



Evaluación de los efectos de insecticidas sobre dos arañas lobo presentes en cultivos de soja de Uruguay

Mag. Mariángeles Lacava

**Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas
(PEDECIBA)**

**Facultad de Ciencias
Universidad de la República
Montevideo, Uruguay**

2021

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE LA TESIS

Dr, Miguel Simó

Dra. Ana Verdi

Dra. Alda González

ORIENTADORES

Orientadora Dra. Carmen Viera

Orientador Dr.Marco A. Benamú

A mi familia y amigos

A mi compañero de vida Luis Fernando

A mi orientadora y amiga Carmen Viera

Índice

Agradecimientos.....	5
Publicaciones.....	6
Resumen.....	8
Introducción general.....	9
Capítulo 1.....	13
Introducción.....	13
Materiales y métodos.....	15
Resultados.....	19
Discusión.....	25
Capítulo 2.....	28
Introducción.....	28
Materiales y métodos.....	31
Resultados.....	36
Discusión.....	55
Discusión General	60
Bibliografía.....	63

Agradecimientos

A mis orientadores Carmen Viera y Marco Benamú, por brindarme todo su apoyo durante la realización de la tesis

A los evaluadores de la tesis Miguel Simó, Ana Verdi y Alda Gonzalez

A Jordi Moya-Laraño y Luis Fernando García, por brindarme su apoyo durante la realización de mi tesis

A Maria Laura Lavaggi, Isabel Volz y Fernando García, por su colaboración en la realización del análisis enzimático

A Quentin Geissmann por atender mis dudas durante la realización del análisis de actividad

A Viviana Franco, Santiago Turcatti y Erika Nuñez, por su colaboración en diferentes momentos de la realización de la tesis

A Juan Zufiria y Gonzalo Desimone por su colaboración en las salidas de campo

A Mario Clara, por brindarme todo el respaldo para la realización de mi tesis

Al equipo de Ecología del Comportamiento del IIBCE, por sus contribuciones a la tesis

Al CENUR Noreste por brindarme espacio para la realización de mi tesis

A la ANII y CSIC por la financiación de la tesis.

Publicaciones derivadas de la tesis

- Lacava, M., Garcia, L.F., Burla, J.P., Tambasco, R., Franco, V., Viera, C., 2020. Abundancia y fenología de artrópodos depredadores en soja: análisis preliminar. Boletín la Soc. Zoológica del Uruguay 29, 150–159.
- Lacava, M., Garcia, L.F., Castiglioni, E., Benamú, M., Schneider, M.I. & Viera, C., 2020. Effect of selective and non-selective insecticides on survival and feeding behavior of the spiders *Hogna* cf. *bivittata* and *Lycosa poliostrata* (Araneae: Lycosidae). Journal of arachnology 48(3), 288–294.

Publicaciones relacionadas con la tesis

- Lacava, M., García, L. F., Viera, C., & Michalko, R. (2021). The pest-specific effects of glyphosate on functional response of a wolf spider. *Chemosphere*, 262, 127785.
- Benamú, M., Lacava, M., García, L. F., Santana, M., Fang, J., Wang, X., & Blamires, S. J. (2017). Nanostructural and mechanical property changes to spider silk as a consequence of insecticide exposure. *Chemosphere*, 181, 241-249.
- Benamú, M. A., Lacava, M., García, L. F., Santana, M., & Viera, C. (2017). Spiders associated with agroecosystems: roles and perspectives. In *Behaviour and ecology of spiders* (pp. 275-302). Springer, Cham.

Otras publicaciones

- Willemart, R. H., & Lacava, M. (2017). Foraging strategies of cursorial and ambush spiders. In *Behaviour and Ecology of Spiders* (pp. 227-245). Springer, Cham.
- Viera, C., Garcia, L. F., Lacava, M., Fang, J., Wang, X., Kasumovic, M. M., & Blamires, S. J. (2019). Silk physico-chemical variability and mechanical robustness facilitates intercontinental invasibility of a spider. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- Lacava, M., Camargo, A., Garcia, L. F., Benamú, M. A., Santana, M., Fang, J., & Blamires, S. J. (2018). Web building and silk properties functionally covary among species of wolf spider. *Journal of evolutionary biology*, 31(7), 968-978.

Henriques, J. F., Lacava, M., Guzmán, C., Gavín-Centol, M. P., Ruiz-Lupión, D., De Mas, E. & Moya-Laraño, J. (2021). The sources of variation for individual prey-to-predator size ratios. *Heredity*, 1-11.

Benamu, M., García, L. F., Viera, C., Lacava, M., & Korenko, S. (2020). Koinobint life style of the spider wasp *Minagenia* (Hymenoptera, Pompilidae) and its consequences for host selection and sex allocation. *Zoology*, 140, 125797.

Presentaciones en eventos derivados de esta tesis

Lacava, M., Garcia, L.F., Michalko, R., Schneider, M.I., Benamú, M., & Viera, C. 2020 Evaluación de algunos agroquímicos sobre arañas lobo presentes en cultivos de soja del Uruguay. VI Congreso Latinoamericano de Aracnología. Buenos Aires, Argentina.

Lacava, M., Garcia, L.F., Franco, V., Nuñez, E., Turcatti, S., Benamú, M., & Viera, C. 2019. Efecto de los insecticidas en la movilidad de la araña lobo *Hogna* cf. *bivitatta*. XL Congreso Nacional de Entomología. Concepción, Chile.

Lacava, M., Benamú, M., Garcia, & Viera, C. 2017 Las arañas lobo en agroecosistemas : posible aplicación como enemigos naturales y efectos subletales de los agroquímicos. Simposio. V Congreso Latinoamericano de Aracnología. Minas Gerais, Brasil.

Lavaggi, M.L., Garcia, L.F., Lacava, M., Benamú, M. 2016. Glutathion S-Transferasa como bioindicador de detoxificación de agroquímicos en artrópodos. Congreso Uruguayo de Zoología. Maldonado, Uruguay

Lacava, M., Garcia, L.F., Viera, C., Castiglioni, E. & Benamú, M. 2016. Efectos letales y subletales de insecticidas selectivos y no selectivos utilizados en el cultivo de soja, sobre la araña lobo *Lycosa bivitatta*. Congreso Uruguayo de Zoología. Maldonado, Uruguay

RESUMEN

El uso de insecticidas para el control de insectos plagas es una práctica que viene extendiéndose de manera exponencial en Uruguay. A pesar de que se ha sugerido que este tipo de manejo de plagas puede tener efectos nocivos sobre la fauna local, son pocos los estudios que han evaluado este fenómeno, particularmente sobre la fauna nativa de Uruguay. En el presente trabajo se evaluaron efectos letales y subletales de un insecticida de amplio espectro para control de hemípteros en soja (tiametoxam+lambdacialotrina) y un insecticida selectivo para control de larvas de lepidópteros (metoxifenocida) sobre dos arañas lobo presentes en soja, *Hogna* cf. *bivittata* y *Lycosa poliostrata* (Koch, 1847).

