dei suoi nemici naturali in Campania. *Annali della Facoltà de Scienze Agrari della Università degli studi di Napoli, Portici.* 16, 125-132.
- Beardsley, J.W., González R.H. 1975. The biology and ecology of armored scales. *Annu. Rev. Entomol.* 20, 49-73.
- Beattie, G.A.C., Roberts, E.A., Rippon, L.E., Vanhoff, C.L. 1989. Phytotoxicity of petroleum spray oils to Valencia orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, in New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 29, 273-282.



- Beattie, G.A.C., Clift, A.D., Allender, W.J., Jiang L., Wang, Y.A. 1991. Efficacies of low- to high-volume (960-10700 litres ha<sup>-1</sup>) citrus sprayers for applying petroleum spray oil to control Chinese wax scale. *Pestic. Sci.* 32, 47-56.
- Beattie, G.A.C., Clift, A.D., Parkes, R.A., Jiang, L. 2002. Impacts of spray volume and horticultural mineral oil concentration on control of pink wax scale and red scale in citrus orchards, en: Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. (Eds.), *Spray Oils Beyond 2000*. University of Western Sydney, New South Wales, Australia, 582-591.
- Beattie, G.A.C., Hardy, S. 2005. Using petroleum-based spray oils in citrus. Agfact H2.AE.5. Rydalmere, NSW Department of Primary Industries, Australia.
- Bedford, E.C.G. 1998a. Pesticides. Compatibility of pesticides and fungicides with IPM, en: Bedford, E.C.G., Van Den Berg, M. A., De Villiers, E.A. (Eds.), *Citrus pest in the Republic of South Africa*. Institute for Tropical and Subtropical Crops, Nelspruit, South Africa, 15-21.
- Bedford, E.C.G. 1998b. Red scale, *Aonidiella aurantii* (Maskell), en: Bedford, E.C.G., Van Den Berg, M. A., De Villiers, E.A. (Eds.), *Citrus pest in the Republic of South Africa*. Institute for Tropical and Subtropical Crops, Nelspruit, South Africa, 132-144.
- Bénassy, C., Bianchi, H. 1974. Observations sur *Aonidiella aurantii* Mask. (Homoptera: Diaspididae) et son parasite indigène *Comperiella bifasciata* How. (Hymenoptera: Encyrtidae). *Bulletin IOBC/ WPRS* 3, 39-50.
- Benfatto, D., Lo Giudice, V., Conti, F., Tumminelli R. 2002. Spray oil evolution in Italian citrus groves, en: Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. (Eds.), *Spray Oils Beyond 2000*. University of Western Sydney, New South Wales, Australia, 419-426.

- Biddinger, D.J., Hull, L.A. 1995. Effects of several types of insecticides on the mite predator, *Stethorus punctum* (Coleopter: Coccinellidae), including insect growth-regulators and abamectin. J. Econ. Entomol. 88, 358-366
- Bodenheimer, F.S. 1951. Citrus Entomology in the Middle East, with special references to Egypt, Iran, Irak, Palestine, Syria, and Turkey. Ed. Dr. W. Junk. The Hague, The Netherlands, 663 pp.
- BOE (Boletín Oficial del Estado) 2004. Ministerio de Agricultura. 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. 137 (7 de junio) pp: 20684-20747.
- BOE (Boletín Oficial del Estado) 2012. Ministerio de la Presidencia. 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. 223 (15 de septiembre) pp: 65127-65171.
- Bouse, L.F., Carlton, J.B., Jank, P.C. 1986. Use of polymers for control of spray droplet size. ASAE Paper N° AA-86-005, St. Joseph, MI 49085.
- Bouse, L.F., Carlton, J.B., Jank, P.C. 1988. Effect of water soluble polymers on spray droplet size. T. ASAE 31, 1633-1641&1648.
- Bouse, L.F., Kirk, I.W., Bode, L.E. 1990. Effect of spray mixture on droplet size. T. ASAE 33, 783-788.
- Burger, H.C., Ulenberg, S.A. 1990. Quarantine problems and procedures, en: Rosen, D. (ed) Armoured scale insects, their biology, natural enemies and control. Vol. 4B. World Crop Pests. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 313-326.
- Busvine, J.R. 1971. A Critical Review of the Techniques for Testing Insecticides. 2nd. Ed. Commonwealth Agricultural Bureaux. England.

- Butler-Ellis, M.C., Tuck, C.R., Miller, P.C.H. 1997. The effect of some adjuvants on sprays produced by agricultural flat fan nozzles. *Crop Prot.* 16, 41-50.
- Butler- Ellis, M.C., Tuck, C.R. 1999. How adjuvants influence spray formation with different hydraulic nozzles. *Crop Prot.* 18, 101-109.
- Butler-Ellis, M.C., Tuck, C.R., Miller, P.C.H. 2001. How surface tension of surfactant solutions influences the characteristics of sprays produced by hydraulic nozzles used for pesticides application. *Colloid. Surface. A* 180, 267-276.
- Byers, R.E., Lyons, Jr. C.G., Yoder, K.S., Horsburgh, R.L., Barden, J.A., Donohue, S.J. 1984. Effect of apple size and canopy density on spray chemical deposit. *HortScience* 19, 93-94.
- CAB Intnal. (Commonwealth Agricultural Bureaux International) 1996. Distribution Maps of Pests. Series A: map nº2 (2nd revision) December 1996. CAB International Publishing.
- Campos, J.M., Martínez, M.T., Fibla, J.M. 2012. Population dynamics and seasonal trend of California red scale (*Aonidiella aurantii* Maskell) in citrus in Northern Spain. *Span. J. Agric. Res.* 10, 198-208.
- CAPA (Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalitat Valenciana) 1998. Cítricos. Piojo Rojo de California. Boletín de Avisos Núm. 8 de Mayo de 1998.
- Carbonell, J.B., Briozzo, J. 1984. Fenología comparada de poblaciones de Hom: Diaspididae de importancia económica. *Quadraspidotus perniciosus* (Comst.), *Aonidiella aurantii* (Mask.) y *Unaspis citri* (Comst.). *Investigaciones Agronómicas* No 5. 9-14.
- Carman, G.E., Jeppson, L.R. 1974. Low volume applications to citrus trees: method for evaluation of spray droplet distributions. *J. Econ. Entomol.* 67, 397-402.

- Carman, G.E. 1977a. Chemical control of scale insects on California citrus. Proc. Int. Soc. Citriculture 2, 468-474.
- Carman, G.E. 1977b. Evaluation of citrus sprayer units with air towers. Citrograph 62, 134-139.
- Carrero, J.M. 1996. Maquinaria para tratamientos fitosanitarios. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Carroll, D.P., Luck, R.F. 1984. Bionomics of California red scale, *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Homoptera; Diaspididae), on orange fruits, leaves, and wood in California's San Joaquin Valley. Environ. Entomol. 13, 847- 853.
- Childers, C.C. 2002. Practical use of horticultural mineral oils in integrated pest and disease management programs and their impact on natural enemies, en: Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. (Eds.), Spray Oils Beyond 2000. University of Western Sydney, New South Wales, Australia, 332-348.
- Chow, P.N.P. 1993. Adjuvants in spray formulation in relation to foliar application of herbicides, en: Matthews, G.A., Hislop, E.C. (Eds.), Application technology for crop protection. Wallingford, Oxford, UK: CAB International, 291-304.
- Chueca, P., Grafton-Cardwell, E.E., Moltó, E., 2009. Influence of spray equipment and water volume on coverage of citrus and control of citricola scale, *Coccus pseudomagnoliarum* (Hemiptera: Coccidae) with mineral oil. J. Econ. Entomol. 102, 296-303.
- Chueca, P., Garcerá, C., Moltó, E., Jacas, J.A., Urbaneja, A., Pina, T. 2010. Spray deposition and efficacy of four petroleum-derived oils used against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). J. Econ. Entomol. 103, 386-393.
- Chueca, P., Moltó, E., Garcerá, C. 2011. Influence of nozzles on mass balance of spray applications in citrus. 11th Workshop on Sustainable Plant Protection

- Techniques in Fruit Growing (SUPROFRUIT). Bergerac (France), June 8th to 10th, 2011, 50-51.
- Collins, P.J., Lambkin, T.M., Bodnaruk, K.P. 1994. Suspected resistance to methidathion in *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae) from Queensland. *J. Aust. Entomol. Soc.* 33, 325-326.
- Coscollá, R. 2003. Los residuos de plaguicidas en frutos cítricos: problemas y soluciones. *Comunitat Valenciana Agraria* 25, 3-10.
- Coscollá, R. 2007. Situación de la lucha química contra plagas en cítricos. *Vida Rural* 247, 36-40.
- Costa, J., García-Marí, F. 1999. Métodos de control de plagas. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Producción Vegetal. Publicación 99-4017
- Cross, J.V., Murray, R.A., Ridout, M.S., Walklate, P.J. 1997. Quantification of spray deposits and their variability on apple trees. *Aspect Appl. Biol. Optimising pesticide applications* 48, 217-224.
- Cross, J.V., Walklate, P.J., Murray, R.A., Richardson, G.M. 2001. Spray deposits and losses in different sized apple trees from an axial fan orchard sprayer: 2. Effects of spray quality. *Crop Prot.* 20, 333-343.
- Cross, J.V., Walklate, P.J. 2008. The UK PACE Scheme for Adjusting the Dose to Suit Apple Crops. *Agricultural Engineering International: the CIGR EJournal*. Manuscript ALNARP 08 003. Vol. X.
- Cunha, J.P., Chueca, P., Garcerá, C., Moltó, E. 2012. Risk assessment of pesticide spray drift from citrus applications with air-blast sprayers in Spain. *Crop Prot.* 42, 116-123.
- Cunningham, G.P., Harden, J. 1998a. Air-tower sprayers increase spray application efficiency in mature citrus trees. *Australian J. Exp. Agric.* 38, 871-877.

- Cunningham, G.P., Harden, J. 1998b. Reducing spray volumes applied to mature citrus trees. *Crop Prot* 17, 289-292.
- Cunningham, G.P., Harden, J. 1999. Sprayers to reduce spray volumes in mature citrus trees. *Crop Prot.* 18, 275-281.
- Cunningham, I.C. 1996. Biology and management of field pests of mangoes. Report of Queensland Department of Primary Industry, Horticultural Research and Agricultural Corporation, 26 pp.
- Davidson, N.A. 1991. The role of spray oils in alternative agriculture. *Components Newsl.* 2, 1-7.
- Davidson, N.A., Dibble, J.E., Flint, M.L., Marer, P.J., Guye, A. 1991. Managing insects and mites with spray oils. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 3347, Oakland.
- Delucchi V. 1965. Notes sur le pou de Californie (*Aonidiella aurantii* Maskell) au Maroc (Hom. Coccoidea). *Ann. Soc. Ent. Fr.* 1, 739-788.
- DOCE (Diario Oficial de la Comunidad Europea) 1991. Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. DO L 230 de 19 de agosto de 1991 pp: 1-32 (Incorporada al ordenamiento jurídico español en virtud del Real Decreto 2163/1994, de 4 de noviembre, por el que se implanta el sistema armonizado comunitario de autorización para comercializar y utilizar productos fitosanitarios. BOE núm. 276 de 18 de noviembre de 1994 pp: 35452-35463)
- DOCV (Diari Oficial de la Comunitat Valenciana) 2008. Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación. Resolución de 27 de octubre de 2008, del director general de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, por la que se establecen las normas para la producción integrada en cítricos, en el ámbito de la Comunitat Valenciana. Núm. 5901 (26 de noviembre) pp: 88055-88096.

- DOCV (Diari Oficial de la Comunitat Valenciana) 2012. Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación. Resolución de 17 de abril de 2012, del director general de Producción Agraria y Ganadería, por la que se modifican las normas para la producción integrada en cítricos, en el ámbito de la Comunitat Valenciana. Núm. 6766 (3 de mayo) pp: 12261-12274.
- Domínguez J. 2002. Efecto de los aceites minerales en *Aonidiella aurantii* y los parásitos *Aphytis spp.*, *Comperiella bifasciata* y *Encarsia perniciosi*. Trabajo Final de Carrera. Universidad Politécnica de Valencia, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos
- Doruchowski, G. 1995. Relationship between coverage and deposit as affected by air jet velocity and droplet diameter. Presentation at 4th Workshop on Spray Technique in Fruit Growing, Unpublished data. East Malling, UK. Silsoe Research Institute.
- DOUE (Diario Oficial de la Unión Europea) 2005. Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. DO L70 de 16 de marzo de 2005 pp: 1-16 (última versión consolidada del 26 de octubre de 2012)
- DOUE (Diario Oficial de la Unión Europea) 2009a. Directive 2009/128/EC of the European Parliament and the Council of the European Union of 21 October of 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. Official Journal of the European Union L309 of 24 November of 2009, 71-86.
- DOUE (Diario Oficial de la Unión Europea) 2009b. Reglament (CE) 1107/2009 of the European Parliament and the Council of the European Union of 21 October of 2009 concerning the placing of plant protection products on the

- market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. Official Journal of the European Union L309 of 24 November of 2009, 1-50.
- Dunnett, C.W. 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50, 1096-1121.
- Durbá Cabrelles, J., García-Mari, F. 2006. Posibilidades de mejora del control químico del piojo rojo de California *Aonidiella aurantii* (Hemiptera: Diaspididae). *Levante Agrícola* 382, 297-302.
- Ebeling, W. 1932. Experiments with oil sprays used in the control of the California red scale, *Chrysomphalus aurantii* (Mask.) (Homoptera: Coccidae) on lemons. *J. Econ. Entomol.* 25, 1007-1012.
- Ebeling, W. 1959. Subtropical fruit pests. University of California, Division of Agricultural Science, Berkeley, California, USA.
- Ebert, T., Derksen, R. 2004. A geometric model of mortality and crop protection for insects feeding on discrete toxicant deposits. *J. Econ. Entomol.* 97, 155-162.
- Ebert, T.A., Downer, R.A. 2006. A different look at experiments on pesticide distribution. *Crop Prot.* 25, 299-309.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) 2012a. EPPO Standard PP 1/225 (2) Efficacy evaluation of plant protection products: Minimum effective dose. *Boletín EPPO* 42, 403-404.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) 2012b. EPPO Standard PP 1/239 (2) Efficacy evaluation of plant protection products: Dose expression for plant protection products. *Boletín EPPO* 42, 409-415.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2008. FAO specifications and evaluations for chlorpyrifos.  
Disponibile en:



[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/Specs/chlorpyrifos08.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/chlorpyrifos08.pdf) [Acceso 6 Noviembre 2012]

- Farooq, M., Salyani, M. 2002. Spray penetration into the citrus tree canopy from two air-carrier sprayers. *T. ASAE* 45, 1287-1293.
- FECOAV (Federación de Cooperativas Agrarias de la Comunitat Valenciana) 2007. Evaluación económica de daños por las plagas más importantes en la citricultura de la C.V. Campaña 2006-2007 (not published). Informe técnico de Francisco Girona, FECOAV.
- Fisher, R.A. 1935. *The Design of Experiments*. Edinburgh and London: Oliver and Boyd.
- Flanders, S.E. 1951. Mass culture of California red scale and its golden chalcid parasites. *Hilgardia* 21, 41.
- Flint, M.L. 1991. *Integrated pest management for citrus*, 2nd ed. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Publication n° 3303, 144 pp.
- Foldi, I. 1990a. The scale cover. En: *Armored scale insects. Their biology, natural enemies and control*. Volume A (David Rosen Ed.) Ed. Elsevier. Oxford, New York, Tokyo, 43-54.
- Foldi, I. 1990b. Moulting and scale - cover formation. En: *Armored scale insects. Their biology, natural enemies and control*. Volume A (David Rosen Ed.) Ed. Elsevier. Oxford, New York, Tokyo, 257-265.
- Forster, L.D., Luck, R.F., Grafton-Cardwell, E.E. 1995. Life stages of California red scale and its parasitoids. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, publication n° 21529, Oakland.

- Fox, R. D., R. C. Derksen, J. A. Cooper, C. R. Krause, and H.E. Ozkan. 2003. Visual and image system measurement of spray deposits using water-sensitive paper. *Appl. Eng. Agr.* 19, 549-552.
- Franz, E., Bouse, L.F., Carlton, J.B., Kirk, I.M., Latheef, M.A. 1998. Aerial spray deposit relations with plant canopy and weather parameters. *T. ASAE* 41, 959-966.
- Fraser, P., Eisenklam, P. 1956. Liquid atomization and drop size of sprays. *T. I. Chem. Eng.-Lond.* 34, 294-319.
- French, N.M., Ramaswamy, S.B., Smith, D.B., Paroonagian, D. 1992. Effect of three adjuvants on coverage, persistence, and efficacy of ground-applied chlorpyrifos for suppression of cotton aphid (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.* 85, 1347-1355.
- Frick, E.L. 1970. The effects of volume, drop size and concentration, and their interaction, on the control of apple powdery mildew by dinocap. *British Crop Protection Council, Monogr. No. 2*, 23-33.
- Frießleben, R., Roßlenbroich, H.J., Elbert, A. 2007. Dose expression in plant protection product field testing in high crops: need for harmonization. *Bayer CropScience Journal (formerly Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer)* 60, 85-96.
- Furness, G., Pinczewski, W.V. 1985. A comparison of the spray distribution obtained from sprayers with converging and diverging airjets with low volume air assisted spraying on citrus and grapevines. *J. Agr. Eng. Res.* 32, 291-310.
- Furness, G., Magarey, P.A., Miller, P.H., Drew, H.J. 1998. Fruit tree and vine sprayer calibration based on canopy size and length of row: unit canopy row method. *Crop Prot.* 17, 639-644.