En el primer capítulo se calcularon las concentraciones (CL_{50}) de cada insecticida sobre ambas especies de arañas, mediante bioensayos ecotoxicológicos en los que se aplicó tópicamente un microlitro del insecticida en diferentes concentraciones y se registraron las tasas de mortalidad a las 24 horas. Se evaluaron los efectos residuales de los dos insecticidas con diferentes concentraciones sobre la supervivencia y consumo de presas de *H. cf. bivittata* y *L. poliostrata*. Se trataron hembras adultas de ambas especies de arañas con tiametoxam+lambdacialotrina y metoxifenocida a menores concentraciones de las recomendadas para el campo. Se evaluó la tasa de supervivencia después de 120 horas postratamiento y la tasa de aceptación de presas. Las arañas tratadas con metoxifenocida no mostraron mortalidad en ninguna de las concentraciones evaluadas. Sin embargo, todas las concentraciones de insecticidas de amplio espectro causaron tasas de mortalidad significativamente más altas y una tasa de aceptación más baja en comparación con el insecticida selectivo y el grupo control.

En el segundo capítulo se evaluó el efecto de los insecticidas en la movilidad de las arañas durante 72 horas. Para ello se trataron machos y hembras de ambas especies con ambos insecticidas en tres dosis subletales, se registró la actividad mediante cámaras de seguridad de circuito cerrado durante 72 horas. Se analizaron las variables de desplazamiento total, velocidad, e inactividad mediante el programa Ethovision XT11.5. Se encontraron diferencias en la actividad de las arañas, siendo menor cuando estuvieron expuestas a tiametoxam + lambdacialotrina y más activas cuando estuvieron expuestas a metoxifenocida, en este último grupo la actividad fue mayor a la del grupo control. En el mismo capítulo se evaluó además el efecto de los insecticidas sobre

la actividad de dos enzimas: glutathion s-transferasa, relacionada con procesos de detoxificación y acetilcolinesterasa asociada a funciones del sistema nervioso. Para ello, se trataron tópicamente las arañas con ambos insecticidas, a las 12 horas fueron sacrificadas mediante congelamiento, se extrajeron las enzimas que fueron cuantificadas mediante el método de Bradford. La actividad de la enzima glutathion s-transferasa fue cuantificada mediante ensayos con cloro-dinitrobenzono (CDNB) como un sustrato y con GSH a pH 6.5. Para la enzima acetilcolinesterasa se utilizó el método de Ellman. Se observaron cambios en la actividad enzimática de ambas especies cuando fueron expuestas a los insecticidas, estos cambios dependieron del tipo de insecticida y de la concentración, registrándose para la Glutathion s-Transferasa y la acetilcolinesterasa un efecto de hormensis en ambos insecticidas. Estos resultados indican que ambos insecticidas producen cambios a nivel fisiológico y comportamental en las arañas evaluadas. El insecticida de amplio espectro puede reducir el potencial controlador de algunos enemigos naturales, mientras que metoxifenocida afecta la actividad locomotora de las arañas posiblemente relacionada a procesos de detoxificación.

INTRODUCCION GENERAL

El control biológico es una de las estrategias más empleadas en el control de plagas, es considerado ambientalmente sostenible, presenta un reducido impacto ambiental y favorece la producción de los agroecosistemas (Bouvet *et al.*, 2019; Goldberger & Lehrer, 2016). La mayoría de estudios se han enfocado en control por parasitoides y depredadores, centrándose en depredadores especialistas, debido a que, atacan específicamente algunas plagas (Hewlett *et al.*, 2019, Weber 2020). Algunos estudios incluyen varios grupos de coleópteros especialistas como *Coccinellas eptempunctata* (Linnaeus, 1758) que puede reducir las poblaciones de áfidos (Hewlett *et al.*, 2019) y del coccinélido *Hyperaspis polita* (Weise, 1855) que es un importante controlador de las poblaciones del hemíptero *Phenacoccus solenopsis* (Tinsley, 1898) conocido como cochinilla de algodón (Seyfollahi *et al.*, 2019).

Los depredadores generalistas son un grupo importante en el control biológico de plagas y se usan en programas de control biológico conservativo, reduciendo las poblaciones de algunas plagas de interés en los cultivos, causando además, una disminución en el consumo de plantas por parte de insectos fitófagos (Michalko *et al.*, 2019). Al comparar la eficiencia de los depredadores generalistas y especialistas, se ha demostrado que algunas arañas consumen mayor proporción de plagas en cultivos, comparando con otros artrópodos especialistas (Gajski & Pekár, 2021). Las arañas lobo son arañas muy abundantes en cultivos (Armendano & González, 2010; Benamú *et al.*, 2017b; Lacava *et al.*, 2020) presentan una amplia variedad de estrategias de captura, que les permiten consumir una amplia gama de presas con morfologías y comportamiento antipredadores como grillos, larvas y adultos de lepidópteros, coleópteros y hormigas, siendo estas presas de importancia económica en cultivos (García *et al.*, 2021; Lacava *et al.*, 2021; Ishijima *et al.*, 2006; Marc & Canard, 1997; Rovner, 1980). *Lycosa thorelli* (Keyserling, 1877) es capaz de consumir chinches (*Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837)) y larvas del género *Spodoptera*. *Lycosa* cf. *bivitatta* puede consumir hormigas cortadoras de hojas del género *Acromyrmex* y larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818), consideradas plagas de distinta importancia en cultivos de soja (García *et al.*, 2021; Lacava *et al.*, 2021). Todo lo anterior indica que se debe tener en cuenta la utilización de fauna nativa para el control de plagas cultivos, por ello es fundamental conocer como las prácticas agrícolas que modifican el ambiente, afectan a este grupo de depredadores.

Para el control de plagas se liberan plaguicidas en los agroecosistemas, particularmente en monocultivos, donde controlan de manera efectiva una amplia variedad de plagas y enfermedades, pero producen efectos adversos en los ecosistemas y por lo tanto son también conocidos como ecotóxicos (Connell *et al.*, 2009). Los ecotóxicos afectan de manera diferencial a distintos grupos, considerando que pueden transformar el ambiente afectando negativamente diferentes niveles de organización biológica (Pekár, 2012, 2013). También afectan la composición de las comunidades de artrópodos presentes en agroecosistemas, la fisiología de los organismos y en consecuencia su comportamiento, lo cual incide de manera directa en su potencial como agentes controladores (Markó *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2007). MacFayden *et al.* (2011) plantearon que la disminución de la biodiversidad restringe el potencial controlador de los enemigos naturales porque reducen las interacciones entre predadores y presas, permitiendo que las poblaciones de insectos plaga aumenten con mayor velocidad. A pesar de lo anterior, el volumen de información que existe en Latinoamérica acerca del efecto de los pesticidas sobre la fauna benéfica nativa, es aún escasa. Existen trabajos que demuestran que algunos depredadores y parasitoides se ven afectados negativamente por los manejos de ciertos cultivos que actualmente representan una marcada importancia en la región, como la soja (Altieri & Nicholls, 2002; Bueno *et al.*, 2017a).