- Furness, G. 2003. Distance calibration and a new pesticide label format for fruit trees and grapevines in Australia. Proc. 7<sup>th</sup> Workshop on Spray Application Techniques in Fruit Growing, University of Turin. Cuneo (Italia), Junio 2003, 19-33.
- Furness, G., Thompson, A., Manktelow, D.W.L. 2006. Multi-fan spray towers to improve dose efficiency and spray coverage uniformity in citrus trees. *Aspect Appl Biol* 77, 481-488.
- Furness, G., Thompson, A. 2008. Using point of first run-off and spray volume in litres per 100 metres per metre of canopy height for setting pesticide dose. *Agricultural Engineering International: the GIGR Ejournal*. Manuscript Alnarp 08 006. Vol. X
- Ganzelmeier, H., Rautmann, D., Spangeberg, R., Streloke, M., Herrmann, M., Wenzelburger, H.J. 1995. Studies on the spray drift of plant protection products, Blackwell Wissenschafts-Verlag GmbH, Berlin.
- Garcerá, C., Moltó, E., Chueca, P. 2011. Effect of spray volume of two organophosphate pesticides on coverage and mortality of *Aonidiella aurantii* Maskell. *Crop Prot.* 30, 693-697.
- Garcerá, C., Moltó, E., Zarzo., M. Chueca, P. 2012. Modelling the spray deposition and efficacy of two mineral oil-based products for the control of California red scale, *Aonidiella aurantii* (Maskell). *Crop Prot* 31, 78-84.
- Garcerá, C., Moltó, E., Chueca, P. 2013. Factors influencing the efficacy of two organophosphate insecticides in controlling California red scale, *Aonidiella aurantii* (Maskell). A basis for reducing spray application volume in Mediterranean conditions. *Pest Manag. Sci.*, publicado online (doi: 10.1002/ps.3515).
- García-Marí F. 1994. The scale insects of citrus in Spain: pest status and control. Integrated management of insect and mite pests of Citrus. A world overview.
-

- Proceedings Third International citrus seminar. Estação experimental de citricultura de Bebedouro. State of Sao Paulo, Brasil, 47-66.
- García-Marí, F., Rodrigo, E. 1995. Life cycle of the diaspidids *Aonidiella aurantii*, *Lepidosaphes beckii* and *Parlatoria pergandii* in an orange grove in Valencia (Spain). Boletín OILB 18, 118-125.
- García-Marí, F., Hernández-Penadés, P., Rodríguez, J.M., Alonso, A., Rodrigo, E., Olmeda, T. 2003. Determinación de un umbral de tratamiento para diaspididos de cítricos basado en la infestación de los frutos en la cosecha. Levante Agrícola 1er Trimestre 2003, 37-41.
- Gaskin, R.E., Bradley, S.J., Manktelow, D.W.L., Zabkiewicz, J.A. 2002. Enhancement of plant- and petroleum-derived spray oils with alkylsilicone surfactants, en: Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. (Eds.), Spray Oils Beyond 2000. University of Western Sydney, New South Wales, Australia, pp. 56-61.
- Georgala, M.B. 1975. Possible resistance of the red scale *Aonidiella aurantii* Mask. to corrective spray treatments. Citrus Subtrop. Fruit J. 504: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17.
- Georgala, M.B. 1984. Preventive programme options for the control of red scale. Citrus Subtrop. Fruit J. 606, 9-12.
- Georgala, M.B. 1988. Control of red scale *Aonidiella aurantii* (Mask.) in South Africa influenced by its resistance to organophosphates, en: R. Goren, R., Mendel. K. (Eds.) Proc. of the Sixth Int. Citrus Congr., International Society of Citriculture, Rehovot, Israel, 1097-1102.
- Gil, E. 2001. Metodología y criterios para la selección y evaluación de equipos de aplicación de fitosanitarios en viña. Tesis doctoral. Universitat de Lleida, Departamento de Ingeniería Agroforestal, 540 pp.

- Gil, E., Bernat, C., Queraltó, M., López, A., Planas, S., Rosell, J.R., Val, L. 2005. Pesticide dose adjustment in vineyard: Relationship between crop characteristics and quality of the application. En: Proceedings of the Eight Workshop on Spray Application Techniques in Fruit Growing, Barcelona, España, 29-36.
- Gil, E., Escolà, A., Rosell, J.R., Planas, S., Val, L. 2007. Variable rate application of plant protection products in vineyard using ultrasonic sensors. *Crop Prot.* 26:1287–1297.
- Gil, E., Escolà, A. 2009. Design of a decision support method to determine volume rate for vineyard spraying. *Appl. Eng. Agric.* 25, 145-151.
- Gil, Y., Sinfort, C., Brunet, Y., Polveche, V, Bonicelli, B. 2007. Atmospheric loss of pesticides above an artificial vineyard during air-assisted spraying. *Atmos. Environ.* 41, 2945-2957.
- Girona, M. 2004. Applaud: Un insecticida eficaz para el control de piojo rojo de California (*Aonidiella aurantii*) y otras cochinillas de los cítricos. *Levante Agrícola* 370, 151-154.
- Göhlich, H. 1983. Assessment of spray drift in sloping vineyards. *Crop Prot.* 2, 37-49.
- Gómez-Menor, J. 1957. Cochinillas que atacan a los frutales. *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola*, vol. XXII, 48.
- Grafton-Cardwell, E.E., Vehrs, S.L.C. 1995. Monitoring for organophosphate- and carbamate- resistant armored scale (Homoptera: Diaspididae) in San Joaquin Valley citrus. *J. Econ. Entomol.* 88, 495-504.
- Grafton-Cardwell, E.E., Gu, P. 2003. Conserving vedalia beetle, *Rodolia cardinalis* (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae), in citrus: A continuing challenge as new insecticides gain registration. *J. Econ. Entomol.* 96, 1388-1398.

- Grafton-Cardwell, E.E., Reagan, C. 2005. California red scale insecticide efficacy trial, 2003. *Arthropod Management Tests* 30 D4.
- Grafton-Cardwell, E.E., Reagan, C. 2006. Efficacy of PureSpray Foliar oil to control California red scale, 2005. *Arthropod Management Tests* 31 D15.
- Grafton-Cardwell, E.E., Reagan, C. 2007. Efficacy of Movento to control California red scale, 2006. *Arthropod Management Tests* 32 D6.
- Grafton-Cardwell, E.E., Morse J. G., O'Connell N. V., Phillips P. A., Kallsen C. E., Haviland D. R. 2009. General pesticide information, and insects, mites and snails. UC IPM Pest Management Guidelines Citrus, UC Statewide Integrated Pest management Program, University of California Agric. and Natural Resources Publication 3441.
- Grafton-Cardwell, E.E., Reagan, C. 2009. California red scale insecticide efficacy trial, 2007. *Arthropod Management Tests* 34 D3.
- Grout, T.G., Richards, G.I. 1991. Effect of buprofezin applications at different phenological times on California red scale. *J. Econ. Entomol.* 84, 1802-1805.
- Grout, T.G., Richards, G.I. 1992. Organophosphate resistance in California red scale (Homoptera, Diaspididae) on citrus in the Eastern Cape and the effect of oils as an organophosphate synergist. *J. Entomol. Soc. South Af.* 55, 1-7.
- Grout T.G., Richards G.I., Stephen P.R. 1992. The possibility of reducing spray volumes used for the control of red scale, *Aonidiella aurantii* (Mask.). *Citrus Journal* 2, 34-36.
- Grout, T.G., Stephen, P.R. 1993. Reduced spray volumes for the control of red scale, *Aonidiella aurantii* (Maskell), with oil or pyriproxyfen plus oil. *Citrus Journal* 3, 27-28.
- Gujarati, D.N. 2003. Basic econometrics. McGraw Hill. 1002 pp.

- Habib, A., Salama, H.S., Amin, A.H. 1972. The build up of population of red scale *Aonidiella aurantii* (Maskell) on citrus trees in Egypt. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie-J. Appl. Entomol.* 70, 378-385.
- Hall, F.R. 1991. Influence of Canopy Geometry in Spray Deposition and IPM. *HortScience* 26, 1012-1017.
- Hall, F.R., Chapple, A.C., Downer, R.A., Kirchner, L.M., Thacker, J.R.M. 1993. Pesticide application as affected by spray modifiers. *Pestic. Sci.* 38, 123-133.
- Haq, K., Akesson, N.B., Yates, W.E. 1983. Analysis of droplet spectra and spray recovery as a function of atomizer type and fluid physical properties. *ASTM STP 828*, 67-82, Philadelphia, PA.
- Hare, J.D., Yu, D.S., Luck, R.F. 1990. Variations in life history parameters of California red scale on different citrus cultivars. *Ecology* 71, 1451-1460.
- Hattingh, V., Tate, B.A. 1995. Effects of field-weathered residues of insect growth regulators on some Coccinellidae (Coleoptera) of economic importance as biocontrol agents. *Bull. Entomol. Res.* 85, 489-493.
- Hattingh, V., Tate B.A. 1996. The effect of insect growth regulator use on IPM in southern African citrus. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, Sun City, South Africa, 523-525.
- Hernández-Penadés, P., Rodríguez, J.M., Alonso, A., García-Marí, F. 2001. Umbrales de tratamiento para el poll roig de California *Aonidiella aurantii*. *Levante Agrícola* 1er Trimestre 2001, 50-53.
- Hernández-Penadés, P., Rodríguez, J.M., Alonso, A., Costa, S., García-Marí, F. 2004. Influencia del momento del tratamiento en la eficacia del control químico, en los diaspíridos de cítricos piojo gris (*Parlatoria pergandii*), serpetta gruesa (*Lepidosaphes beckii*) y piojo rojo de California (*Aonidiella aurantii*). *Levante Agrícola* 370, 122-130.

- Herron, G.A., Beattie, G.A.C., Parkes, R.A., Barchia, J. 1995. Potter Spray Tower Bioassay of Selected Citrus Pests to Petroleum Spray Oil. *J. Aust. Entomol. Soc.* 34, 255-263.
- Hewitt, A.J. (Spray Drift Task Force) 2001. A summary of tank mix and nozzle effects on droplet size.  
Disponibile en: [http://www.agdrift.com/PDF\\_FILES/Tankmix.pdf](http://www.agdrift.com/PDF_FILES/Tankmix.pdf) [Acceso 1 Octubre de 2008].
- Hislop, E. C. 1987. Can we define and achieve optimum pesticide deposits? *Aspects Appl. Biol.* 14, 153-172.
- Hoffmann, W.C., Salyani, M. 1996. Spray deposition on citrus canopies under different meteorological conditions. *T. ASAE* 39, 17-22.
- Holloway, P.J., Butler-Ellis, M.C., Webb, D.A., Western, N.M., Tuck, C.R., Hayes, A.L., Miller, P.C.H. 2000. Effects of some agricultural tank-mix adjuvants on the deposition efficiency of aqueous sprays on foliage. *Crop Prot.* 19, 27-37.
- Hołownicki, R., Doruchowski, G., Godyn, A. 1996. Efficient spray deposition in the orchard using a tunnel sprayer with a new concept of air jet emission. *IOBC/WPRS Bulletin* 19, 284-288.
- Hołownicki, R., Doruchowski, G., Swiechowski, W., Jaeken, P. 2002. Methods of evaluation of spray deposit and coverage on artificial targets. *EJPAU, Agricultural Engineering* 5(1) #3.  
Disponibile en: <http://www.ejpau.media.pl/volume5/issue1/engineering/art-03.html> [Acceso 9 Enero 2011].
- Huijsmans, J.F.M., Porskamp, H.A.J., Heijne, B. 1993. Orchard tunnel sprayers with reduced emission to the environment. In *Proc. of the ANPP BCPC 2nd International Symposium on Pesticide Application Techniques, Strasbourg, Vol.1, ANPP, Paris, 297-304.*



- Ishaaya, I., Mendel, Z., Blumberg, D. 1992. Effect of buprofezin on California red scale, *Aonidiella aurantii* (Maskell), in a citrus orchard. *Isr. J. Entomol.* 25-26, 67-71.
- Iwata, Y., O'Neal, J., Barkley, J.H., Dinoff, T.M., Dusch, M.E. 1983. Chorpyrifos applied to California citrus: residue levels on foliage and on and in fruit. *J. Agr. Food Chem.* 31, 603-610.
- Jacques, D.F., Kuhlmann, B. 2002. ExxonMobil experience with horticultural mineral oils, en: Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L. Rae, Dj., Spooner-Hart, R.N. (Eds.) *Spray Oils Beyond 2000. Sustainable Pest & Disease Management.* University of Western Sydney, New South Wales, Australia, 39-51.
- Jeppson, L.R., Carman, G.E. 1974. Low volume applications to citrus trees: effectiveness on control of citrus red mite and California red scale with petroleum oils and pesticides. *J. Econ. Entomol.* 67, 403-407.
- Jiang, C., Derksen, C. R. 1995. Morphological image processing for spray deposit analysis. *T. ASAE* 38, 1581-1591.
- Johnson, D. (Spray Drift Task Force) 1997. A summary of airblast application studies. Disponible en: [http://www.agdrift.com/PDF\\_FILES/Airblast.pdf](http://www.agdrift.com/PDF_FILES/Airblast.pdf) [Acceso Enero 2012].
- Jørgensen, L. 2000. Physics: the physics of sprays, en: Hardi International. *International Application Technology Course 2000.* Taastrup, 2000 vol.1 capítulo 2, 38-48.
- Juste, F., Sánchez, S., Ibáñez, R., Val, L., Gracia, C. 1990. Measurement of spray deposition and efficiency of pesticides application in citrus orchards. *J. Agr. Eng. Res.* 46, 187-196.

- Kallianpur, A.S., Herron, G.A., Beattie, G.A.C., Watson, D.M. 2002. Potter spray tower bioassays of two horticultural mineral oils against tomato thrips, tomato russet mite and greenhouse whitefly adults, and common brown leafhopper nymphs, en: Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. (Eds.), *Spray Oils Beyond 2000*. University of Western Sydney, New South Wales, Australia, 112-117.
- Koch, H. 2007. How to achieve conformity with the dose expression and sprayer function in high crops. *Bayer CropScience Journal* 60, 71–84.
- Kuhlmann, B., Jacques, D.F. 2002. Classifications, standards, and nomenclature – mineral oils, agricultural mineral oils and horticultural mineral oils, en: Beattie G.A.C., Watson, D.M., Stevens M.L. Rae Dj., Spooner-Hart R.N., (Eds.), *Spray Oils Beyond 2000. Sustainable Pest & Disease Management*. University of Western Sydney, New South Wales, Australia, 29-38.
- Leonardi, G. 1920. *Monografia delle cocciniglie italiane. Opera postuma*. Ed. Ernesto della Torre, Portici. 555 pp.
- Levene, H. 1960. Robust Tests for Equality of Variances, en: Olkin, I., Ghurye, S.G., Hoeffding, W., Madow, W.G., Mann, H.B. (Eds.), *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*. Stanford University Press, Palo Alto, CA, 278-292.
- Levitin, E., Cohen, E. 1998. The involvement of acetylcholinesterase in resistance of the California red scale *Aonidiella aurantii* to organophosphorus pesticides. *Entomol. Exp. Appl.* 88, 115-121.
- Li, B., Whitney, J.D., Miller, W.M., Wheaton, T.A. 2001. Ultrasonic-based canopy volume measurements of citrus trees. ASAE Paper N. 021053, St. Joseph, Mich.: ASAE.
- Liang, W., Beattie, G.A.C., Meats, A., Spooner-Hart, R., Jiang, L. 2002. Efficacy of a horticultural mineral oil for control of purple scale and white louse scale in

- orange orchards, en: Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L. Rae, Dj., Spooner-Hart, R.N. (Eds.), *Spray Oils Beyond 2000. Sustainable Pest & Disease Management*. University of Western Sydney, New South Wales, Australia, 444-450
- Liang, W., Meats, A., Beattie, G.A.C., Spooner-Hart, R., Jiang, L. 2010. Conservation of natural enemy fauna in citrus canopies by horticultural mineral oil: Comparison with effects of carbaryl and methidathion treatments for control of armored scales. *Insect Sci.* 17, 414-426.
- Lindinger, L. 1912. *Die Schildläuse (Coccidae) Europas, Nordafrikas und Vorder-Asiens, einschliesslich der Azoren, der Kanaren und Madeiras*. Eugen Ulmer, Stuttgart, 392 pp.
- Llorens, J.M. 1990. *Homoptera I. Cochinillas de los cítricos y su control biológico*. Ed. Pisa Ediciones. Alicante, España.
- Llorens, J., Gil, E., Llop, J., Escolà, A. 2010. Variable rate dosing in precise viticulture: Use of electronic devices to improve application efficiency. *Crop Prot.* 29, 239-248.
- Loia, M., Viggiani, G. 1992. Effect of some insect growth regulators on *Rodolia cardinalis* (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae), well known predator of *Icerya purchasi* Maskell (Homoptera: Monophlebidae). *Proceedings of the International Society of Citriculture 1992*. E Tribulato, A Gentile, G Reforgiato (Eds.), 961-963.
- Luck, R.F. 1995. California red scale *Aonidiella aurantii* (Maskell) Homoptera: Diaspididae, en: *Biological control in the Western United States*. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 3361, 155-157.
- Luck, R.F., Forster, L.D., Morse, J.G. 1996. An ecologically based IPM program for citrus in California's San Joaquin Valley using augmentative biological
-

control. Proceedings of the International Society of Citriculture vol. 1, 499-503.

Magagula, C.N, Samways, M.J. 2000. Effects of insect growth regulators on *Chilocorus nigritus* (Fabricius) (Coleoptera: Coccinellidae), a non-target natural enemy of citrus red scale, *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Homoptera: Diaspididae), in Southern Africa: evidence from laboratory and field trials. Afr. Entomol. 8, 47-56.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) 2012a. Registro de Productos Fitosanitarios.

Disponible en: <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/medios-de-produccion/productos-fitosanitarios/fitos.asp> [Acceso 31 Octubre 2012].

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) 2012b. Pautas Generales para la campaña de exportación de cítricos con destino a Australia, China, Corea del Sur y México. Informe de Agosto de 2012 de la Subdirección General de Acuerdos Sanitarios y Control en Frontera (Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria).

Disponible en:

[http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/export/sites/default/comun/galerias/galeriaDescargas/cap/agricultura-ganaderia/agricultura/Sanidad-Vegetal/Requisitos-exportacion/Mexico/CITRICOS\\_Pautas\\_Generales\\_2012.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/export/sites/default/comun/galerias/galeriaDescargas/cap/agricultura-ganaderia/agricultura/Sanidad-Vegetal/Requisitos-exportacion/Mexico/CITRICOS_Pautas_Generales_2012.pdf) [Acceso 26 Noviembre 2012].

Martínez-Hervás, M.A., Soto, A., García-Marí, F. 2005. Prospección de la eficacia de clorpirifos en poblaciones del cóccido *Aonidiella aurantii* (Homoptera: Diaspididae) en parcelas de cítricos de la Comunidad Valenciana. Levante Agrícola 375, 176-182.

- Martínez-Hervás, M.A., Soto, A., García-Marí, F. 2006. Survey of resistance of the citrus red scale *Aonidiella aurantii* (Homoptera: Coccidae) to chlorpyrifos in Spanish citrus orchards. IOBC/WPRS Bull. 29, 255-258.
- Maskell, W.M. 1879. On some Coccidae in New Zealand. Transactions and Proceedings of the New Zealand Institute
- McClure, M. 1990. Patterns of temporal and spatial distribution. En: Armored scale insects. Their biology, natural enemies and control. Volume A (David Rosen Ed.) Ed. Elsevier. Oxford, New York, Tokyo, 309-314.
- McCoy, C.W., Lye, B.H., Salyani, M., 1989. Spray volume and acaricide rate effects on the control of the citrus rust mite. Proc. Fla. State Hort. Soc. 102, 36-40.
- McCoy, C.W., Lye, B.H., Salyani, M. 1990. Effect of spray volume on the residual control of citrus rust mite. Citrus & Vegetable Magazine January 1990, 23, 64-65.
- Mendel, Z., Blumberg, D., Ishaaya, I. 1991. Effect of buprofezin on *Icerya purchasi* and *Planococcus citri*. Phytoparasitica 19, 103-112.
- Mercader, G., Pellicer, J., Fabado, F., Moltó, E., Juste, F. 1995. Influencia de los colectores sobre los parámetros característicos de la pulverización en cítricos. In *VI Congreso de la SECH*, 322. Barcelona. SECH.
- Miller, P.C.H., Butler-Ellis, M.C. 2000. Effects of formulation on spray nozzle performance for applications from ground-based boom sprayers. Crop Prot. 19, 609-615.
- Moltó, E., Martín, B., Gutiérrez, A. 2001. Pesticide loss reduction by automatic adaptation of spraying on globular trees. J. Agric. Eng. Res. 8, 35-41.
- Moltó, E., Chueca, P., Garcerá, C. 2006. Manejo de turboatomizadores en el cultivo de cítricos. Vida Rural 237, 56-62.

- Moner-Dualde, J.P. 2000. Consideraciones sobre el control del piojo rojo de California, *Aonidiella aurantii* (Maskell) Comunitat Valenciana Agraria nº16 pp: 16-19
- Moreno, D.S., Kennett, C.E. 1985. Predictive year-end California red scale (Homoptera: Diaspididae) orange fruit infestations based on catches of males in the San Joaquin Valley. J. Econ. Entomol. 78, 1-9.
- Nansen, C., Hinson, B., Davidson, D., Vaughn, K., Gharalari, A.H. 2010. Novel approaches to application and performance assessment of insecticide applications to crop leaves. J. Econ. Entomol. 103, 219-227.
- Nasca, A.J., Terán, A.L., Fernández, R.V., Pasqualini, A.J. 1981. Animales perjudiciales y benéficos a los cítricos en el noroeste argentino. Centro de Investigaciones sobre Regulación de Poblaciones de Organismos Nocivos (CIRPON). Argentina.
- Navarro, V., Vacas, S., Alfaro, C., Primo, J. 2009. Implementing the mating disruption technique to control the California Red Scale (*Aonidiella aurantii* Maskell). 2<sup>nd</sup> Conference on pheromones, food lure, traps and biological control: alternatives for the 21<sup>st</sup> century. Murcia (Spain), November 18th-19th, 2009.
- Nel, J.J.C., de Lange, L., van Ark, H. 1979. Resistance of citrus red scale, *Aonidiella aurantii* (Mask.), to insecticides. J. Entomol. Soc. South. Afr. 42, 275-281.
- Nel, R.G. 1933. A comparison of *Aonidiella aurantii* and *Aonidiella citrina*, including a study of the internal anatomy of the latter. Hilgardia 7, 417-466.
- Nguyen, V.C., Nguyen, V.L., Pham, V.L. 2002. Development of petroleum-derived spray oil and natural-enemy-based integrated pest and disease management programs for citrus in northern Vietnam, en: Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. (Eds.), Spray Oils Beyond 2000. University of Western Sydney, New South Wales, Australia, 362-368.

- Papacek, D. 2009. Integrated pest management experiences in citrus: Trends and solutions. 2nd Conference on pheromones, food lure, traps and biological control: alternatives for the 21st century. Murcia (Spain), November 18th-19th, 2009.
- Pedigo, L.P., Hutchins, S.H., Higley, L.G. 1986. Economic injury levels in theory and practice. *Ann.Rev. Entomol.* 31, 341-368.
- Pergher G., Petris R. 2008. Pesticide dose adjustment in vineyard spraying and potential for dose reduction. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*. Manuscript ALNARP 08 011. Vol. X. May, 2008.
- Pina, T. 2006. Control biológico del piojo rojo de California, *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae) y estrategias reproductivas de su principal enemigo natural *Aphytis chrysomphali* (Mercet) (Hymenoptera: Aphelinidae). Tesis doctoral. Universidad de València. Facultat de Ciències Biològiques, Departamento de Zoología. España.
- Piñeiro, C. 1977. Control sanitario en citrus. Centro de Investigaciones Agrícolas “Alberto Boerger”. Estación Experimental Litoral Norte. Uruguay. *Panorama* 1, 22-25.
- Planas, S., Sanz, R., Escolà, A., Rossell, J. R., Camp, F., Solanelles, F. 2011. DOSAFRUT sistema de ajuste de dosis en tratamientos de plantaciones frutales. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal* 230, 58-61.
- Planes, L., Catalán, J., Tena, A., Porcuna, J.L., Jacas, J.A., Izquierdo, J., Urbaneja, A. 2013. Lethal and sublethal effects of spirotetramat on the mealybug destroyer, *Cryptolaemus montrouzieri*. *J. Pest Sci.* 86, 321-327
- Potter, C. 1952. An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized spray fluids. *Ann. Appl. Biol.* 39, 1-29.

- Quayle, H.J. 1911. The red or orange scale. University of California Publications. Bulletin 222: 99-150.
- Quayle, H.J. 1941. Insects of citrus and other subtropical fruits. Comstock, Ithaca, New York, USA.
- Ramos, H.H., Yanai, K., Corrêa, I.M., Bassanezi, R.B., Garcia, L.C. 2007. Características da pulverização em citros em função do volume de calda aplicado com turbopulverizador. Eng. Agríc., Jaboticabal 27 (special), 56-65.
- Reed, J.T., Smith, D.B. 2001. Droplet size and spray volume effects on insecticide deposit and mortality of Heliothine (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in cotton. J. Econ. Entomol. 94, 640-647.
- Reichard, D.L., Retzer, H.J., Liljedahl, L.A., Hall, F.R. 1977. Spray droplet size distributions delivered by airblast orchard sprayers. T. ASAE 30, 232-237&242.
- Reichard, D.L., Brazee, R.D., Bukovac, M.J., Fox, R.D. 1986. A system for photographically studying droplet impaction on leaf surfaces. T. ASAE 29, 707-713.
- Riehl, L.A., LaDue, J.P. 1952. Evaluation of petroleum fractions against California red scale and citrus red mite. Advances in Chem. Ser. 7, 25-36.
- Riehl, L.A., LaDue, J.P., Rodriguez, J.L. 1958. Evaluation of representative California spray oils against citrus red mite and California red scale. J. Econ. Entomol. 51, 193-195.
- Riehl, L.A. 1981. Fundamental consideration and current development in the production and use of petroleum oils. Proceedings of the Fourth International Society of Citriculture, Tokio, Japan, 601-607.



- Riehl, L.A. 1988. Update, 1981-1987, of developments in mineral spray oils, in Proceedings of the Sixth International Citrus Congress Goren, R., Mendel, K., (Eds.). Tel Aviv, Israel. Philadelphia/Rehoboth, 1253-1267.
- Ripollés, J.L. 1990. Las cochinillas de los agrios. IV Symposium Nacional de Agroquímicos. Sevilla 1990. Levante agrícola. 1er Trimestre 1990, núm.297-298, 37-45.
- Rivero, J.M. 1996. Separación postcosecha en cítricos del piojo rojo de California con agua a presión. Agrícola Vergel 174, 366-370.
- Rodrigo, E., García-Marí, F. 1990. Comparación del ciclo biológico de los diaspinos *Parlatoria pergandii*, *Aonidiella aurantii* y *Lepidosaphes beckii* (Homoptera, Diaspididae) en cítricos. Bol. San. Veg. Plagas 16, 25-35.
- Rodrigo, E., García-Marí, F. 1992. Ciclo biológico de los diaspinos de cítricos *Aonidiella aurantii* (Mask.), *Lepidosaphes beckii* (Newm.) y *Parlatoria pergandei* (Comst.) en 1990. Bol. San. Veg. Plagas 18, 31-44.
- Rodrigo, E. 1993. Ciclo biológico comparado de *Aonidiella aurantii* (Mask.), *Lepidosaphes beckii* (New.) y *Parlatoria pergandii* Comst. (Homoptera: Diaspididae) y sus parasitoides. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. España
- Rodrigo, E., García-Marí, F. 1994. Estudio de la abundancia y distribución de algunos cóccidos diaspididos de cítricos. Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas 20, 151-164.
- Rodrigo, E., García-Marí, F., Rodríguez-Reina, J.M., Olmeda, T. 2004. Colonization of growing fruit by the armoured scales *Lepidosaphes beckii*, *Parlatoria pergandii* and *Aonidiella aurantii* (Hom., Diaspididae). J. Appl. Entomol. 128, 569-575.

- Rosell, J., Llorens, J., Sanz, R., Arno, J., Ribes-Dasi, M., Masip, J., Escolà, A., Camp, F., Solanelles, F., Gràcia, F., Gil, E., Val, L., Planas, S., Palacín, J. 2009. Obtaining the three-dimensional structure of tree orchards from remote 2D terrestrial LIDAR scanning. *Agric. For. Meteorol.* 149, 1505-1515.
- Rosen, D. 1995. Control integrado de plagas – CIP en cítricos en Israel. *Phytoma-España* 72, 74-78.
- Salama, H.S., Amin, A.H. 1983. Chemical control of scale insects (Homoptera: Coccidae) infesting citrus trees in Egypt. *Crop Prot.* 2, 317-324.
- Salyani, M. 1988. Droplet size effect on spray deposition efficiency of citrus leaves. *T. ASAE* 31, 1680-1684.
- Salyani, M., McCoy, C.W., Hedden, S.L. 1988. Spray volume effects on deposition and citrus rust mite control. *ASTM STP 980. Pestic. Formulations Appl. Syst.* 8, 254-263.
- Salyani, M., Whitney, J.D. 1988. Evaluation of methodologies for field studies of spray deposition. *T. ASAE* 31, 390-395.
- Salyani, M., McCoy, C.W. 1989a. Spray droplet size effect on mortality of citrus rust mite, en: Hazen J.L., Hovde D.A. (Eds.), *Pesticide Formulations and Application Systems: International Aspects 9th volume*, ASTM STP 1036. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, EEUU.
- Salyani, M., McCoy, C.W. 1989b. Deposition of different spray volumes on citrus trees. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 102, 32-36.
- Salyani, M., Whitney, J.D. 1990. Ground speed effect on spray deposition inside citrus trees. *T. ASAE* 33, 361-366.
- Salyani, M., Fox, R.D. 1999. Evaluation of spray quality by oil- and water-sensitive papers. *T. ASAE* 42, 37-43.

- Salyani, M., Farooq, M., Sweeb, R. 2007a. Mass balance of citrus spray applications. ASABE Annual International Meeting. Paper number 071037.
- Salyani, M., Farooq, M., Sweeb, R.D. 2007b. Spray deposition and mass balance in citrus orchard applications. T. ASABE 50, 1963-1969.
- Sánchez-Baños, M., Pina-Olmos, J. 1996. Los aceites minerales en los cultivos leñosos. *Levante Agrícola* 336, 205-213.
- SARDI)/PIRSA (South Australian Research and Development Institute/Primary Industries and Resources S.A.) 2002. Distance Based Calibration using the Spray Volume Calculator.  
Disponibile en:  
[http://www.sardi.sa.gov.au/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0005/46526/distcalcropland\\_sb.pdf](http://www.sardi.sa.gov.au/__data/assets/pdf_file/0005/46526/distcalcropland_sb.pdf) [Acceso 10 Diciembre 2012]
- Schick, R.J. 1997. *An Engineer's Practical Guide to Drop Size. Spray Analysis and Research Services of Spraying Systems Co. USA, Bulletin 459.*
- Schick, R.J. 2006. *Spray Technology Reference Guide: Understanding Drop Size. Spray Analysis and Research Services of Spraying Systems Co. USA, Bulletin 459B.*
- Schneider-Orelli, O. 1947. *Entomologisches Praktikum: Einführung in die land- und forstwirtschaftliche Insektenkunde (Entomological Laboratory: An introduction in the agricultural and forestry entomology).* HR Sauerländer and Co., Aarau, Switzerland, 237 pp.
- Shapiro, S.S., Wilk, M.B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52, 591-611.
- Sharp, R. B. 1955. The determination of spray deposit using fluorescent tracers. *NIAE Techn. Memo.* 119.

- Siegfried, W., Viret, O., Huber, B., Wohlhauser, R. 2007. Dosage of plant protection products adapted to leaf area index in viticulture. *Crop Protection* 26, 73-82.
- Smith, D., Beattie, G.A.C., Broadley, R. 1997. Citrus pests and their natural enemies. Integrated pest management in Australia. Dept of Primary Industries. Queensland, Australia, 272 pp.
- Smith, D.B., Askew, S.D., Morris, W.H., Shaw, D.R., Boyette, M. 2000. Droplet size and leaf morphology effects on pesticide spray deposition. *T. ASAE* 43, 255-259.
- Smith, D.N., King, W.J., Topper, C.P., Mhando, H., Cooper, J.F. 1997. Studies on spray deposition on cashew trees in Tanzania with reference to the use of fungicides to control *Oidium anacardii*. *Crop Prot.* 16, 313-322.
- Sorribas, J.J. 2011. Biological control of California red scale, *Aonidiella aurantii* (Hemiptera: Diaspididae): spatial and temporal distribution of natural enemies, parasitism levels and climate effects. PhD Thesis. Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Departamento de Ecosistemas Agroforestales. España.
- Spillman, J.J. 1984. Spray impaction, retention and adhesion: An introduction to basic characteristics. *Pestic. Sci.* 15, 97-106.
- Stainier, C., Destain, M.F., Schiffers, B., Lebeau, F. 2006. Droplet size spectra and drift effect of two phenmedipham formulations and four adjuvants mixtures. *Crop Prot.* 25, 1238-1243.
- Stansly, P.A., Qureshi, J.A., Kostyk, B.C. 2011. Effect of spray volume and sprayer type on efficacy of insecticides for control of Asian citrus psyllid and citrus leafminer on oranges: 2010. *Arthropod Management Tests* 35 D16.
- Sternlicht, M., Bar-Zacayi, I., Szivos, Y., Dunkelblum, E. 1981 Prediction of infestation and control of the California red scale, *Aonidiella aurantii*

- (Maskell), through use of its pheromone. Proceedings of the International Society of Citriculture 2, 695-700.
- Stevens, P.J.G. 1993. Organosilicone surfactants as adjuvants for agrochemicals. Pestic. Sci. 38, 103-122.
- Stover, E., Scotto, D., Wilson, C., Salyani, M. 2002. Spray applications to citrus: overview of factors influencing spraying efficacy and off-target deposition. IFAS Fact Sheet HS-851.
- Suits, D.B. 1957. Use of Dummy Variables in Regression Equations. J. Am. Statist. Assoc. 52, 548-551.
- Suma, P., Zappalà, L., Mazzeo, G., Siscaro, G. 2009. Lethal and sub-lethal effects of insecticides on natural enemies of citrus scale pests. BioControl, 54, 651-661.
- Tashiro, H., Beavers, J.B. 1968. Growth and development of the California red scale, *Aonidiella aurantii*. Ann. Entomol. Soc.Am. 61, 1009-1014.
- Tashiro, H., Moffitt C. 1968. Reproduction in the California red scale, *Aonidiella aurantii*. II. Mating behaviour and postinsemination female changes. Ann. Entomol. Soc.Am. 61, 1014-1020.
- Taverner, P. 2002. Drowning or just waving? A perspective on the ways petroleum-derived oils kill arthropod pests of plants, en: Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. (Eds.), Spray Oils Beyond 2000. University of Western Sydney, New South Wales, Australia, 78-88.
- Tchesslavskaja, K., Brewster, C., Thorpe, K., Sharov, A., Leonard, D., Roberts, A. 2005. Effects of intentional gaps in spray coverage on the efficacy of gypsy moth mating disruption. J. Appl. Entomol. 129, 475-480.
- Tena, A., Catalán J., Vanaeloch, P., Urbaneja, P., Jacas, J.A., Urbaneja, A. 2011. Evaluación de distintas estrategias de manejo químico del piojo rojo de California, *Aonidiella aurantii* (Maskell). Levante Agrícola 404, 44-48.