Las arañas son afectadas negativamente por distintos agroquímicos como herbicidas e insecticidas (Benamú *et al.*, 2010; Lacava *et al.*, 2021; Schneider *et al.*, 2009). Varios comportamientos, como el de captura, son afectados por los insecticidas. Se incluye dentro de los aspectos afectados, la expresión de personalidad comprobada en *Eris militaris* (Henz, 1845) (Salticidae) (Royauté *et al.*, 2015). En la región, algunos estudios han indicado que los insecticidas como el tiametoxam + lambdacialotrina y herbicidas como el glifosato, afectan el comportamiento constructor y las propiedades de seda de las arañas reduciendo su capacidad predatora (Benamú *et al.*, 2010 a; Benamú *et al.*, 2017 b). De manera similar, se ha encontrado que el herbicida glifosato reduce la tasa de alimentación en arañas lobo (Lacava *et al.*, 2021). El movimiento en las arañas también se ve afectado por los insecticidas (Baatrup & Bayley, 1993; Pekár & Beneš, 2008; Pekár & Haddad, 2005), en algunos casos se observa además que estos cambios también causan efectos negativos en el consumo de presas, como fue registrado en la especie *Pardosa amentata* (Clerck, 1757) expuesta a cipermetrina (Shaw *et al.*, 2006).

A nivel fisiológico, los insecticidas tienen también efectos negativos sobre las arañas, que pueden evidenciarse mediante los cambios en la actividad enzimática. Por ejemplo, se ha encontrado que *Polybetes pythagoricus* (Holmberg, 1875) expuesta al piretroides cipermetrina aumenta las actividades de enzimas relacionadas a la detoxificación, glutatión s-transferasa, glutatión reductasa y catalasa (Laino & García, 2020) y en *Neoscona theisi* (Walckenaer, 1841) en las enzimas carboxilesterasa y acetilcolinesterasa (Tahir *et al.*, 2019). Los organofosforados también producen efectos negativos similares en las actividades enzimáticas (Pedersen *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2010; Van Erp *et al.*, 2002). Pese a lo avanzado de los estudios, se requiere profundizar más aspectos fisiológicos y comportamentales en arañas de la región.

Considerando esta necesidad el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los insecticidas en la supervivencia, alimentación y ritmos de actividad, utilizando como modelos dos especies de arañas lobo frecuentes en cultivos de soja del Uruguay. El presente trabajo vincula la evidencia comportamental con la fisiológica, mediante el análisis de la cinética enzimática de las arañas evaluadas ante distintos insecticidas. La tesis se divide en dos capítulos, en el primero se evalúa el efecto de insecticidas sobre la supervivencia y alimentación, mientras que el segundo analiza el efecto de insecticidas sobre la actividad locomotora diaria y la cinética enzimática. Ambos objetivos se enmarcan en el área de ecotoxicología de arañas, desde una perspectiva multidisciplinaria.

CAPÍTULO I

EFFECTO DE INSECTICIDAS SELECTIVOS Y NO SELECTIVOS SOBRE LA SUPERVIVENCIA Y LA DEPREDACIÓN DE *HOGNA CF. BIVITATTA* Y *LYCOSA POLIOSTOMA* (ARANEAE, LYCOSIDAE)

INTRODUCCIÓN

Las arañas son uno de los grupos de enemigos naturales con alta presencia en los agroecosistemas, siendo potencialmente útiles como organismos benéficos (Sunderland & Samu, 2000; Riechert & Lockley, 1984; Nyffeler & Sunderland, 2003). Su papel como organismos de control biológico contra plagas locales ha sido poco explorado en Sudamérica (Avalos *et al.*, 2013; Benamu & Aguilar, 2001; Benamú, 2010; González *et al.*, 2009). Las arañas lobo, dentro del grupo de arañas cursoriales, son dominantes en varios cultivos (Armendano & González, 2010; Rendon *et al.*, 2015). Se ha demostrado además que las arañas lobo pueden actuar como agentes de control biológico (García *et al.*, 2021; Nyffeler & Benz, 1988) reduciendo la densidad de poblaciones de plagas y daños causados por artrópodos herbívoros en los cultivos (Suenaga & Hamamura, 2015). En los cultivos de soja de Uruguay se encuentran comúnmente dos especies, *H. cf. bivitatta* Mello-Leitão, 1938 y *L. poliostoma* Koch, 1847. *Hogna cf. bivitatta* es una especie de tamaño pequeño (longitud corporal media: 10 mm), que a menudo se encuentra en las hojas y en la parte inferior de las plantas de soja (Lacava 2014). *Lycosa poliostoma* es de tamaño mediano (longitud corporal media: 21 mm), las hembras y los juveniles pequeños viven en el suelo cavando cuevas o debajo de rocas (Capocasale 2001), y los machos son principalmente individuos errantes (Armendano & González, 2011; Benamú, 2010). *L. poliostoma* también ha sido reportada como dominante en otros cultivos de América del Sur, como alfalfa y trigo (Armendano & González, 2010, 2011).

En Uruguay, el área de producción de soja ha aumentado drásticamente, lo que ha provocado un aumento en la utilización de fertilizantes, herbicidas e insecticidas (Blum *et al.*, 2008a; Blum *et al.*, 2008b). El uso excesivo de plaguicidas ha provocado una serie de problemas ambientales, como contaminación de cuerpos de agua y problemas de salud reportados en Uruguay y países vecinos (Etchegoyen *et al.*, 2017; Ronco *et al.*,

2008). En Uruguay los problemas ecológicos y sanitarios causados por el uso de los principales plaguicidas han sido poco explorados (Céspedes-Payret *et al.*, 2009).

Un tipo de aproximación para analizar los efectos negativos de los insecticidas es la evaluación de cómo afectan a los organismos no blanco, incluidos los polinizadores y enemigos naturales (Wolfenbarger *et al.*, 2008). Los parámetros relacionados con la historia de vida, como la alimentación y la reproducción de parasitoides y depredadores nativos presentes en los cultivos, se ven afectados negativamente por los insecticidas, lo que reduce su potencial de control biológico (Blibech *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2010; Koss *et al.*, 2005; Tahir *et al.*, 2019). Se ha demostrado que en algunos casos los insecticidas de amplio espectro afectan de manera similar a los organismos blanco como a los no blanco, y algunos de los últimos, son organismos benéficos para la producción del propio cultivo (Cloyd, 2012). Por el contrario, los insecticidas más específicos o selectivos se consideran una forma alternativa y segura de atacar solo plagas específicas y se utilizan complementariamente con algunos enemigos naturales (Gentz *et al.*, 2010). Sin embargo, en algunos casos, el uso de insecticidas selectivos puede ser controvertido, ya que podrían ser seguros para los enemigos naturales a corto plazo, pero a largo plazo pueden reducir la capacidad de alimentación de las arañas (Řezáč *et al.*, 2010a).

Otros efectos secundarios de varios pesticidas se han analizado en las arañas constructoras de telas, que ven afectadas sus construcciones, perdiendo la función de capturar presas, ocasionando la muerte (Pekár 2002, 2012; Benamú *et al.* 2007, 2010, 2013). La exposición por contacto de neonicotinoides afecta las propiedades mecánicas, nanoestructuras y composición de aminoácidos en la producción de seda (Benamú *et al.*, 2017). La literatura se ha enfocado, como señalamos anteriormente en arañas de tela, pero hay muy poca información sobre los efectos secundarios de los plaguicidas en arañas cursoriales de América del Sur. Por ello, en el presente estudio se evalúan los efectos letales y subletales del insecticida selectivo Intrepid® (metoxifenocida) y el insecticida no selectivo Geonex® (tiametoxam+lambdaialotrina) sobre la supervivencia y el comportamiento alimentario de *H. cf. bivittata* y *L. poliostrata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Arañas utilizadas como modelo

Fueron seleccionadas las especies *L. poliostruma* y *H. cf. bivittata* por su abundancia en cultivos de soja (Lacava et al., 2020). *Lycosa poliostruma* es una especie de tamaño mediano que vive debajo de sustratos, mientras que *H. cf. bivittata* es una araña de menor tamaño que vive asociada a la vegetación y el suelo. Se recolectaron manualmente juveniles de ambas especies en pastizales naturales del departamento de San José de Mayo (34°19'05.3"Sur 56°42'42.0"Oeste). Las arañas fueron colocadas individualmente en placas de Petri® (10 x 1.5 cm) y se mantuvieron en condiciones de laboratorio (temperatura: 25 ± 5 ° C, humedad: $75 \pm 5\%$ HR y fotoperiodo: 12:12 h (L: D) hasta alcanzar la adultez. Fueron alimentadas una vez por semana con larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae). Quince días después de la última muda, los adultos que se utilizaron en los bioensayos fueron pesados, las hembras de *H. cf. bivittata* presentaron un peso de 0.648 g (± 0.041 ES), y los machos 0.614 g (± 0.049 ES). Las hembras de *L. poliostruma* presentaron un peso de 0.922 g (± 0.058 ES) y los machos: 0.867 g (± 0.046 ES).

El voucher de los individuos utilizados en experimentos se conserva en el Laboratorio de Ecotoxicología e Invertebrados Terrestres del Centro Universitario de Rivera (CUR) –Universidad de la República, Uruguay.

Concentraciones y aplicación de insecticidas

Como insecticida de amplio espectro se utilizó Geonex® (tiametoxam 141 mg / ml + lambdacialotrina 106 mg / ml, Tafirol S.A., Uruguay), compuesto por dos principios activos complementarios el neonicotinoide tiametoxam y el piretroide lambdacialotrina. El tiametoxam es un insecticida orgánico sintético que es eficaz para controlar la mayoría de las plagas de insectos succionadores y masticadores. Se rocía en la planta por aplicación foliar y es ingerida por insectos succionadores / masticadores mientras se alimentan. El insecticida lambdacialotrina actúa de manera similar al tiametoxam, excepto que se dirige a una variedad más amplia de insectos. Como insecticida selectivo utilizamos el insecticida conocido como acelerador de la muda Intrepid® SC (metoxifenocida 24 mg/ml, Dow AgroSciences, Argentina). El metoxifenocida es una diacilhidrazina

considerada como un insecticida biorracional, es un potente agonista de la ecdisona (Carlson *et al.*, 2001) que ocasiona en larvas de lepidópteros el cese de la alimentación e induce una prematura muda que es mortal. Ambos insecticidas se utilizan para el control de plagas en cultivos de soja en Uruguay (INIA 2018).

La concentración letal media (CL_{50}), se calculó para *L. poliostruma* y *H. cf. bivittata*, utilizando diferentes concentraciones de insecticida que correspondieron al 75%, 50%, 25%, 10% y 5% de las concentraciones de campo recomendadas para los insecticidas metoxifeocida y tiametoxam + lambdacialotrina (Tabla 1). Para cada concentración de insecticida y el grupo control se utilizó un total de 4 réplicas de 10 arañas, sumando un total de 40 arañas (20 machos y 20 hembras) por tratamiento, utilizando un total de 200 arañas por insecticida. Para la exposición al insecticida, las arañas fueron anestesiadas con gel refrigerante y se aplicó 1.0 μ l de la solución de insecticida en la región dorsal de la araña, utilizando acetona grado analítico como solvente, para a una rápida evaporación y disposición homogénea de la solución sobre la cutícula del organismo (Benamú *et al.*, 2010). En los grupos de control, solo se aplicó acetona a las arañas.

La mortalidad se registró 24 horas postratamiento. Para evaluar el efecto letal de cada concentración, sobre cada especie de araña, se utilizó un GLM binomial función de vínculo probit (Pekar & Brabec, 2016).

Tabla1. Insecticidas usados en *L. poliostruma* y *H. cf. bivittata*

Principio activo(mg/ml)			
Insecticida Engo		Insecticida Intrepid	
Concentración de campo	Tiametoxam	Lambda cialotrina	Metoxifenocida
75%	1.06	0.79	0.18
50%	0.71	0.53	0.12
25%	0.35	0.27	0.06
20%	0.28	0.21	0.05
10%	0.14	0.11	0.02
5%	0.07	0.05	0.01

Determinación de efectos subletales

Las concentraciones de ambos insecticidas fueron seleccionadas considerando los resultados preliminares obtenidos en las pruebas piloto de CL₅₀. Se usaron diluciones de 5, 10 y 20% de las correspondientes concentraciones de campo máximas recomendadas para cada insecticida, más el grupo control (Tabla 1)

Exposición a insecticidas de manera residual.

Para evaluar el efecto de los insecticidas, se seleccionaron individuos aleatoriamente en cada grupo, totalizando 10 machos y 10 hembras por cada concentración de los insecticidas utilizados y el grupo control. Se utilizaron 160 individuos por especie de araña. Se dispusieron de tres concentraciones para cada plaguicida, y un grupo control. La exposición se realizó mediante un papel de filtro (10 x 10 cm) que se sumergió 5 segundos en cada concentración de insecticida, se secó a temperatura ambiente (25 ± 3 °C) 30 minutos y se colocó en una placa Petri® (10 x 1.5 cm), con un pequeño orificio en la parte superior para ventilación (2 x 2 cm), cubierto con un malla fina. El

procedimiento de exposición para el grupo control fue el mismo que se usó para las arañas expuestas a insecticidas, pero usamos un papel de filtro con agua destilada. Las arañas se colocaron en placas Petri® (10 x 1.5 cm) con papel de filtro tratado durante 30 minutos, siguiendo el protocolo de Řezáč *et al.* (2010). Después de la exposición, las arañas se colocaron en placas Petri® limpias y se registró la supervivencia y el consumo de presas posterior. La supervivencia postratamiento se registró durante cinco días, en los cuales las arañas no fueron alimentadas. Para comparar la supervivencia inter-tratamientos en cada especie, se realizó una regresión de supervivencia con distribución exponencial, utilizando cada tratamiento y el tiempo de muerte como variables explicativas, mientras que la supervivencia se utilizó como variable de respuesta. Las comparaciones post-hoc se realizaron utilizando la prueba de Tukey del paquete de comparaciones múltiples (Hothorn et al., 2016)

También se comparó la supervivencia entre sexos. Para ello, se registró para cada sexo a partir del quinto día de exposición y se compararon mediante un Modelo Lineal Generalizado de distribución binomial, tomando el sexo y el tratamiento como variables explicativas y el porcentaje de supervivencia como variable de respuesta. Este proceso se realizó para cada especie, por separado.