- Tena, A., García-Marí F. 2011. Current situation of citrus pests and diseases in the Mediterranean basin. IOBC/WPRS Bull. 62, 365-368.
- Toews, R.B., Frießleben, R. 2012. Dose rate expression – Need for harmonization and consequences of the Leaf Wall Area approach. Erwerbs-Obstbau 54, 49-53.
- Townsend, G.R., Heuberger, J.W. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. Plant Dis. Rep. 27, 340-343.
- Travis, J.W., Skroch, W.A., Sutton, T.B. 1987. Effect of canopy density on pesticide deposition and distribution in apple trees. Plant Dis. 71, 613-615.
- Tumbo, S.D., Salyani, M., Whitney, J.D., Wheaton, T.A., Miller, W.M. 2002. Investigation of laser and ultrasonic ranging sensors for measurements of citrus canopy volume. Appl. Eng. Agric. 18, 367-372
- Tukey, J. 1949. Comparing individual means in the analysis of variance. Biometrics 5, 99-114.
- Tumminelli, R., Conti, F., Sarraceno, F., Raciti, E., Schilirò, E. 1996. Seasonal development of California red scale (Homoptera: Diaspididae) and *Aphytis melinus* DeBach (Hymenoptera: Aphelinidae) on citrus in Eastern Sicily. Proceedings of the International Society of Citriculture 2, 493-498.
- Urbaneja, A., Pascual-Ruiz, S., Pina, T., Abad-Moyano, R., Vanaclocha, P., Montón, H., Dembilio, O., Castañera, P., Jacas, J. A. 2008. Efficacy of five acaricides against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and their side-effects on selected natural enemies occurring in citrus orchards. Pest Manag. Sci. 64, 834-842.
- Uygun, N., Şekeroğlu E. 1984. Integrated pest management studies in newly established citrus orchard. Türk. Bit. Kor. Derg. 8, 169-175
- Vacas, S., Vanaclocha, P., Alfaro, C., Primo, J., Verdú, M.J., Urbaneja, A., Navarro-Llopis, V. 2012. Mating disruption for the control of *Aonidiella aurantii*

- Maskell (Hemiptera: Diaspididae) may contribute to increased effectiveness of natural enemies. *Pest Manag. Sci.* 68, 142–148.
- Val, L., Rocamora, M.C., Pérez, M., de Miquel E. 1996. Optimisation of the air assisted spraying on horticultural crops. In 54th International Conference on Agricultural Engineering AgEng 96, paper 96A-142. Madrid. European Society of Agricultural Engineers.
- Vanaclocha, P., Urbaneja, A., Verdú, M.J. 2009. Mortalidad natural del piojo rojo de California, *Aonidiella aurantii*, en cítricos de la Comunidad Valenciana y sus parasitoides asociados. *Bol. San. Veg. Plagas* 35, 59-71.
- Vanaclocha, P., Vidal-Quist, C., Oheix, S., Montón, H., Planes, L., Catalán, J., Tena, A., Verdú, M.J., Urbaneja, A. 2013. Acute toxicity in laboratory tests of fresh and aged residues of pesticides used in citrus on the parasitoid *Aphytis melinus*. *J. Pest Sci.* 86, 329-336
- Vehrs, S.L.C., Grafton-Cardwell, E.E. 1994. Chlorpyrifos effect on armored scale (Homoptera: Diaspididae) populations in San Joaquin Valley citrus. *J. Econ. Entomol.* 87, 1046-1057.
- Vidal, E., Domínguez J., Zarzo M., Castillo B., Chueca P., Moltó E. 2003. Modelling the mortality of the California red scale (*Aonidiella aurantii* Maskell) produced by a mineral oil application in laboratory conditions. *OILB/SROP Bulletin* 26, 121.
- Viret, O., Siegfried, W., Holliger, E., Raisigl, U. 2003. Comparison of spray deposits and efficacy against powdery mildew of aerial and ground-based spraying equipment in viticulture. *Crop Prot.* 22, 1023-1032.
- Walker, G.P., Aitken, D.C.G., O'Connell, N.V., Smith, D. 1990. Using phenology to time insecticide applications for control of California red scale (Homoptera: Diaspididae) on citrus. *J. Econ. Entomol.* 83, 189-196.

- Walker, G.P., Richards, C.B., Jones, W.G., Aitken, D.C.G. 1991. Toxicity of five insecticides used to control California red scale (Homoptera: Diaspididae) against susceptible red scale strains. *J. Econ. Entomol.* 84, 17-24.
- Walklate, P.J., Cross, J.V. 2005. Orchard spraying: Opportunities to reduce rates. HDC Fact Sheet 20/05.
- Wei, J., Salyani, M. 2004. Development of a laser scanner for measuring tree canopy characteristics. Phase 1. Prototype development. *T ASAE* 48, 1595-1601.
- Wei, J., Salyani, M. 2005. Development of a laser scanner for measuring tree canopy characteristics. Phase 2. Foliar density measurement. *T ASAE* 47, 2101-2107.
- Whitney, J., Salyani, M., Churchill, D., Knapp, J., Whiteside, J. 1989. A field investigation to examine the effects of sprayer type, ground speed, and volume rate on spray deposition in Florida citrus. *J. Agric. Eng. Res.* 42, 275-283.
- Whitney, J., Salyani, M. 1991. Deposition characteristics of two air-carrier sprayers in citrus trees. *T. ASAE* 34, 47-50.
- Willard, J.R. 1972a. Studies on the rates of development and reproduction of California red scale, *Aonidiella aurantii* (Mask.) (Homoptera: Diaspididae) on citrus. *Aust. J. Zool.* 20, 37-47.
- Willard, J.R. 1972b. The rhythm of emergence of crawlers of California red scale, *Aonidiella aurantii* (Mask.), (Homoptera: Diaspididae). *Aust. J. Zool.* 20, 49-65.
- Wirth, W., Storp, S., Jacobsen, W. 1991. Mechanisms controlling leaf retention of agricultural spray solutions. *Pestic. Sci.* 33, 411-420.
- Wohlhauser, R. 2009. Dose rate expression in tree fruits - the need for harmonization approach from a chemical producer industry perspective. Paper Presented at



- the Tree Fruit Dose Adjustment Discussion Group Meeting. Wageningen, The Netherlands.
- Wohlhauser, R. 2012. Dose Rate Expression in Tree Fruits – The Need for a Harmonized Approach from an Industry Perspective. An Industry Proposal of BASF, Bayer CS, Dow AS, DuPont AS, Makhteshim Agan and Syngenta. Paper presented in the meeting of the Agricultural Field Trials working group of The German Region of the International Biometric Society (IBS-DR), 28 June 2012, Dummerstorf, Germany.
- Yarom, I., Blumberg, D., Ishaaya, I. 1988. Effects of buprofezin on California red scale (Homoptera: Diaspididae) and Mediterranean black scale (Homoptera: Coccidae). *J. Econ. Entomol.* 81, 1581-1585.
- Yates, W.E., Cowden, R.E., Akesson, N.B. 1983. Nozzle orientation, air speed and spray formulation affects on drop size spectrums. *T. ASAE* 26, 1638-1643.
- Yates, W.E., Cowden, R.E., Akesson, N.B. 1985. Drop size spectra from nozzles in high-velocity airstreams. *T. ASAE* 28, 405-410&414.
- Yee, W.L., Phillips, P.A., Faber, B.A. 2001. Effects of aerial spray volume, coverage, and sabadilla on *Scirtothrips perseae* (Thysanoptera: Thripidae). *J. Econ. Entomol.* 94, 1085-1089.
- Zabkiewicz, J.A. 2002. Enhancement of pesticide activity by oil adjuvants, en: Beattie, G.A.C., Watson, D.M., Stevens, M.L., Rae, D.J., Spooner-Hart, R.N. (Eds.), *Spray Oils Beyond 2000*. University of Western Sydney, New South Wales, Australia, 52-55.
- Zabkiewicz, J.A. 2003. Foliar interactions and uptake of agrochemical formulations – present limits and future potential, en: Voss G., Ramos G. (Eds.), *Chemistry of Crop Protection*. Wiley VCH, Weinheim, 237-251.

- Zabkiewicz, J.A. 2007. Spray formulation efficacy – holistic and futuristic perspectives. *Crop Prot.* 26, 312-319.
- Zaman, Q., Salyani, M. 2004. Effects of foliage density and ground speed on ultrasonic measurement of citrus tree volume. *Appl. Eng. Agric.* 20, 173-178.
- Zaman, Q., Schumann, A. 2005. Performance of an ultrasonic tree volume measurement system in commercial citrus groves. *Precision Agriculture* 6, 467-480.
- Zaman, Q., Schumann, A., Miller, W. 2005. Variable rate nitrogen application in Florida citrus based on ultrasonically-sensed tree size. *Appl. Eng. Agric.* 21, 331-335.
- Zappalà, L., Campolo, O., Saraceno, F., Grande, S.B., Raciti, E., Siscaro, G., Palmeri, V. 2008. Augmentative releases of *Aphytis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae) to control *Aonidiella aurantii* (Hemiptera: Diaspididae) in Sicilian citrus groves. *IOBC/WPRS Bull.* 38, 49-54.
- Zappalà, L., Campolo, O., Grande, S., Saraceno, F., Biondi, A., Siscaro, G., Palmeri, V. 2012. Dispersal of *Aphytis melinus* (Hymenoptera: Aphelinidae) after augmentative releases in citrus orchards. *Eur. J. Entomol.* 109, 561-568.
- Zhu, H., Dexter, R.W., Fox, R.D., Reichard, D.L., Brazee, R.D., Ozkan, H.E. 1997. Effects of polymer composition and viscosity on droplet size of recirculated spray solutions. *J. Agr. Eng. Res.* 67, 35-45.

## **CAPITULO X ANEJOS**

---



## ANEJO 1      PIOJO ROJO DE CALIFORNIA

### 1      ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

El piojo rojo de California *Aonidiella aurantii* (Maskell, 1879) (Hemiptera: Diaspididae) es una plaga muy común en cítricos (*Citrus spp.*), siendo uno de los cóccidos más perjudiciales en el cultivo de los agrios a nivel mundial (Tena y García-Marí, 2011).

Fue originalmente descrita en Nueva Zelanda en 1878, introduciéndose probablemente en ese tiempo en California (Quayle, 1911). Actualmente se puede encontrar en la cuenca mediterránea y en todas las zonas cítricas importantes de todo el mundo, como el continente australiano, América del Norte y del Sur y Sudáfrica (Figura X-1).



*Figura X-1. Distribución mundial de A. aurantii (Fuente: CAB Intl., 1996).*

En la Península Ibérica *Aonidiella aurantii* se citó por primera vez en el año 1910, en Valencia, por García Mercet, donde habría entrado posiblemente con alguna variedad de cítrico importada con infestación. En el mapa de distribución de esta especie que ofrecía Quayle en 1911 ya indicaba su presencia en España (Quayle,

1911), mientras que Lindinger destacó su aparición en 1912, ya no sólo en la Península Ibérica, sino también en Baleares (Lindinger, 1912). En 1920, Leonardi mencionaba que *A. aurantii* era una plaga importante del género *Citrus* (especialmente de limoneros) en los países del Mediterráneo oriental (Egipto, Grecia, Palestina y Siria), pero sin olvidar otras regiones, como Australia, América del Norte, China y Japón. De España, indicaba que, como en toda la parte occidental de la cuenca mediterránea, esta especie era rara y no causaba ningún daño (Leonardi, 1920).

Gómez-Menor (1957) la encuentra en Aspe (Alicante) en 1955, efectuando una amplia descripción de la misma. En 1985 se detecta un foco en Alzira (Valencia), momento en que pasa a considerarse una plaga, ya que se comprueba la presencia de esta cochinilla a niveles relativamente importantes. En el año 1987 también se encuentra distribuida por Andalucía, concretamente en las provincias de Sevilla, Huelva y Cádiz (Alfaro et al., 1993; Moner-Dualde, 2000; Alfaro et al., 2003b).

En la Comunidad Valenciana, a partir de su detección, se extiende por Alzira y otras zonas de La Ribera Alta. Desde principios de los años noventa se han detectado importantes ataques en zonas cada vez más amplias, estando bien distribuida en las comarcas citrícolas de las provincias de Valencia y norte de Alicante, con diferentes intensidades según zonas, expandiéndose posteriormente hacia comarcas interiores del norte de Valencia y el Baix Segura de Alicante (Rodrigo y García-Marí, 1994; CAPA, 1998). En la provincia de Castellón está en proceso de expansión, difundiéndose a partir de un foco detectado en La Plana en 1999 (Alfaro et al., 2003a; Girona, 2004), aunque no ha llegado aún al norte de la provincia (Durbá y García-Marí, 2006; Campos 2012). En la actualidad se ha expandido partiendo de su foco inicial en el centro de la provincia de Valencia, donde se encuentran máximos de población, mientras que no es tan predominante en la parte norte y sur de la región, mostrando una preferencia climática por las zonas costeras y del sur (Campos, 2012) (Figura X-2).

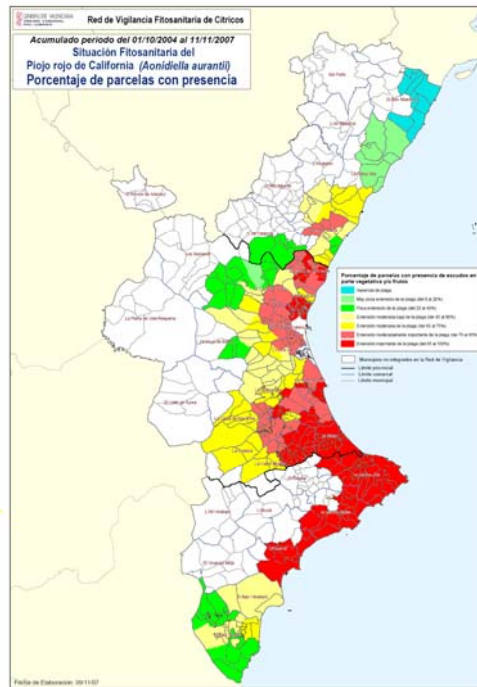


Figura X-2. Mapa de observaciones acumuladas en la Comunidad Valenciana de *A. aurantii* del 1/10/2004 a 11/11/2007 (Fuente: Red de Vigilancia Fitosanitaria de Cítricos de la GVA).

Es una especie polífaga por lo que se encuentra en gran número de plantas hospedantes ocasionales, tanto cultivadas como silvestres, tales como olivo, vid, rosas, nogal, eucalipto, etc., aunque son los cítricos sus hospedantes preferentes (Alfaro et al., 1993; Asplanato y García-Marí, 2001). Actualmente los mayores problemas, dentro de la Comunidad Valenciana, se producen en naranjas (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) y mandarinas (*Citrus reticulata* Blanco), aunque se han visto limoneros (*Citrus limon* [L.] Burm) aislados de diferentes zonas con fuertes daños (Girona, 2004).

## 2 DAÑOS EN LA PLANTA E IMPORTANCIA ECONÓMICA

La importancia económica de *A. aurantii* como plaga se debe a los daños que produce sobre la fruta, que implican devaluación de su precio, así como a la dificultad

de su control, asociado a su morfología y a la facilidad con la que se reproduce, por lo que las medidas de manejo necesarias para combatirla representan un elevado coste.

Se encuentra en todas las partes de la planta, excepto en las raíces (Beardsley y González, 1975), es decir, se alimenta de los estratos aéreos de la planta: frutos, hojas, ramas y tronco (Figura X-3). Incluso con infestaciones no excesivamente intensas, las consecuencias de su ataque son económicamente importantes, ya que causa un daño estético a los frutos, que se debe a la propia presencia de la cochinilla sobre los mismos (Kosztarab, 1990; Asplanato y García-Marí, 2001), que los devalúa comercialmente a partir de 10 individuos por fruto (Moreno y Kennett, 1985).