Efecto de los insecticidas en la aceptación y consumo de presas

Para este bioensayo se utilizaron arañas que sobrevivieron a los diferentes tratamientos (tabla 4 de resultados). Se ofreció una larva de *T. molitor* a cada araña, seis días pos tratamiento y se registró el consumo después de 30 minutos. Para evitar sesgos de tamaño de presa, utilizamos larvas de *T. molitor* equivalentes a la longitud del prosoma de la araña. La tasa de aceptación se estimó como el cociente entre número de presas aceptadas sobre número total de presas ofrecidas. Se comparó la aceptación entre tratamientos para cada especie, mediante un Modelo Lineal Generalizado binomial, con el tratamiento como variable explicativa y la aceptación como variable de respuesta. Todas las comparaciones estadísticas se realizaron con un nivel de significancia del 95%.

RESULTADOS

Determinación de CL₅₀

Se encontró un efecto significativo sobre la mortalidad en la concentración de ambos insecticidas ($X^2_{28} = 69.945$; $p < 0.01$), sin embargo el tiametoxam + lambdacialotrina mostró una CL₅₀ significativamente menor ($X^2_{29} = 74.58$; $p < 0.01$) que el metoxifenocida (Tabla 2). La mortalidad en ambas especies fue similar frente a los insecticidas evaluados ($X^2_{30} = 0.41$; $p = 0.673$), por lo que usamos las mismas concentraciones de insecticida para estudiar los efectos subletales.

Tabla 2. Concentración letal media de los insecticidas para *L. poliostruma* y *H. cf. bivittata*, media y desvío estándar calculados a partir del GLM binomial.

Especie	CL ₅₀ ± SD Geonex,	CL ₅₀ ± SD Intrepid,
	(tiametoxam + lambdacialotrina)	(metoxifenocida)
	%concentración de campo	% concentración de campo
<i>Lycosa poliostruma</i>	0.10 ± 0.01	0.64 ± 0.06
<i>Hogna cf. bivittata</i>	0.08 ± 0.02	0.65 ± 0.08

Análisis de supervivencia de contaminación residual

La supervivencia mostró una tendencia similar en ambas especies, ya que fue significativamente diferente al grupo control en *L. poliostruma* ($X^2_{25} = 96.28$; $p < 0.01$) y en *H. cf. bivittata* ($X^2_{25} = 97.89$; $p < 0.01$). Para *H. cf. bivittata*, encontramos tasas de supervivencia similares entre el grupo de control y todas las concentraciones evaluadas para el metoxifenocida (Fig. 1A), donde no hubo mortalidad. Por el contrario, se registró una supervivencia significativamente menor ante las diferentes concentraciones del tiametoxam + lambdacialotrina utilizado. Hubo diferencias significativas en las respuestas ante las concentraciones más altas del tiametoxam + lambdacialotrina con respecto a las demás concentraciones del mismo insecticida (Tabla 2).

Se observó una tendencia diferente para *L. poliostruma*. La supervivencia fue mayor en el grupo control y en todos los tratamientos del metoxifenocida (Intrepid) y en la concentración más baja del tiametoxam + lambdacialotrina (Geonex) (Tabla 3). La mortalidad aumentó significativamente en las concentraciones más altas del insecticida de amplio espectro (Figura 1B).

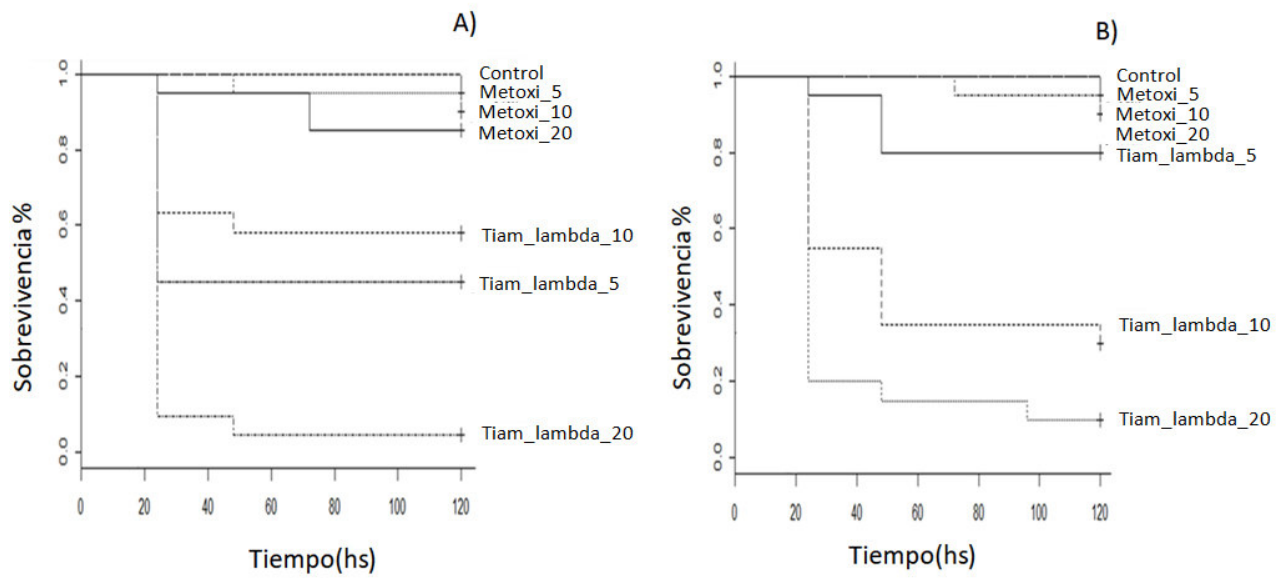


Figura 1. Análisis de supervivencia para A) *H. cf. bivitatta* y B) *L. poliostruma* luego de la exposición a los residuos de los insecticidas. Las diferentes letras muestran diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Tabla 3. Valores de z (valor del estadístico) y p (probabilidad) de las comparaciones mediante el paquete multcomp test de Tukey (partir de modelo de sobrevivencia), entre las sobrevivencias de los dos insecticidas. Tiam.lambda (Tiametoxam + lambdacialotrina), Metox (Metoxifenocida)

	<i>Lycosa poliostruma</i>		<i>Hogna cf. bivittata</i>	
	z	p	z	p
Tiam.lambda 10 - Tiam.lambda 5	-3.117	0.02065 *	0.778	0.98128
Tiam.lambda 20 - Tiam.lambda 5	-4.53	< 0.001 ***	-3.57	0.00441 **
Metox 5 - Tiam.lambda 5	1.346	0.77758	2.757	0.06117
Metox 10 - Tiam.lambda 5	0.961	0.94581	2.822	0.05103
Metox 20 - Tiam.lambda 5	1.364	0.76662	2.972	0.03263 *
Tiam.lambda 20 - Tiam.lambda 10	-2.068	0.3	-4.21	< 0.001 ***
Metox 5 - Tiam.lambda 10	3.162	0.01794 *	2.169	0.24985
Metox 10 - Tiam.lambda 10	3.439	0.00706 **	2.464	0.13027
Metox 20 - Tiam.lambda 10	3.181	0.01676 *	2.475	0.1272
Metox 5 - Tiam.lambda 20	3.903	0.00114 **	5.068	< 0.001 ***
Metox 10 - Tiam.lambda 20	4.477	< 0.001 ***	4.191	< 0.001 ***
Metox 20 - Tiam.lambda 20	3.922	0.00104 **	4.893	< 0.001 ***
Metox 10 –Metox 5	-0.549	0.997	0.997	0.93715
Metox 20 - Metox 5	0.014	1	0.536	0.99748
Metox 20 - Metox 10	0.566	0.99647	-0.54	0.99733

Al comparar las tasas de mortalidad, encontramos una interacción significativa entre sexo para los tratamientos en *H. cf. bivittata* ($X^2_6 = 3.48$; $p < 0.01$), donde los machos tuvieron una mayor mortalidad en todos los tratamientos (Fig. 2A,;Tabla 4). No encontramos en *L. poliostruma* una interacción significativa entre sexo y tratamiento ($X^2_6 = 0.44$; $p = 0.59$) ya que machos y hembras sobrevivieron en proporciones

similares en todos los tratamientos (Fig. 2B; Tabla 4, sin embargo encontramos diferencias significativas en cuanto a la mortalidad entre tratamientos, siendo más alto ante el insecticida tiametoxam + lambdacialotrina en comparación con el tratamiento control y el insecticida metoxifenocida ($X^2_6 = 15.67$; $p < 0.001$).

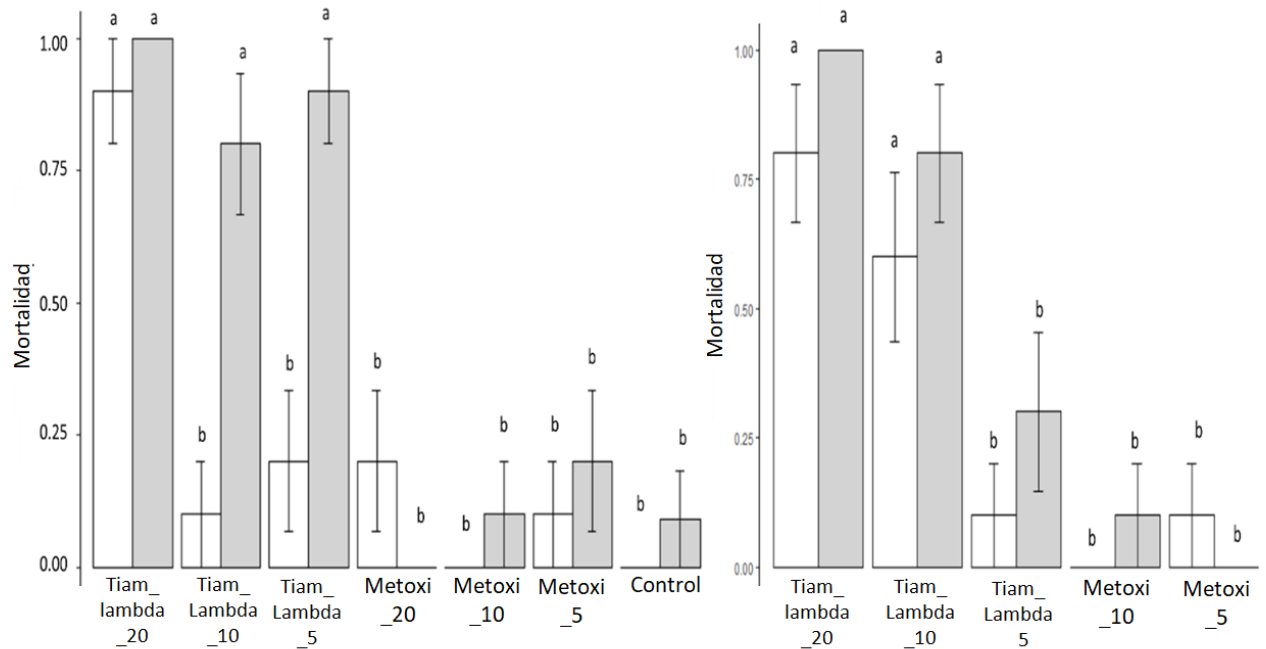


Figura 2. Supervivencia por sexo de A) *H. cf. bivittata* y B) *L. poliostruma* luego del tratamiento con diferentes insecticidas. Las diferentes letras muestran diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Los tratamientos que no tuvieron mortalidad no se incluyeron en la gráfica. Tiam_lambda (Tiametoxam + lambdacialotrina), Metoxi (Metoxifenocida)

Tabla 4: Número de machos y hembras supervivientes de ambas especies para los diferentes grupos experimentales. Un número inicial de 10 Se utilizó individuos para cada tratamiento y sexo.

Tratamientos	Concentración de campo	<i>Lycosa poliostrata</i>		<i>Hogna cf. bivittata</i>	
		Macho	Hembra	Machos	Hembra
Tiametoxam + lambdacialotrina	5%	7	9	1	8
	10%	2	4	2	9
	20%	0	2	0	1
Metoxifenocida	5%	10	9	8	9
	10%	9	9	9	10
	20%	9	10	10	8
Control	0%	10	10	10	10

Aceptación de presas

La aceptación de presas para los individuos sobrevivientes (Fig. 2) mostró una tendencia similar en ambas especies (Fig 3A, 3B). Ninguna de las concentraciones utilizadas de los insecticidas selectivos afectó la aceptación, pero el insecticida de amplio espectro disminuyó significativamente la aceptación en *H. cf. bivittata* ($X^2_6 = 69.81$; $p < 0.001$) y *L. poliostrata* ($X^2_5 = 222.96$; $p < 0.001$) en las concentraciones más altas. En *H. cf. bivittata*, la concentración más baja del insecticida tiametoxam + lambdacialotrina y el insecticida metoxifenocida no presentó diferencias con el grupo control. Se encontró una ligera tendencia diferencial para *L. poliostrata*, ya que la menor aceptación de presas correspondió a la menor concentración de tiametoxam + lambdacialotrina.