Figura X-3. Infestación de *A. aurantii* sobre diferentes órganos de cítricos (fruto, rama y hoja)

En caso de infestación severa los daños son directos y ocasionados por la alimentación de la cochinilla de la savia de la planta y por la posible inyección de sustancias tóxicas mediante la saliva (Ebeling, 1959), provocando una reducción del



crecimiento y del vigor, clorosis y caída de hojas, seca y muerte de ramas, desecación de frutos hasta su momificación y su caída, disminución de los rendimientos y hasta la muerte del árbol, especialmente si es joven (Bodenheimer, 1951) (Figura X-4).



*Figura X-4. Momificación de frutos y decaimiento general del árbol provocado por infestación severa de A. aurantii*

La marcada preferencia que manifiesta este insecto por los frutos puede ocasionar destríos muy elevados, incluso partiendo de poblaciones bajas (Alfaro et al., 2003b). Además, CRS está incluido en las listas de cuarentena de muchos países, ya que se transporta fácilmente en fruta y material vegetal infestados, por lo que su presencia sobre el fruto influye en su comercialización (Burger y Ulenberg, 1990; MAGRAMA, 2012b).

Los daños estimados en la campaña 2006-2007 en la Comunidad Valenciana ascendieron a un montante de 7 millones de euros de pérdidas por destrío, cifra a la que se pueden sumar los más de 75 millones de euros que supusieron los tratamientos fitosanitarios extras que se realizaron para su control (FECOAV, 2007).

### **3 MORFOLOGÍA Y DESARROLLO**

La presencia de una cubierta protectora dorsal en los estadios adultos, normalmente denominada escudo, es una de las características más notorias de la familia de los diaspídidos a la que pertenece *A. aurantii*. Es la estructura más

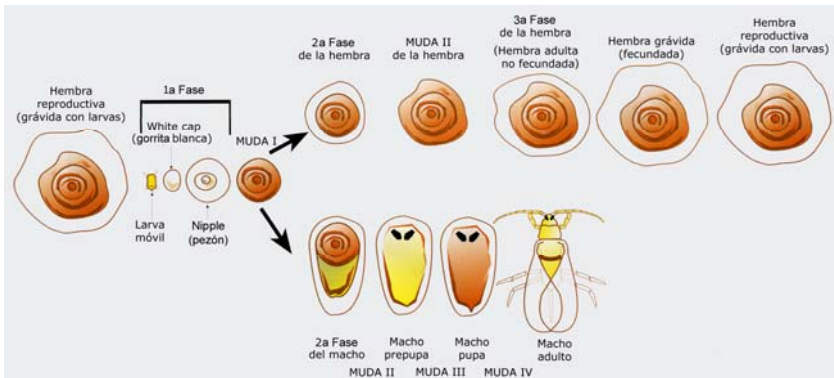
elaborada de las cochinillas y actúa como una protección efectiva contra las agresiones físicas y químicas del ambiente, por lo que los estadios que no cuentan con el escudo o en los que todavía se está formando son los más sensibles. Además, y como característica diferencial de *A. aurantii*, las hembras están doblemente protegidas, ya que presentan un fino velo ventral elaborado con secreciones ceras ventrales y residuos de la región ventral de la exuvia que también las protegen contra agresiones exteriores, haciendo incluso más difícil su control (Foldi, 1990a).

Se reproduce exclusivamente de forma sexual, por lo que la presencia del macho es imprescindible para la fecundación de la hembra (Nel, 1933; Bodenheimer, 1951). Las hembras son ovovivíparas, es decir, los huevos prácticamente formados eclosionan dentro del cuerpo de la madre, emergiendo directamente las larvas móviles en el momento de la puesta (Quayle, 1941; Flanders, 1951).

El piojo rojo de California presenta un marcado dimorfismo sexual, tanto en las características del escudo como en los estados de desarrollo. El escudo del macho es más pequeño que el de la hembra y normalmente tiene una forma oval alargada, un poco convexa, mientras que el de la hembra es circular o casi circular, y de un color más oscuro (Leonardi, 1920). En cuanto al desarrollo, la hembra adulta es neoténica, es decir, morfológicamente es una larva excepto por la madurez sexual (Beardsley y González, 1975). Es áptera y ápoda y vive fija al vegetal del que se alimenta durante toda su vida. Los machos adultos, sin embargo, son móviles, no se alimentan y poseen las características típicas de un insecto adulto, con patas, antenas y un par de alas membranosas. El dimorfismo sexual se evidencia a partir del segundo estadio de desarrollo, tras la primera muda. Las hembras realizará una muda más, mientras que los machos mudarán tres veces más (Koteja, 1990).

El ciclo de desarrollo (Figura X-5) comienza con la larva recién nacida. Es importante destacar que ésta y el macho adulto son los únicos estados en que *A. aurantii* es móvil. Después de la eclosión, las larvas móviles (*crawlers*), de color amarillo, con ojos, patas y antenas, permanecen debajo del escudo de la hembra

durante un espacio de tiempo que depende de las condiciones climáticas, fundamentalmente de la temperatura y de la intensidad de luz (Willard, 1972b), y que puede ser desde unas pocas horas hasta uno o dos días (Nel, 1933; Quayle 1941; Bodenheimer, 1951; Tashiro y Moffitt, 1968). Posteriormente emergen del escudo de la madre, en número variable entre 50 y 150 (Llorens, 1990), y caminan buscando un lugar adecuado para fijarse y alimentarse.



*Figura X-5. Ciclo biológico de A. aurantii (Fuente: Forster et al., 1995, modificado).*

Cuando la larva encuentra un lugar adecuado se asienta, encoge las patas debajo del cuerpo, inserta sus estiletes dentro del tejido vegetal y empieza a alimentarse (Quayle, 1911). Al poco tiempo comienza a segregar una sustancia que formará su escudo protector.

A partir de este momento se pueden distinguir dos tipos distintos de estados inmóviles: fase, o estado de alimentación, y muda, o estado latente (Figura X-6). Hay tres atributos que diferencian la fase: en primer lugar se diferencia porque los bordes del cuerpo del insecto bajo el escudo son redondeados, también porque el cuerpo tiene una coloración amarillo limón y por último, el escudo y el cuerpo del insecto se pueden separar; además, cuando se levanta el escudo, el cuerpo se mantiene unido a la planta por medio del tubo que inserta en el tejido vegetal para alimentarse. Los atributos que distinguen la muda son la coloración naranja que toma el cuerpo del insecto, que también se endurece (Foldi, 1990b), y la forma del borde del mismo, que

deja de ser redondeado, lo que hace imposible la separación del cuerpo y el escudo (Forster et al., 1995).

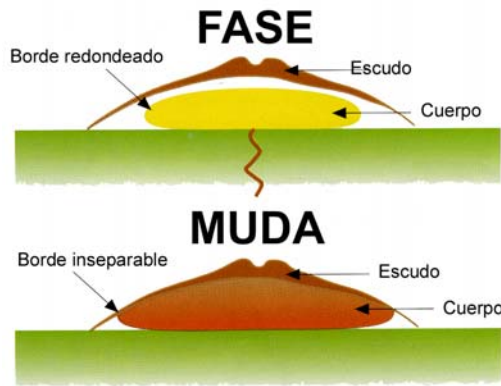


Figura X-6. Vistas en sección transversal de los estados de fase y muda de *A. aurantii* (Fuente: Forster et al., 1995).

En la primera fase, la larva recién fijada comienza formando un escudo de filamentos de cera que cubre al cuerpo dorsalmente, filamentos que son cementados por un líquido que se endurece rápidamente. A continuación la larva pivota alrededor del punto donde inserta su aparato bucal y a través de estos movimientos la secreción forma un disco perfecto, de aspecto sedoso y color blanquecino. A esta fase se le denomina gorrita blanca (*white cap*). El insecto sigue creciendo y secretando más filamentos, los cuales son posteriormente cementados. De esta manera el escudo se agranda y se hace más convexo. Después de unos días el escudo pierde su apariencia algodonosa y adquiere una forma circular con una prominencia central, habiendo alcanzado lo que se denomina estado de pezón (*nipple*) (Quayle, 1941; Ebeling, 1959; Foldi, 1990b).

Después de un cierto tiempo desde la fijación de la larva, ésta deja de alimentarse, las patas y las antenas entran en regresión y se produce la primera muda del insecto. La exuvia o restos de muda se rompen justo por el borde del cuerpo, incorporándose la parte dorsal al escudo y permaneciendo la parte ventral bajo el cuerpo del insecto. Se inicia entonces el segundo estadio de desarrollo del insecto, en

el que se convierte en ápodico, y sigue creciendo, alimentándose y construyendo su escudo. En esta etapa es posible diferenciar los sexos. La hembra sigue depositando cera uniformemente alrededor del margen del escudo por lo que mantiene su forma circular. Sin embargo, el macho no rota completamente, por lo que su escudo adquiere una forma alargada, desarrolla los ojos y los esbozos de antenas, patas, alas y aparato reproductor, mientras que el aparato bucal se reduce.

El escudo producido por el macho del segundo estadio es el definitivo, funcionando como protección para los estados de prepupa, pupa y adulto recién emergido. Las transformaciones iniciadas al final del segundo estadio de desarrollo en los machos, continúan en el tercero (prepupa) y cuarto (pupa) estadios. Los esbozos de los apéndices son más evidentes en la pupa. A diferencia de la hembra, solamente incorpora la primera exuvia al escudo, las tres restantes son expulsadas o permanecen debajo de él. El macho, durante el 3° y 4° estadios (prepupa y pupa) no se alimenta y sufre fuertes modificaciones que le permiten emerger como un insecto alado. Después de la cuarta muda emerge el macho adulto, cuya apariencia contrasta con la hembra morfológicamente degenerada. Posee un par de alas, ojos, antenas y patas bien desarrollados. Es de color amarillo-anaranjado, presentando una banda torácica de color marrón (Leonardi, 1920). Los machos adultos de los diaspididos carecen de aparato bucal funcional y por ello su longevidad está limitada a pocas horas, ya que no pueden alimentarse (Beardsley y González, 1975).

La hembra, al final del segundo estadio muda por segunda y última vez e incorpora centralmente esta segunda exuvia al escudo protector. Posteriormente la hembra alcanza el tercer y último estadio de desarrollo. En esta fase el cuerpo y el escudo del insecto crecen considerablemente hasta alcanzar su tamaño definitivo, aunque el tamaño del conjunto varía de manera importante entre individuos. Se desarrollan los lóbulos torácicos a ambos lados del aparato reproductor (pigidio). Éste se extiende más allá de los lóbulos, alcanzando el borde del escudo o incluso sobresaliendo ligeramente por fuera de éste (Tashiro y Beavers, 1968), ya que es en

esta fase cuando la hembra es receptiva para ser fecundada por el macho adulto. El borde de la nueva cubierta cérica es muy delgado y fino y presenta un característico color grisáceo. Desde el momento en que se inicia la formación del margen gris la hembra se encuentra receptiva a los machos, y éstos empiezan a encontrarlas atractivas. La hembra continúa creciendo, pero no se convierte en adulta hasta que es fecundada. La hembra libera una feromona que atrae al macho para facilitar la cópula. Esta hembra aún sin fecundar se denomina “hembra joven” o “hembra virgen”. A las 24 horas de la cópula, el pigidio se retrae gradualmente para evitar la cópula con otros machos, quedando los lóbulos más allá del borde del pigidio, lo que provoca que el cuerpo de la hembra tome forma reniforme (Tashiro y Moffitt, 1968). En este punto, el cuerpo de la hembra queda sellado dentro del escudo, al que se adhiere, cesando su alimentación. Esta hembra ya fecundada se denomina “hembra grávida”. En aproximadamente 12 días esta hembra produce las larvas, comenzando de nuevo el ciclo (Forster et al., 1995). Esta hembra con presencia de larvas bajo el escudo se denomina “hembra reproductora” o “hembra con larvas”.

## **4 FACTORES NATURALES DE CONTROL**

### **4.1 Clima**

El clima es uno de los factores más importantes que influye en la ecología de los diaspídidos, afectando a casi todos los aspectos de su vida, desde la emergencia y establecimiento de las larvas móviles hasta la reproducción y muerte de los adultos, y determina su distribución temporal y espacial. A nivel global, las condiciones climáticas definen la distribución geográfica de una especie y, localmente, el microclima afecta su distribución dentro y entre las plantas, así como la interacción con los enemigos naturales. Por otro lado, influye sobre la fenología, el ciclo estacional y la abundancia, afectando profundamente de esta manera a la dinámica de poblaciones (McClure, 1990).

Según Bodenheimer (1951), se distinguen 4 zonas de desarrollo en función de la temperatura y la humedad relativa, delimitadas en la Tabla X-1.

*Tabla X-1. Zonas límite de desarrollo*

Zona	Temperatura (°C)	Humedad Relativa (%)
Óptima	23-27.5	70-80
Favorable	18-23 y 27.5-29	60-70 y 80-85
Desfavorable	5-18 y 29-32	45-60 y 85-90
Imposible	<5 y >32	<45 y >90

Más de tres meses al año en la zona “imposible” impide el desarrollo de la plaga. Del mismo modo, tres o cuatro meses consecutivos dentro de la zona “favorable” o la “óptima” puede ser suficiente para que se convierta en una plaga importante.

Las temperaturas muy bajas parecen ser un factor más determinante que las altas. Por ejemplo, Smith D. et al. (1997) y Habib et al. (1972) señalan que *A. aurantii* se desarrolla bien con temperaturas relativamente altas y baja humedad, en Australia y Egipto, respectivamente. La lluvia también influye sobre su desarrollo, de forma que las precipitaciones fuertes pueden provocar mortandad y arrastre de larvas. También el viento cálido y seco puede producir un efecto negativo sobre la población.

El número de generaciones anuales de piojo rojo de California en cítricos varía de dos a seis dependiendo de las condiciones locales (Beardsley y González, 1975) (Tabla X-2).

Tabla X-2. Número de generaciones en diferentes localizaciones

Localización	Nº Generaciones	Referencias
España; Marruecos; Creta	3-4	Delucchi, 1965; Alexandrakis, 1983; Ripollés, 1990; Rodrigo y García-Marí, 1990, 1992; Rodrigo, 1993; García-Marí y Rodrigo, 1995; Girona, 2004
California	2-3	Ebeling, 1959; Carroll y Luck, 1984; Moreno y Kennett, 1985; Flint, 1991; Luck, 1995
Sudáfrica	4-7	Bedford, 1998b
Australia	2-6	Smith D. et al., 1997
Entre Ríos (Argentina)	4	Minatta, 1949
Tucumán (Argentina)	5-6	Nasca et al., 1981
Uruguay	3	Piñeiro, 1977; Carbonell y Briozzo, 1984; Asplanato, 2000
Israel	4-5	Avidov y Harpaz, 1969
Egipto; Italia	3-4	Habib et al., 1972; Battaglia y Viggiani, 1982; Tumminelli et al., 1996
Francia (Sur)	2	Bénassy y Bianchi, 1974

En realidad en España generalmente presenta dos generaciones completas al año: una en mayo-junio y otra en agosto-septiembre, más una tercera en otoño, a veces incompleta, en función de la climatología (Alfaro et al., 2003b). Además, se puede dar un cuarto vuelo de machos, pero no dará lugar a una cuarta generación porque es muy tardío y las larvas no sobreviven. Los estados en crecimiento y la hembra grávida son los estados más tolerantes al frío (Abdelrahman, 1974; Rodrigo y García-Marí, 1992), por lo que con la llegada del invierno son los estados que sobreviven. Esto provoca que la población se homogeneice en inviernos fríos, por lo que la primera generación de primavera suele estar bien definida. Pero si el invierno es cálido existe supervivencia de varios estadios, que llegan a la primavera con poblaciones elevadas y no homogéneas, lo que provoca que el avivamiento de las larvas se alargue considerablemente. Este fenómeno puede causar problemas de control de la plaga (Alfaro et al., 2003b).

Un método para seguir la evolución de las diferentes generaciones y además conocer la distribución de la plaga en una determinada zona se basa en el trapeo con feromonas para capturar machos (Figura X-7), de modo que se puede estimar la población existente y el momento en que se dan los máximos de emergencia de



machos, que coincide con la presencia de hembras reproductivas, lo que puede dar una idea del momento en que se producirá el avivamiento de las larvas.

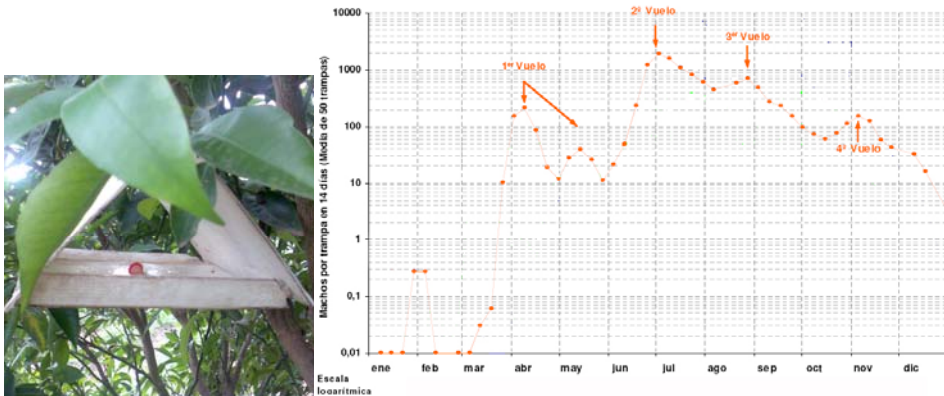


Figura X-7. Trampa con feromona para captura de machos de *A. aurantii* (Foto cedida por Pilar Vanaclocha Arocas, Unidad de Entomología del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias). Capturas de machos de *A. aurantii* durante 2006 en la Comunidad Valenciana (Fuente: Red de Vigilancia Fitosanitaria de Cítricos de la GVA).