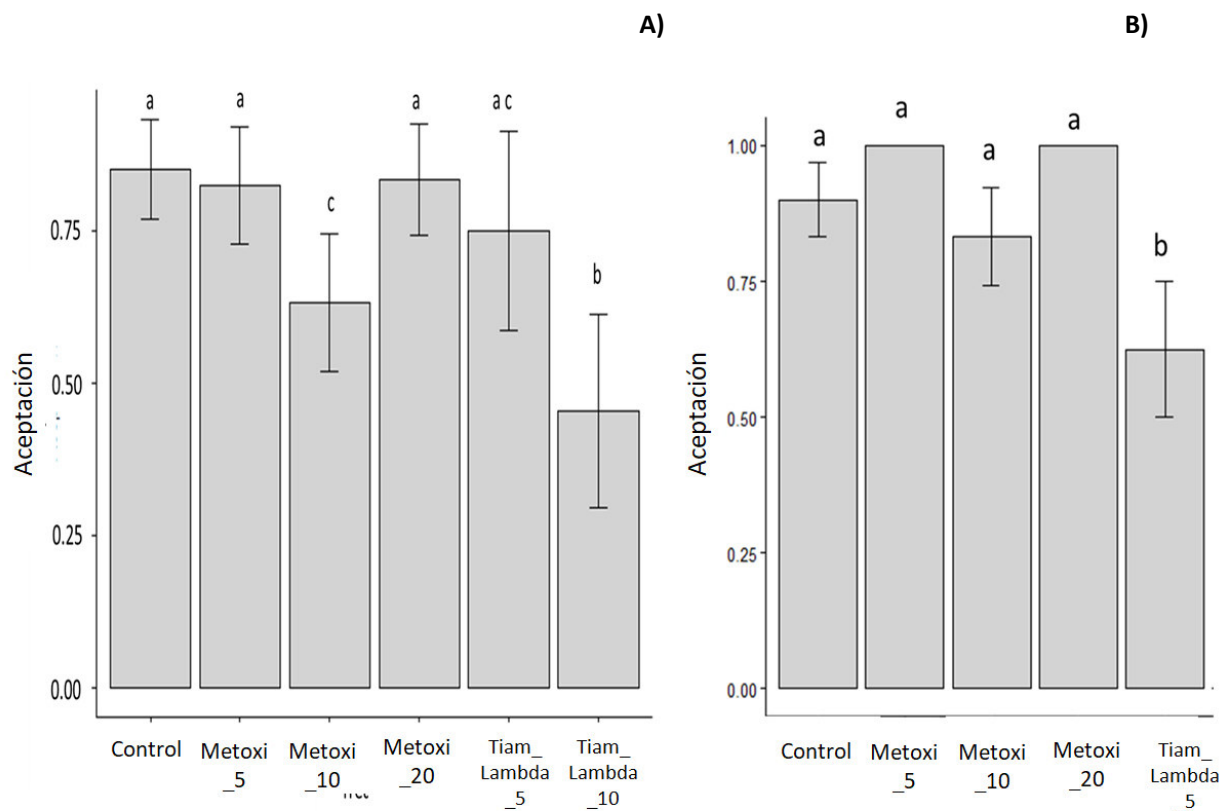


Figura 3. Proporción de la tasa de captura por A) *H. cf. bivittata* y B) *L. polioptoma* luego del tratamiento con insecticidas. Las diferentes letras muestran diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Se excluyeron tratamientos con pocos individuos (menores de 5). Tiam_lambda (Tiametoxam + lambdacialotrina), Metoxi (Metoxifenocida)

DISCUSIÓN

Los resultados muestran que el insecticida tiametoxam + lambdacialotrina afectó los aspectos de supervivencia y alimentación en ambas especies de arañas lobo, mientras que el insecticida metoxifenocida es menos dañino. Benamú *et al.* (2017b) demostraron que el tiametoxam+ lambdacialotrina tiene efectos negativos sobre los enemigos naturales, lo que es consistente con nuestros resultados. El tiametoxam afecta la supervivencia y reproducción de una amplia variedad de depredadores y parasitoides, incluidas las arañas (Prabhaker *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2015; Řezáč *et al.*, 2019a), y la lambdacialotrina es ligeramente dañina para algunos depredadores como los insectos (Cloyd, 2012) y reduce la eficiencia de alimentación de ácaros depredadores (Cloyd, 2012).

En el caso particular de las arañas, autores como Rodrigues *et al.*, (2013) y Spindola *et al.*, (2013) mostraron que el uso de lambdacialotrina en cultivos de arroz, disminuyó la abundancia, riqueza y diversidad de varias familias de arañas en parcelas fumigadas. De manera similar, la lambdacialotrina tuvo efectos negativos sobre la araña *Neoscona theisi* (Araneae, Araneidae) al reducir la actividad depredadora y aumentar la mortalidad (Tahir *et al.*, 2019). A pesar de esto, solo unos pocos estudios han explorado los efectos secundarios del insecticida combinado tiametoxam + lambdacialotrina sobre los enemigos naturales (Benamú *et al.*, 2017b; Thangavel *et al.*, 2018). Asogwa *et al.*, (2011) demostraron que cuando se usaban juntos el tiametoxam + lambdacialotrina inducía la mortalidad de las chinches depredadoras de los míridos, incluso a concentraciones bajas, coincidiendo con nuestras observaciones sobre una baja supervivencia de las arañas al 20% y al 10% de las concentraciones de campo.

Al analizar la mortalidad para cada sexo encontramos que fue mayor para los machos en comparación con las hembras en *H. cf. bivittata* especialmente con el tratamiento de tiametoxam + lambdacialotrina. Estos resultados concuerdan con observaciones previas que han demostrado que los machos de otras especies de arañas lobo son más susceptibles a los insecticidas que las hembras (Van Erp *et al.*, 2002), aunque la explicación de esta susceptibilidad no es clara. Dinter & Poehling (1995) sostienen que la mayor susceptibilidad puede deberse a la menor relación entre peso y área corporal de los machos, coincidiendo con los resultados de este estudio, ya que *L. poliostruma*, es más pesada que *H. cf. bivittata* y mostró una mortalidad similar entre machos y

hembras. Sin embargo no está claro por qué pese a la diferencia entre los pesos que tienen las especies no se encontraron diferencias significativas en sus mortalidades, una explicación puede ser que *H. cf. bivittata* tenga mecanismos de detoxificación más eficientes que *L. poliostruma*. Debido a los efectos de tiametoxam + lambda cialotrina, pudimos usar menos concentraciones de este insecticida en experimentos de captura de presas. Encontramos que disminuyó la aceptación de presas, mientras que la mayoría de las concentraciones de metoxifenocida no afectaron el comportamiento de alimentación. La modificación del comportamiento de alimentación de los depredadores es un rasgo muy negativo causado por los insecticidas de amplio espectro que altera drásticamente la fecundación y la fertilidad (Benamú *et al.*, 2007, 2010a, 2013; Hanna & Hanna, 2013). En los neonicotinoides se ha demostrado que estos pueden afectar el sistema nervioso al alterar los receptores de acetilcolina (Martinou & Stavrinides, 2015), como consecuencia de ello algunas respuestas conductuales como la captura de presas podrían alterarse (Benamú *et al.*, 2013), esto podría explicar la menor tasa de aceptación de presas por arañas expuestas a este insecticida.