Otro método para estimar la evolución de la plaga se basa en la integral térmica. Se han realizado varios estudios para determinar el umbral inferior de desarrollo y la constante térmica generacional. En condiciones de campo, Kennett y Hoffmann (1985) utilizaron un umbral de desarrollo de 11.7°C y hallaron una integral térmica media de 615°D entre los máximos de los diferentes estadios de desarrollo en naranjos Navel.

## 4.2 Parasitismo, enemigos naturales

El control biológico de *A. aurantii* es llevado a cabo por entomófagos que se clasifican en:

- a) Depredadores: Son artrópodos que en estado adulto o inmaduro (larvas o ninfas) se alimentan de las diferentes fases evolutivas de los fitófagos. En el control de *A. aurantii* de plantaciones cítricas españolas se encuentran de forma

natural los coleópteros *Lindorus lophantae* (Blaisdell) y *Chilocorus bipustulatus* (Linnaeus).

En general, los coleópteros depredadores no son específicos de una cochinilla, sino que se alimentan además de pulgones y otros insectos entre los que se encuentran parasitoides de cochinillas (Llorens, 1990).

b) Parasitoides: Son insectos que atacan a una sola presa u hospedante. Son parásitos sólo en sus estados inmaduros, mientras que en su forma adulta son de vida libre. El hospedante resulta muerto como consecuencia del parasitismo. Con relación a su huésped se clasifican en endoparasitoides y ectoparasitoides. Los primeros depositan sus huevos dentro del huésped y las larvas que de ellos emergen se alimentan, se desarrollan y pupan también en su interior. Los segundos también se alimentan del huésped, pero la puesta de sus huevos se realiza en las proximidades de éste después de haberlo anestesiado. El crecimiento larvario y la pupación tienen lugar fuera del mismo (Costa y García-Marí, 1999).

Como endoparásitos de *A. aurantii* se citan el encírtido *Comperiella bifasciata* (Howard) y el afelinido *Encarsia perniciosi* (Tower) (Domínguez, 2002).

Los ectoparásitos constituyen el grupo más importante en su control biológico y entre ellos se encuentra el género *Aphytis*. Tres son los ectoparásitos más importantes: *Aphytis chrysomphali* (Mercet), *Aphytis melinus* (DeBach) y *Aphytis lingnanensis* (Compere).

En cada región citrícola se da una combinación diferente de enemigos naturales presentes. Esto ocurre porque cada uno de ellos tiene limitaciones de humedad y temperatura diferentes, así como diferentes requerimientos sobre las fases del insecto huésped (Forster et al., 1995).

En la zona costera valenciana coexisten dos ectoparásitos del género *Aphytis*, *A. chrysomphali*, que es nativo de la zona, y *A. melinus* (Sorribas, 2011). Esta última especie se introdujo a partir de su cría en insectario, que comenzó en Castellón en

1976 (Llorens, 1990). Los *Aphytis*, además de utilizarse en programas de control biológico clásico mediante la introducción y colonización de distintas especies en nuevas áreas, son empleados en programas de control biológico aumentativo, ya que el control biológico natural puede verse afectado por acción de las hormigas, que protegen a la plaga, presencia de polvo, que dificulta la acción de los parasitoides, aplicaciones químicas o deriva de plaguicidas, que pueden afectar a la supervivencia de los mismos, y también por condiciones climáticas adversas (Luck et al., 1996; Zappalà et al., 2008, 2012).

## **5 ESTRATEGIAS ACTUALES DE CONTROL**

Al igual que otras muchas plagas, su manejo se ha realizado tradicionalmente con insecticidas, siendo los más utilizados en nuestro país contra el piojo rojo de California: clorpirifos, metidation, piriproxifen, buprofezin y diversos aceites minerales (Martínez-Hervás et al., 2005). En la normativa de Producción Integrada actual los productos recomendados para su control son aceite mineral, clorpirifos (sólo una aplicación al año en naranjos y dos en mandarinos), metil-clorpirifos, y piriproxifen (sólo en primera generación y si no hay cochinilla acanalada, *Icerya purchasi* Maskell (Homoptera: Monophlebidae), o cotonet, *Planococcus citri* Risso (Homoptera: Pseudococcidae)) (DOCV, 2012).

Ya en la actualidad se están empezando a tener en cuenta una serie de factores a la hora de aplicar un tratamiento para ajustarlo a las necesidades reales de control. En primer lugar la plaga, es decir, su ciclo de vida y el momento evolutivo en que se encuentra, para poder encontrar los momentos en que las aplicaciones insecticidas pueden producir un mejor control de sus poblaciones, y además conocer el grado de infestación puntual de la zona a tratar, para ajustar los productos y/o las dosis a aplicar en cada caso. Otro punto importante que tampoco hay que olvidar es que el uso de insecticidas puede ocasionar la aparición de resistencias a determinadas sustancias activas y presentar efectos negativos sobre enemigos naturales (Suma et al., 2009), además de provocar la presencia de residuos tóxicos en los alimentos y

contaminación ambiental (Asplanato y García-Marí, 2001), por lo que cada vez está tomando mayor relevancia el control biológico y la aplicación de aceites minerales que no tienen estas consecuencias negativas de los insecticidas.

## **5.1 El nivel poblacional y la evolución de la plaga**

El tratamiento químico debe responder a una estimación de la población de la plaga, que lo justifique en todos los casos y, en caso de Producción Integrada, que lo justifique como única alternativa para el control del problema fitosanitario (DOCV, 2008). Con tal fin ha de considerarse un umbral de tratamiento, que está directamente relacionado con el nivel poblacional presente, de forma que se pueda estimar si es necesario y económicamente viable efectuar el tratamiento. Para ello se define el nivel económico de daño como el nivel de población de plaga al cual el coste del control y el valor del daño se igualan. El umbral económico de tratamiento es el nivel poblacional de la plaga a partir del cual se debe aplicar el tratamiento para evitar que ésta llegue al nivel económico de daño (Pedigo et al., 1986).

En el caso del piojo rojo de California, como para otros cóccidos diaspididos, ambos conceptos coinciden, ya que el nivel de población de plaga se basa en la observación de la infestación del fruto en la cosecha del año anterior y por tanto no se incrementa con el tiempo (García-Marí et al., 2003). Las recientes normativas de Producción Integrada, tanto en la Comunidad Valenciana (DOCV, 2012) como a nivel nacional (BOE, 2004), establecen un umbral de tratamiento del 2% de frutos ocupados en la cosecha anterior, considerando que un fruto está ocupado cuando se encuentran más de 3 escudos por fruto.

En otros países se utiliza el vuelo de machos para tomar una decisión en relación con los tratamientos con plaguicidas, ya que se supone una buena correlación entre el número de machos capturados (trampas de feromonas) y la proporción de frutos infestados al final de la campaña. Esta técnica se emplea actualmente en el Valle de San Joaquín, en California, donde existen cuatro vuelos de machos claramente diferenciados (Moreno y Kennett, 1985). La decisión de tratar o no se

toma a partir de la abundancia del cuarto vuelo del año anterior, confirmándose con el segundo vuelo de ese mismo año, ya que la correlación del vuelo con la infestación en fruto ese mismo año es muy exacta en el segundo vuelo y bastante exacta en el cuarto. En la Comunidad Valenciana se ha hecho algún estudio similar (Hernández-Penadés et al., 2001), que indica que este tipo de monitoreo también se podría emplear para la determinación del umbral de tratamiento, aunque sería necesario realizar más estudios que avalasen estos resultados, ya que en la actualidad este método no se aplica nunca por desconfianza de los técnicos en el mismo.

Por el contrario, en Israel y Sudáfrica no se ha encontrado esa correlación entre el vuelo de machos y la infestación del fruto en la cosecha (Sternlicht et al., 1981; Grout y Richards, 1991) por lo que no se emplea este método para decidir los tratamientos contra la plaga.

Una vez se ha determinado si se va a efectuar el tratamiento hay que decidir cuándo, para lo que hay que tener en cuenta la fenología de la plaga, debido a que, como ya se ha comentado, los distintos estadios de desarrollo presentan diferente sensibilidad a los productos químicos (Asplanato y García-Marí, 2001). También se ha señalado que las dificultades para el control químico de este grupo de insectos son debidas en gran parte a la defensa que produce el escudo, cuyas propiedades físicas de dureza e impermeabilidad constituyen una barrera para los insecticidas de contacto (Foldi, 1990a). Esto explica que los mejores momentos de tratamiento con clorpirifos coinciden con el incremento en la producción de larvas móviles al comienzo de cada generación (Walker et al., 1990; Hernández-Penadés et al., 2004). A su vez, Davidson et al. (1991) señalan que las cochinillas son particularmente sensibles a los aceites minerales durante la etapa de larva móvil, cuando la tasa metabólica es mayor, pudiendo también tener efectos sobre el asentamiento de las mismas. En el mismo sentido, Riehl (1988) encontró que la susceptibilidad a la aplicación de aceite decrece con la edad de la cochinilla. Buprofezin, inhibidor de la síntesis de quitina,

igualmente muestra una mayor mortalidad sobre el primer estadio de desarrollo de la cochinilla (Yarom et al., 1988).

Por todo ello es muy importante conocer la evolución de la plaga y el nivel de infestación presente durante toda la campaña, controlando todas las generaciones de la plaga. Para ello se realizan muestreos sistemáticos de hojas y ramas y se emplean trampas de feromonas para machos. Es importante señalar que cada vez está más extendido entre los técnicos el muestreo en campo para seguir de manera directa la evolución, empleando las trampas simplemente para apoyar o corroborar las decisiones tomadas sobre el momento de tratamiento.

Los muestreos consisten en recoger hojas y ramas de varios árboles de la zona que se va a tratar, semanalmente desde finales de marzo, verificando con lupa la presencia de escudos y determinando el estadio al que pertenece cada uno de los individuos vivos. Posteriormente se calcula el porcentaje que representa cada estadio respecto al total. De esta forma se obtienen gráficos de población como los de la Figura X-8, en la que se identifica fácilmente el máximo de estadios sensibles. En estos gráficos se puede observar que, a pesar de que en todas las campañas este máximo se da en la misma época, siempre hay desviaciones, y hay que tratar de ajustar lo máximo posible el momento de tratamiento. Además también se observa que en la primera generación el máximo de estadios sensibles coincide con el momento en que representan un 60-70% del total, lo que se toma como nivel de referencia para decidir el momento de aplicación. La segunda generación no presenta tanta sincronía como la primera, y es más escalonada, por lo que el máximo es más difícil de identificar (Moner-Dualde, 2000).

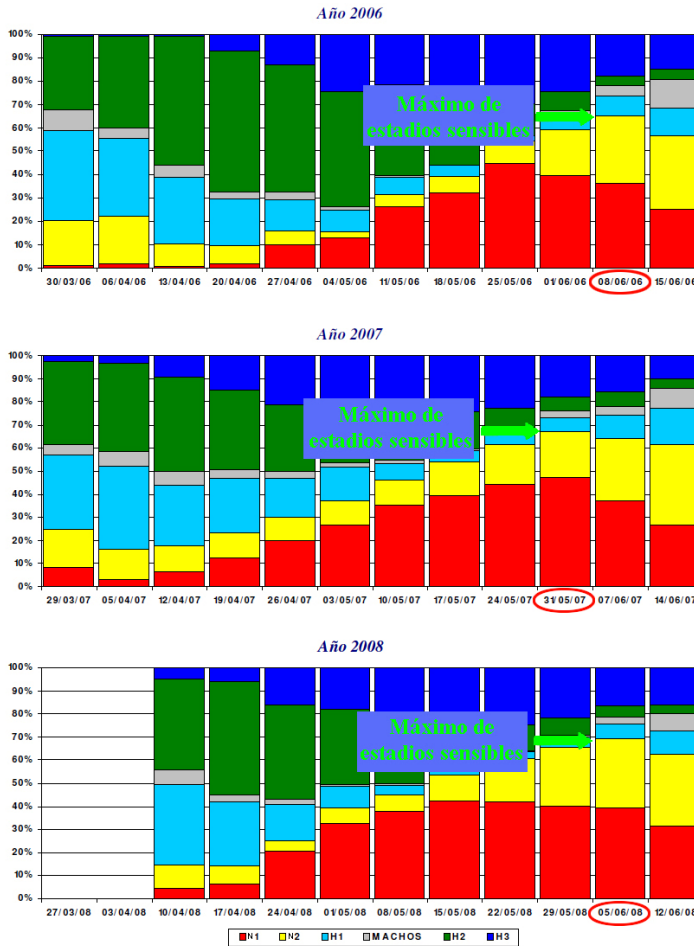


Figura X-8. Evolución de la primera generación de *A. aurantii* en los años 2006/2007/2008 en la Comunidad Valenciana, donde N1= 1ª Fase+Muda I; N2=Hembra de 2ª Fase+Muda II; H1=Hembra de 3ª Fase; H2=Hembra grávida; H3=Hembra con larvas; Machos= Todos los estadios del macho (Fuente: Red de Vigilancia Fitosanitaria de Cítricos de la GVA).

Por último, también es fundamental tener en cuenta el desplazamiento de los insectos de las hojas y ramillas a los frutitos recién cuajados, cómo y cuándo lo hacen (Walker et al., 1990). Según unos autores (Moner-Dualde, 2000) los insectos se sitúan preferentemente debajo del cáliz cuando se empiezan a formar los frutos, y ya allí crecen y se reproducen durante el verano, pasando prácticamente desapercibidos, y en la siguiente generación recubren el fruto. Sin embargo, según otros autores (Rodrigo

et al., 2004) *A. aurantii*, a diferencia de otras cochinillas, no presenta esta preferencia tan acusada por situarse en el cáliz, sino que una vez en el fruto prefiere fijarse en su superficie, que presenta un aumento espectacular de la infestación en la segunda generación de la plaga, procedente de hojas y ramas.

## 5.2 Control de los fenómenos de resistencia

En cuanto a la aparición de resistencias a determinadas sustancias activas que, como ya se ha mencionado, puede provocar el uso continuado de las mismas, existen como ejemplo los casos de Sudáfrica (Georgala, 1975, 1988; Nel et al., 1979; Bedford, 1998a,b), Australia (Abdelrahman, 1973; Smith D. et al., 1997) e Israel (Rosen, 1995), donde algunas poblaciones de piojo rojo de California desarrollaron resistencias a insecticidas organofosforados y carbamatos en la década de los 70. En California aparecieron en los años 90 (Grafton-Cardwell and Vehrs, 1995; Vehrs and Grafton-Cardwell, 1994), haciendo que estos insecticidas de amplio espectro perdiesen su eficacia. En España también se ha estudiado el desarrollo de resistencia a clorpirifos (Martínez-Hervás et al., 2006), aunque lo que se encontró fueron diferencias de sensibilidad al clorpirifos entre parcelas, sin determinar el factor que explicaba estas diferencias. Ello ha obligado a emplear este tipo de productos de manera alternada con aceites minerales para retrasar la aparición de resistencias en zonas donde todavía no se habían detectado, potenciando asimismo el uso del control biológico. En este sentido, estos autores aconsejan el uso de parasitoides (*Aphytis spp.* y *Comperiella spp.*) combinado con el uso de aceites minerales.

El Reglamento de Producción Integrada recomienda, en el caso de realizar tratamientos químicos para el control de las plagas, alternar sustancias activas de distintos grupos químicos y mecanismo de acción, no realizando más de dos tratamientos seguidos con la misma sustancia activa (BOE, 2004).



### **5.3 El control biológico**

En relación al control biológico y al uso de productos alternativos a los insecticidas convencionales, hay que destacar que su importancia radica en que son alternativas que favorecen la seguridad tanto del consumidor como del aplicador, así como la protección del medio ambiente, aspectos a los que cada vez es más sensible la opinión pública.

El control biológico consiste en la utilización de enemigos naturales de la plaga objetivo. El Reglamento de Producción Integrada de la Comunidad Valenciana obliga a anteponer los métodos biológicos, biotécnicos, culturales, físicos y genéticos a los químicos (DOCV, 2008), y la normativa nacional obliga a proteger la fauna auxiliar en general y, en particular, al menos 3 especies cuya protección y aumento de población se consideren prioritarias para cada cultivo (BOE, 2004). Los productos fitosanitarios que se empleen deben ser respetuosos con esta fauna auxiliar.

La importancia del control biológico aumenta si se tiene en cuenta la posibilidad que existe de la eliminación postcosecha de los escudos de piojo rojo de California en cítricos con agua a presión, ya que si el insecto se encuentra parasitado se elimina con mayor facilidad del fruto (Rivero, 1996).

El problema es que el control biológico en muchos casos no es suficiente para mantener las poblaciones por debajo de niveles de daño económico (García-Mari, 1994), aunque aún así es necesario el establecimiento de programas de lucha biológica aún cuando no lleguen a controlar la plaga, ya que pueden mantenerla a unos niveles que permitan un control satisfactorio con productos alternativos a los insecticidas y/o adecuando la lucha química a las nuevas necesidades (Alfaro et al., 2003a).

### **5.4 Productos alternativos: aceites minerales**

Por otro lado, como ya se ha mencionado, como alternativa al uso de plaguicidas también se pueden emplear otros productos, como son los aceites

minerales, que además están recomendados en la normativa de Producción Integrada actual. Estos cobran especial importancia en el control de piojo rojo de California, sobre todo en tratamientos de 2ª y 3ª generación, ya que evitan problemas de residuos y desequilibrios en fauna útil que además pueden afectar a la proliferación de otras plagas (Loia y Viggiani, 1992; Grafton-Cardwell y Gu, 2003).

El empleo de aceites en sanidad vegetal data de finales del siglo pasado, coincidiendo tanto con el desarrollo de la quimioterapia vegetal como con los principios de la industria petroquímica. Desde entonces hasta hoy, mientras que varias generaciones de insecticidas han desaparecido por problemas de resistencias, toxicidad, persistencia en el ambiente, etc., los aceites minerales se han venido utilizando continuamente y eficazmente en la protección de cultivos debido a su baja toxicidad, por tratarse de productos respetuosos con el medio ambiente y por su nula creación de resistencias en los insectos, ya que la acción plaguicida se produce por asfixia, al obturar los poros y tráqueas respiratorias (Sánchez-Baños y Pina-Olmos, 1996).

Los aceites fitosanitarios más frecuentemente utilizados proceden del petróleo; se obtienen mediante la destilación fraccionada del mismo, tras un proceso de purificación (refino), con objeto de ajustar su composición para conseguir simultáneamente un elevado efecto plaguicida y la adecuada tolerancia hacia el cultivo y el entorno (Sánchez-Baños y Pina-Olmos, 1996).

Es importante tener en cuenta que no todos los aceites minerales procedentes del petróleo son adecuados para su uso como plaguicidas, existiendo una clasificación basada en su composición que indica cuáles son los que se pueden emplear en esta aplicación por presentar una adecuada actividad pesticida sin causar problemas de fitotoxicidad. De esta clasificación se desprende que los aceites más apropiados para este uso son aquellos que presentan un número equivalente de carbonos parafínicos entre 20 y 25 ( $nC_{20}$  -  $nC_{25}$ ) y un alto residuo insulfonable, mayor del 92% (Jacques y Kuhlmann, 2002).

En cuanto al tratamiento con aceites se han realizado diversos estudios para determinar las condiciones operativas adecuadas (Grout y Stephen, 1993; Alfaro et al., 2003a; Durbá y García-Marí, 2006), a pesar de lo cual no existen unas directrices claras y específicas que optimicen su forma de aplicación.

## **6 CRÍA DE PIOJO ROJO DE CALIFORNIA EN LABORATORIO**

Para realizar los ensayos de evaluación de la eficacia biológica en laboratorio se mantenía una cría de piojo rojo de California en el Centro de Agroingeniería siguiendo el protocolo desarrollado por la Unidad de Entomología del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Pina, 2006) (Figura X-9).

Según este protocolo, la cría se realiza en cámaras con humedad y temperatura controladas y óptimas para el desarrollo de la plaga (Temperatura  $26^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  y HR  $50\%\pm 5\%$ ) y luz continua. Se utilizan limones procedentes de cultivo ecológico, sin restos de pesticidas, sobre los que se fijan y desarrollan los insectos de cría. Para ello, en primer lugar, los limones limpios y libres de otros insectos, se cubren con una capa de parafina, dejando libre un área de aproximadamente  $16\text{ cm}^2$ , reduciendo así la desecación de los limones (Walker et al., 1991). Estos limones, llamados “limones hijos”, se exponen a otros que presentan una población importante de hembras grávidas y reproductoras, denominados “limones madre”, que están produciendo larvas. Las larvas se fijan al limón limpio en la zona libre de parafina, ya que son incapaces de fijarse sobre ésta. Además, de esta forma la cría se localiza en una zona delimitada de la piel de los limones y no en toda su superficie, facilitando su manejo. Cuando existe una densidad suficientemente grande de población de larvas fijadas se apartan los limones y se deja que los insectos sigan evolucionando. Cuando alcanzan el estadio de hembras grávidas estos limones son nuevos limones madre. A estos se exponen otros limones limpios, comenzando de nuevo el ciclo. Un limón madre puede ser productivo durante 1 mes aproximadamente, pudiendo infestar 5-6 limones hijos durante ese periodo.

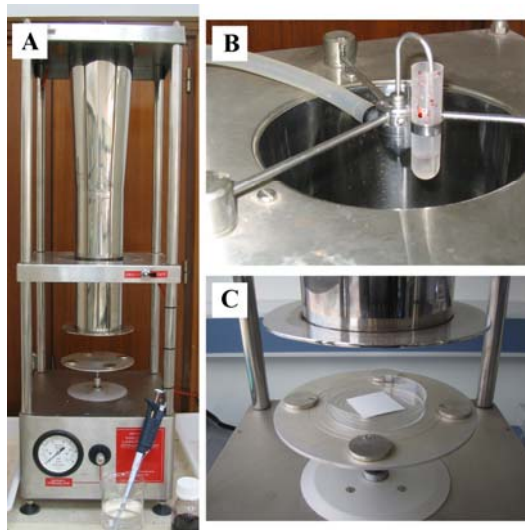


*Figura X-9. Limones de la cría infestados con Aonidiella aurantii.*

## ANEJO 2 TORRE DE PULVERIZACIÓN DE POTTER

### 1 INTRODUCCIÓN

La torre de pulverización de precisión de Potter (Burkard Scientific Co., Uxbridge, Reino Unido) (Potter, 1952) se emplea habitualmente para estudiar la eficacia de productos químicos en el control de plagas a nivel de laboratorio. Consta de un cilindro sobre el que se encuentra la boquilla de acero inoxidable y un pequeño depósito, en el que se coloca el líquido a pulverizar. Cuenta en su parte inferior con una plataforma en la que se dispone la muestra sobre la que se aplica el producto. La pulverización se produce por medios neumáticos y tiene un sistema para controlar la presión, que puede variar de 0 a 2 bar (Figura X-10).



*Figura X-10. Torre de pulverización de Potter: A) Vista general; B) Boquilla y depósito de caldo; C) Plataforma sobre la que se dispone la muestra que recibe la pulverización.*

Se pueden emplear dos tipos de boquillas que vienen diferenciadas como de pulverización intermedia y fina (Tabla X-3). En la Figura X-11 se muestra el esquema de la boquilla de pulverización fina empleada en los ensayos.

Tabla X-3. Características estructurales de las boquillas de la torre de Potter

	Diseño para pulverización Fina (mm)	Diseño para pulverización Intermedia (mm)
Diámetro interno de la salida de líquido	0.762	0.698
Diámetro externo de la salida de líquido	1.27	1
Orificio de la cámara de aire (diámetro)	1.422	1.613
Longitud del venturi	1.27	Filo de un cuchillo

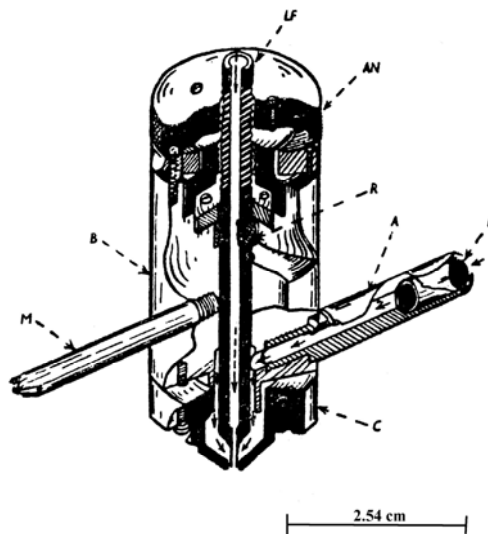


Figura X-11. Diseño original de la boquilla de pulverización fina (A, entrada de aire; F, filtro del aire; C, cámara de aire; LF, entrada del líquido; AN, tuerca de ajuste; R, prensaestopas de caucho; M, varilla de sujeción; B, cuerpo de la boquilla) (Fuente: Potter, 1952. Copyright

© 2008, John Wiley and Sons)

Hay que tener en cuenta, que aunque el tipo de boquilla y presión son distintos de los utilizados en condiciones de campo, el sistema proporciona una pulverización homogénea y reproducible, y se obtienen valores de recubrimiento comparables a los obtenidos sobre el cultivo

## **2 MÉTODO DE CALIBRACIÓN: PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN**

En experimentos anteriores realizados con la torre de Potter se comprobó que una parte del volumen de caldo que se coloca en el depósito no llega al objetivo, perdiéndose en su trayecto hacia la plataforma por evaporación debida al pequeño tamaño de las gotas, o por adherirse a las paredes del cilindro, dada la propia conformación de la torre.

Se realizó un ensayo para estimar la cantidad de caldo que realmente alcanza el objetivo y así calcular el volumen de caldo depositado por unidad de superficie ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ), evaluando además si el porcentaje de caldo recuperado depende del volumen total aplicado. Ya que la evaporación es una posible causa de la pérdida de caldo también se ha estudiado la influencia de las condiciones ambientales (humedad relativa, temperatura o presión atmosférica).

### **2.1 Metodología**

#### **2.1.1 Obtención del porcentaje de recuperación**

Se pulverizaron cinco volúmenes de agua (500, 1000, 2000, 3000 y 4000  $\mu\text{l}$ ) sobre placas Petri de superficie conocida ( $63 \text{ cm}^2$ ). Se pesaron las placas Petri antes y después de la aplicación (Balanza Analítica XR 205 SM-DR, Precisa Instruments Ltd., Dietikon, Suiza). Posteriormente se calculó el porcentaje que esta cantidad representaba frente al total pulverizado, es decir, el porcentaje de recuperación, así como el aumento de peso medio producido por la deposición de las gotas de caldo por unidad de superficie ( $\mu\text{g caldo}/\text{cm}^2$ ) y con ello, el volumen de caldo depositado por unidad de superficie ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ). Cada día en que se utilizó la torre de Potter para realizar un ensayo de caracterización de la pulverización y/o un ensayo de eficacia, se realizaron cinco repeticiones de cada volumen ensayado. Cada día de ensayo se tomaron los valores de humedad relativa, temperatura y presión atmosférica.

En todos los experimentos las condiciones operativas de la torre de Potter fueron las mismas que las empleadas en todos los ensayos de caracterización de la pulverización y los ensayos de eficacia, es decir:

- Presión de trabajo: 1 bar
- Boquilla de pulverización: 0.762 mm

### 2.1.2 Análisis de datos

La herramienta estadística que se ha empleado para analizar los datos del porcentaje de recuperación y  $\mu\text{g}$  caldo/ $\text{cm}^2$  ha sido el Análisis de la Varianza (ANOVA), en su versión unifactorial. La hipótesis de normalidad se ha evaluado mediante el test de Shapiro-Wilks (Shapiro y Wilk, 1965) sobre los residuos de los modelos y la hipótesis de homocedasticidad mediante el test de Levene (Levene, 1960). Todos los test se han realizado para un nivel de confianza del 95%. Para la comparación de medias se ha empleado el test de Tukey (Tukey, 1949).

Para evaluar la influencia de los diferentes parámetros ambientales (humedad relativa, temperatura y presión atmosférica) se ha realizado un análisis de regresión.

## 2.2 Resultados y discusión

Es muy importante señalar que los valores de porcentaje de caldo recuperado obtenidos son muy pequeños, variando entre un 4.8% y un 7.8%. El factor volumen resulta estadísticamente significativo para el porcentaje de caldo recuperado, ya que como se observa en la Figura X-12 existen diferencias significativas entre el volumen más bajo (500  $\mu\text{l}$ ) y los más altos, aunque a partir de los 1000  $\mu\text{l}$  no hay diferencias significativas entre los volúmenes, estando la media de recuperación de caldo alrededor de 6.5%.



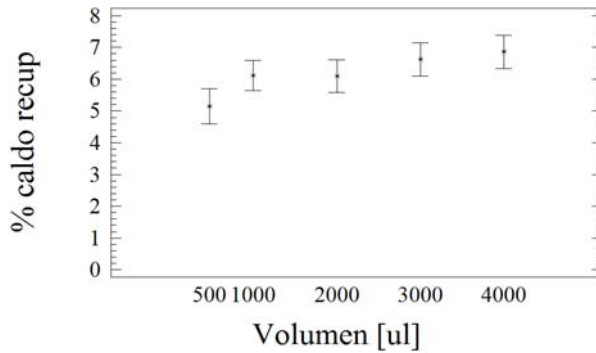


Figura X-12. Intervalos HSD de Tukey para el porcentaje de recuperación.

Si se considera la dosis de caldo que efectivamente se depositará posteriormente sobre la base de la torre de Potter, en la Figura X-13 se observa que existe una relación lineal con el volumen de caldo total pulverizado.

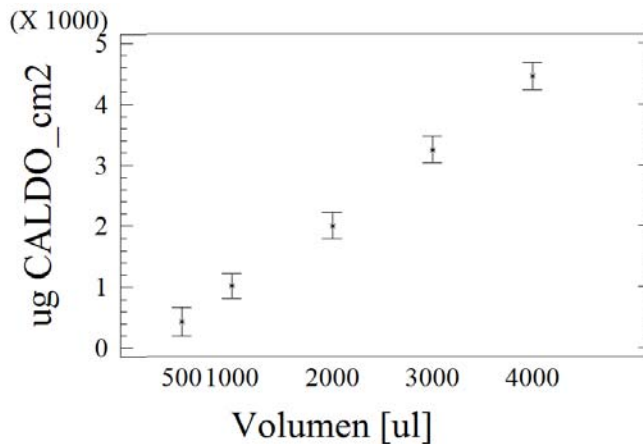


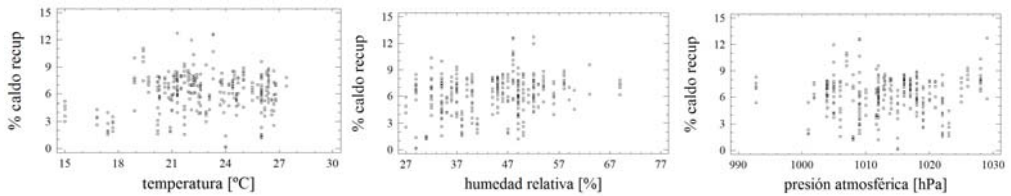
Figura X-13. Intervalos HSD de Tukey para  $\mu\text{g caldo}/\text{cm}^2$ .

Al observar esta tendencia se ha realizado un análisis de regresión. En el análisis los datos han obtenido el mejor ajuste con un modelo lineal ( $p\text{-valor} < 0.0001$ ; g.l.: 1, 360; N° de datos: 361), obteniendo la Ecuación X-1:

$$\mu\text{g CALDO}/\text{cm}^2 = 1.103 (\pm 0.029) * \text{Volumen } [\mu\text{l}] - 95.722 (\pm 67.282) \quad \text{X-1}$$

El modelo presenta un  $R^2$  de 80%, y un error estándar de los residuos de 780.371.

Al analizar la influencia de los parámetros ambientales (Figura X-14) se observa que únicamente la temperatura parece tener una cierta influencia sobre el porcentaje de caldo recuperado, ya que con temperaturas menores de 18°C parece que disminuye el porcentaje de caldo recuperado. Pero su influencia es desestimable, y además, al ajustar los datos por regresión lineal, ningún modelo consigue explicar más de un 2.1% de la variabilidad de los datos, y al ajustarlos a un modelo lineal la pendiente no es significativa (p-valor= 0.086).



*Figura X-14. % de caldo recuperado vs temperatura (°C); humedad relativa (%); presión atmosférica (hPa).*

# **ANEJO 3                      RELATIONSHIP                      BETWEEN COLLECTORS: CONVERSION OF COVERAGE DATA BETWEEN FIELD AND LABORATORY TRIALS**

## **1                      INTRODUCTION**

The goal of a pesticide treatment is to locate adequately the correct amount of active ingredient (a.i.) on the vegetation in the safest and cheapest way (Hislop, 1987). Quality and effectiveness of agrochemical applications in the field have been commonly assessed either from the study of the biological efficacy achieved with the treatment or from the study of deposit and coverage of the spray on the surface of the crop. These two approaches may be complementary.

On the one hand, biological efficacy assessment is aimed at providing information about the reduction of population or increase of mortality achieved on the target pest. Although it may appear as a definitive way of assessing the effectiveness of a treatment, it does not take into account if an optimal distribution of the pesticide has been achieved, therefore, biological efficacy alone does not express if the spray has been distributed homogeneously and it does not inform about overdosing and off target losses. Moreover, biological efficacy experiments are very costly, time consuming and require large field surfaces that sometimes are not available for experimentation due to the risks derived from inadequate control of the pest. Furthermore, these experiments are influenced by important biological (i.e. population level of beneficial arthropods), and meteorological uncontrolled factors.

On the other hand, the distribution of active ingredient deposits on the plants has a paramount influence on the biological effect of the application. It is commonly accepted that, in most part of field treatments, a large amount of badly distributed deposits has much lower control efficacy than a lower amount of deposits distributed homogeneously on the affected areas of the vegetation (Frick, 1970). A field pesticide

treatment has the potential of generating different patterns of deposition (Ebert and Downer, 2006) and for this reason, once a deposition pattern has been generated in a particular application, it is necessary to assess its quality in terms of predicted efficacy against the pest and decrease of losses in the environment. Methods based on measuring spray deposits give the amount of solution deposited per unit area (leaf, m<sup>2</sup>) by means of chemical analysis of tracers such as foliar fertilizers, chelated metals, and even some pesticides, or using optical instruments for determination of fluorescent dyes (Sharp, 1955; Salyani and Whitney, 1988; Huijsmans et al., 1993; Doruchowski, unpublished data, 1995; Hołownicki et al., 1996). These methods usually include data on the dispersion of deposition, which may be related to the homogeneity of the deposition within the crop canopy, without offering data on the effect of the treatment on the pest populations. However, the estimation of the amount of spray deposited per unit area by itself does not tell much about the spray distribution uniformity on the leaves and does not determine if overdosing occurred. This information could be obtained from image analysis of droplet distributions on leaves (Jiang and Derksen, 1995; Cross et al., 1997) or artificial targets (Hołownicki et al., 1996; Val et al., 1996), allowing a deeper description of how the spray reached the plants. However, image analysis is very difficult to carry out for the growers in practical field situations. Furthermore, natural leaves are not an adequate droplet collector, since they are not completely flat and could cause errors in the measurements, and it is very difficult to generate a great contrast between the spray and the leaves. Water-sensitive papers (WSP) are very common artificial targets used in the field because they offer a relatively easy technique to visually estimate spray distribution in field experiments (Fox et al., 2003). The disadvantage of WSP is that it hardly represents different plant surfaces in terms of their retention characteristics (Hołownicki et al., 2002).

PVC collectors have been used as artificial targets by researchers to simulate citrus leaf behavior (Val et al. 1996; Vidal et al. 2003; Chueca et al., 2010; Garcerá et al., 2011) because this type of collector does not show statistical significant

differences in percentage of coverage, number of impacts per square centimeter and mean size of the impacts when compared to citrus leaves (Mercader et al., 1995). Despite this advantage, PVC collectors are very difficult to handle in the field, because droplets formed on their surface easily slip. For this reason their use is often restricted to bioassays under laboratory conditions. However these results are difficult to export to ordinary work in the field in order to predict the biological efficacy of a treatment based on the observed deposition of the spray on WSP.

Main parameters extracted with image analysis to describe spray quality are coverage, number of droplets per surface area and average size of droplets. Coverage, which is the percent of surface covered by droplets, is the most accurate parameter that can be calculated with this technique (Salyani and Fox, 1999). Moreover, when drops overlap, it is the only feature that is worth analyzing (Hołownicki et al., 2002).

For these reasons, the aim of this work is to generate models to relate the coverage observed on PVC targets with the one observed on WSP, using different commercial pesticides that are commonly employed in citrus orchards. The final goal will be to use coverage data obtained on WSP in the field to predict the biological efficacy of actual field treatments, based on data obtained from laboratory bioassays in which PVC collectors are used.

## **2 MATERIALS AND METHODS**

An experiment was carried out to find out the relationship between the coverage obtained onto different artificial targets. This trial consisted of spraying a series of volumes between 0.25 and 4 ml of different solutions on PVC collectors and water-sensitive papers (WSP). The highest tested volume was 4 ml because when spraying on PVC targets with higher volumes the droplets coalesced producing a surface of liquid that ran off from the target surface.

PVC collectors consisted of white PVC-sheet 4.5 x 4.5 cm pieces and water-sensitive papers were commercial ones, 7.6 x 2.6 cm (Water-Sensitive Paper, Teejet).

When spraying the PVC targets, 2% of chelated iron (Sequestrene 138 Fe G-100, Syngenta Agro S.A., Madrid, Spain) was added as a dye to produce sufficient drop/background contrast for subsequent image analysis.

These applications were made with a Potter Spray Tower fitted with its finest nozzle (internal diameter: 0.762 mm) (Burkard Scientific, Uxbridge, United Kingdom) (Potter, 1952). Pressure was fixed at 0.1 MPa.

As explained in Annex 2, the Potter Spray Tower was calibrated before each experiment by a series of tests to estimate the volume of solution deposited per unit area ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) on the base of the tower. The deposited volume with each volume tested to relate PVC and WSP coverage was estimated by means of the developed regression model (Table X-4).

*Table X-4. Deposited volume when spraying water*

Sprayed (ml)	VOLUME	
	Deposited ( $\mu\text{l}$ solution/ $\text{cm}^2$ )	
	Mean	95% Confidence Interval
0.250	0.180	0.058-0.301
0.400	0.345	0.230-0.460
0.500	0.455	0.345-0.566
0.600	0.566	0.459-0.672
0.800	0.786	0.687-0.886
1.000	1.006	0.914-1.100
1.500	1.558	1.476-1.641
2.000	2.109	2.028-2.191
2.500	2.661	2.569-2.752
3.000	3.212	3.104-3.320
4.000	4.315	4.161-4.468

Tests were carried out with different solutions:

- Deionized water
- Two organophosphate insecticides, both used at maximum label concentration:
  - o Dursban® 75 WG (a.i.: chlorpyrifos 75% [WG] p/p) (Dow AgroSciences Ibérica, Madrid, Spain) at 1.25 g/l.

- Reldan® E (a.i.: chlorpyrifos-methyl 22.4% [EC] p/v) (Dow AgroSciences Ibérica, Madrid, Spain) at 4 ml/l.
- An insect growth regulator, used at maximum label concentration: Atominal® 10 EC (a.i.: pyriproxyfen 100 g/l [EC] p/v) (Sumimoto Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan) at 0.75 ml/l.
- Two paraffinic mineral oils, both used at a concentration of 15 ml/l:
  - Laincoil®, a *n*C21 oil with a content of 83% w/v and an unsulfonated residue of 92% (Lainco, Barcelona, Spain).
  - Sunspray Ultrafine®, a *n*C21 with a content of 85% w/v and an unsulfonated residue of 92% (Sun Oil Co., Antwerp, Belgium).
- Mixtures of them:
  - Dursban® 75 WG at 1.25 g/l plus Atominal® 10 EC at 0.75 ml/l.
  - Dursban® 75 WG at 1.25 g/l plus Laincoil® at 10 ml/l.

After spraying the collectors with the corresponding volume and solution, they were photographed and the images analyzed using the methodology described by Chueca et al. (2010). The parameter obtained from the image analysis software (Matrox Inspector, version 2.2, Matrox™, Dorval, Canada) was the estimated coverage for each collector, expressed as percentage of area occupied by the impinging droplets against the total area (%).

Once the coverage with both collectors had been obtained, regressions to adjust some functions were carried out, in order to select the function that better fitted the relationship between coverage obtained with each collector, using percentage of coverage on PVC as explanatory variable.

Selection of functions to be tested was based on the observation of the data. Raw data was first plotted and then some functions that seemed appropriate for the adjustment were sought.

After preliminary data observation, some questions were taken into account to decide the functions that were going to be tested:

- Data seemed to follow a sigmoid or hyperbolic distribution.
- Function had to go through the origin, since if 0  $\mu\text{l}$  were sprayed, 0% coverage would have been obtained on both collectors.
- Function had to be asymptotic to 100% when values of coverage on PVC were  $\leq 100\%$ .

To adjust each function to the data, Excel Solver tool (Frontline Systems Inc., Microsoft® Office Excel 2007) was used. This tool finds the optimal value for a function, called objective function, changing the value of the decision variables, direct or indirectly related to the objective function.

In this work, the objective function was the summation of quadratic differences between raw coverage values on WSP and values calculated by means of some functions which have PVC coverage as explanatory variable. The goal was to minimize the summation, changing the values of the independent parameters in the different formulas. Constraints consisted in limiting the values of calculated coverage to a maximum of 100%.

Once the functions were adjusted, goodness-of-fit ( $R^2$ ) of each one was calculated, selecting the function with the best adjustment. To evaluate the goodness-of-fit of each function, after model residues were calculated, Shapiro-Wilk's normality test (Shapiro and Wilk, 1965) was applied to analyze them. Residues were calculated as differences between observed data of the dependent variable, coverage on WSP, and their predicted values for the corresponding coverage on PVC.

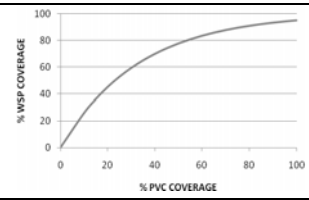
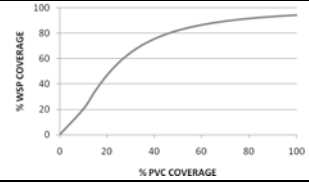
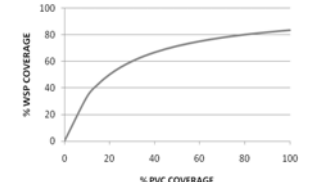
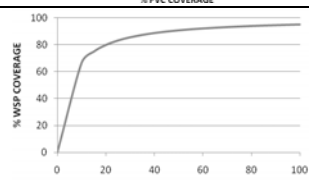
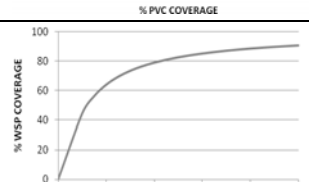
This methodology was followed with all the tested solutions, finally selecting the function that better fitted most of them. Differences among solutions were analyzed by plotting the corresponding functions and studying the differences among the independent parameter/s of the selected function.



### 3 RESULTS AND DISCUSSION

After preliminary data observation and based on the assumptions for the functions described in the methodology, tested functions were those shown in Table X-5.

Table X-5. Tested functions

FUNCTION	FORMULA	EXAMPLE
1	$y = 102 * (1 - e^{-ax})$	
2.1	$y = 100 \left( \frac{x^a}{x^a + b} \right)$	
2.2	$y = 100 \left( \frac{x^a}{x^a + b} \right); a \leq 1$	
3	$y = \frac{100x}{b + x}$	
4	$y = 100 \left( \frac{x}{b + x} \right)^c$	

Goodness-of-fit ( $R^2$ ) obtained for each function are shown in Table X-6. Higher values of  $R^2$  were obtained with functions 1 and 2.1, so these were selected.

Table X-6. Goodness-of-fit of the different functions ( $R^2$ )

PRODUCT	FUNCTION				
	1	2.1	2.2	3	4
Water	0.875*	0.865	0.837	0.837	0.847
Dursban® 75 WG	0.906*	0.905	0.854	0.855	0.866
Reldan® E	0.810	0.842*	0.753	0.753	0.772
Atominal® 10 EC	0.824*	0.814	0.774	0.775	0.777
Laincoil®	0.886*	0.878	0.845	0.838	0.843
Sunspray Ultrafine®	0.980	0.983*	0.931	0.930	0.962
Dursban® 75 WG+Atominal® 10 EC	0.887	0.933*	0.838	0.838	0.848
Dursban® 75+Laincoil®	0.861*	0.848	0.827	0.827	0.836

\*Highest  $R^2$  observed for each product

The p-values of Shapiro-Wilk's test over the residues of functions 1 and 2.1 are shown in Table X-7. Those adjustments with p-values higher than 0.1 were assumed to have a normal distribution of the residues, with a confidence level of 90% or higher. Every p-value of function 1 was higher than 0.1, and with function 2.1 it happened only for two solutions: Sunspray Ultrafine® and the mix of Dursban® 75 WG + Laincoil®.

Table X-7. P-value of Shapiro-Wilk's test over the residues of functions 1 and 2.1

SOLUTION	FUNCTION	
	1	2.1
Water	0.662*	0.039
Dursban® 75 WG	0.586*	0.035
Reldan® E	0.386*	0.019
Atominal® 10 EC	0.101*	0.018
Laincoil®	0.331*	0.004
Sunspray Ultrafine®	0.671*	0.121*
Dursban® 75 WG+Atominal® 10 EC	0.307*	0.010
Dursban® 75 WG+Laincoil®	0.288*	0.112*

\* p-value > 0.1

In conclusion, function with both higher goodness-of-fit and normality of residues was function 1. So the Equation X-2 allows the best estimation of coverage that would be obtained with a certain volume on WSP, knowing the corresponding coverage on PVC.

$$\text{Coverage WSP (\%)} = 102 * (1 - e^{-a * \% \text{ Coverage PVC}})$$

X-2

When optimizing the function for each solution, different values for the parameter “a” were obtained (Table X-8). This parameter is related to the “speed” of the data to reach the asymptotic point, that is to say, the slope of the initial segment of the curve. The higher the “a” value, the higher the initial slope and the lower the volume of the corresponding solution necessary to saturate WSP.

Table X-8. “a” value for each solution

SOLUTION	a
Water	0.032
Dursban® 75 WG	0.027
Reldan® E	0.025
Atominal® 10 EC	0.026
Laincoil®	0.030
Sunspray Ultrafine®	0.041
Dursban® 75 WG+Atominal® 10 EC	0.033
Dursban® 75 WG+Laincoil®	0.034

Raw water, without any product, had a medium value of “a”. A series of products obtained lower values, in increasing order of “a”, these were Reldan® E, Atominal® 10 EC, Dursban® 75 WG and Laincoil®, that is to say, these products needed a volume higher than water needed to saturate WSP. Another series of products obtained higher values of “a”, most likely due to the action of tensoactive agents and other substances in their formulations, these solutions were the mixings of Dursban® 75 WG with Atominal® 10 EC and Laincoil®, and Sunspray Ultrafine®, that was the product with highest value of “a”, thus indicating that with a lower volume of this solution WSP collector is already saturated, that is to say, that Sunspray Ultrafine® solution spread better in this medium. These differences may also be observed in Figure X-15.

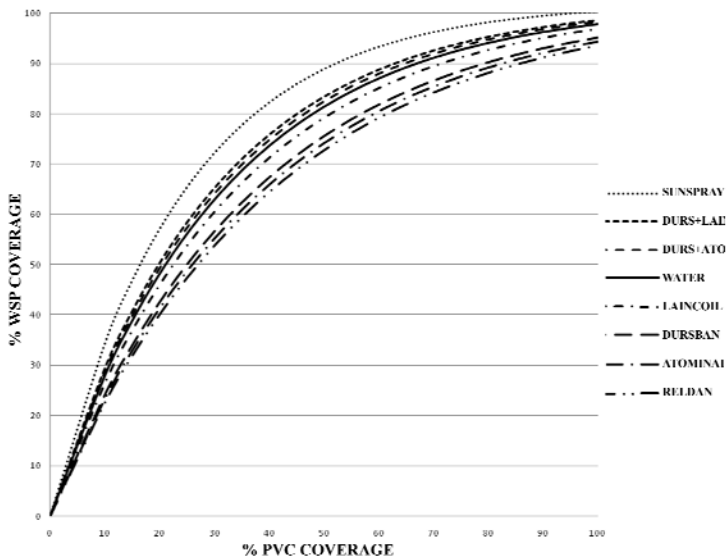


Figure X-15. Function plot for each tested solution.

A maximum difference in the coverage on WSP of 18% was obtained between Sunspray Ultrafine®, the product that better spread on WSP, and Reldan® E. It stood out that between the two mineral oils differences of up to 12% were obtained and the mixings of Dursban® 75 WG could increase the WSP coverage up to an 8%.

Furthermore, since the deposited volume per unit area is known (Table X-4), it is possible to estimate the corresponding deposition of product for a value of coverage on PVC and, by means of the function, its equivalent on WSP, provided that it didn't get saturated. That is to say, if the same solutions tested in this work were sprayed, it would be possible to estimate the deposition after assessing the coverage on WSP. Nansen et al. (2010) also proposed using the analysis of spraying on WSP to estimate the deposit, but based on the intensity of blue color. The drawback of this method is that it depends on the lighting system and the tool used to digitize the WSP collector.

Once defined in the laboratory the relationship between coverage on PVC and efficacy, the function obtained in this work could be used in two senses. First, it could be used to evaluate the coverage necessary to be reached in field conditions to obtain a certain efficacy in ideal conditions (without taking into account the influence of out-of-control factors in real applications such as meteorological conditions, the resistance of the pest to the applied product, the lack of coverage uniformity on the tree canopy, etc.). Moreover, following the same methodology, it would be possible to define the coverage on WSP from which it would be considered excessive. Secondly, this work would be applicable once the product had been applied on the field and certain coverage on WSP had been obtained. It could be used to estimate coverage in PVC collectors and with this data to estimate the goodness of the applications in terms of efficacy that could be obtained, again without forgetting every factor in the field that does not exist in the lab. In this sense, it is important to remember that, provided that the function depends on the product, the same coverage on WSP obtained with different products, would result in different values of coverage on PVC, and so on, different values of efficacy. Using the function for this aim has a restriction given by the own limitation of WSP, since when saturated collectors appeared, as a result of being an asymptotic function, coverage on PVC cannot be exactly estimated. So, the function is useful only when WSP is not saturated.

#### **4 CONCLUSIONS**

A function was obtained to relate coverage on WSP, commonly used in field treatments to evaluate the quality of spraying, and coverage on PVC, employed in laboratory to carry out bioassays to study the relationship between efficacy and coverage. It was observed that this function depended on the solution, in such a way that for a certain value of coverage on PVC different values of coverage on WSP were obtained, differences that could reach an 18%.



centro de  
agroingeniería