Los efectos inocuos observados para el metoxifenocida, concuerdan con estudios previos que sugirieron su compatibilidad con algunos grupos de enemigos naturales. Se ha demostrado que el metoxifenocida no afecta la supervivencia ni la reproducción cuando se evalúa en algunos parasitoides y depredadores (Brunner *et al.*, 2001; Rimoldi *et al.*, 2012). Además, el hecho de que este insecticida actúe principalmente por ingestión, podría haber mitigado su efecto sobre las arañas. Estos resultados sugieren que los efectos residuales de la metoxifenocida parecen ser menos dañinos y podrían ser compatibles con el uso de arañas como agentes de control biológico, así como con otros grupos de enemigos naturales (Hewa-Kapuge *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2008; Gentz *et al.*, 2010; Rimoldi *et al.*, 2012). A pesar de ello, conviene analizar aspectos adicionales, ya que el metoxifenocida imita las hormonas de muda de los artrópodos (Giuggia *et al.*, 2011), y se deben realizar más estudios para evaluar si afecta el desarrollo de las arañas. Además, se deben explorar otras vías de exposición como la tópica o por ingestión en los dos insecticidas utilizados, ya que estos podrían tener efectos subletales más fuertes en las arañas de acuerdo al modo de exposición.

En conclusión, estos resultados sugieren que el uso de insecticida de amplio espectro (tiametoxam 14,1% + lambda cialotrina 10,6%, Tafirel SA, Uruguay) tiene un efecto negativo en dos especies de depredadores nativos y podría ser potencialmente nocivo

para otros grupos, por lo tanto debe limitarse su aplicación. Por el contrario, el insecticida selectivo metoxifenocida no afectó la supervivencia y tiene un bajo efecto en la aceptación de la presa en *H. cf. bivittata*. Sin embargo, es recomendable realizar más experimentos para comprender los impactos letales indirectos y subletales del metoxifenocida en otros invertebrados no objetivo. Este trabajo destaca una vez más la relevancia de las evaluaciones de efectos subletales en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos para reformular estrategias de control de plagas en agroecosistemas. Dado que estos resultados son potencialmente aplicables a los programas de MIP en Uruguay, estudios posteriores evaluarán el efecto de este insecticida sobre otros parámetros del ciclo de vida de ambas especies y otros grupos de enemigos naturales.

CAPÍTULO II

EFFECTOS DE DOS INSECTICIDAS SOBRE LA MOVILIDAD Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ARAÑAS LOBO DE CULTIVOS DE SOJA

Introducción

Los enemigos naturales impactan positivamente en la producción de los agroecosistemas (Goldberger & Lehrer, 2016; Bouvet *et al.*, 2019), reduciendo las poblaciones de plagas mediante la depredación (Greenop *et al.*, 2019; Escobar-Ramírez *et al.*, 2019). La función depredadora afecta fundamentalmente a insectos reconocidos como plagas en cultivos, como, coleópteros, hemípteros y lepidópteros. Sin embargo, en Latinoamérica hay poco conocimiento de los grupos de artrópodos que forman una parte importante de la fauna autóctona benéfica de los agroecosistemas.

Las arañas lobo han sido reportadas como enemigos naturales en cultivos, debido a su abundancia y presencia en la mayoría del año (Lacava *et al.*, 2020; Nyffeler & Sunderland, 2003; Armendano & González, 2010), estas arañas han sido catalogadas dentro del gremio de corredoras de suelo, ya que utilizan su movilidad para encontrar y capturar presas (Ford & Url, 2013; Persons & Uetz, 1997; Cardoso *et al.*, 2011). Esta forma errante de vida, les permite a estas arañas llamadas “vagabundas” la colonización de sitios y es importante esta cualidad para promover los fenómenos migratorios de fauna a nivel de los agroecosistemas (Bishop & Riechert, 1990; Buddle & Rypstra, 2003; Řezáč *et al.*, 2019b). La importancia que tiene la movilidad y el desplazamiento en arañas se ve afectada por distintos parámetros bióticos como, otros depredadores (Wilder & Rypstra, 2004), presas disponibles (Persons & Rypstra, 2001) y el estado de desarrollo y sexo de las arañas (Kreiter & Wise, 2001). Además, existen otros factores abióticos y químicos que afectan de manera significativa la movilidad en arañas. Dentro de los últimos, los insecticidas han demostrado tener un efecto mixto en la movilidad de este grupo animal, reduciendo la velocidad y las distancias que recorren las arañas (Pekár & Beneš, 2008). La aplicación de cipermetrina reduce el movimiento en *Pardosa amentata* (Baatrup & Bayley, 1993) mientras que otros agroquímicos, como malatión produce un aumento de la movilidad (Tietjen & Cady, 2007). La reducción en la locomoción, además de afectar la captura de presas (Michalko & Košulič, 2016; Řezáč *et al.*, 2010) es un parámetro de gran importancia en la migración. Varias especies ven limitada su movilidad debido a que evitan superficies contaminadas con plaguicidas,

permaneciendo más tiempo en las superficies sin insecticidas (Pekár & Haddad, 2005; Řezáč *et al.*, 2019a). Además de la movilidad, se ha encontrado que los insecticidas afectan los ritmos de actividad locomotora de las arañas (Baatrup & Bayley, 1993; Tietjen & Cady, 2007), aunque este parámetro ha sido escasamente evaluado (Pekár, 2012). Tietjen & Cady (2007) evaluaron los efectos del malatión en los ritmos de actividad de cuatro especies de arañas. Estos mismos autores registraron un cambio en el ritmo y aumento de la actividad en *Salticus scenicus* (Clerck, 1757) y *Rabidosa rabida* (Walckenaer, 1837), asociado a cambios fisiológicos ya que el malation es un inhibidor de la actividad de la acetilcolinesterasa, enzima que disminuye un neurotransmisor, la acetilcolina.

El efecto de los insecticidas, no sólo se refleja en el comportamiento de las arañas y otros artrópodos, sino además en otros aspectos fisiológicos, como la actividad enzimática. Por ejemplo, se ha encontrado que la exposición de arañas lobo al insecticida dimetoato inhibe la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (Pedersen *et al.*, 2002). Laino & Garcia (2020) encontraron un cambio en la actividad de varias enzimas (superóxidodismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GsT) y acetilcolinesterasa (AChE) utilizando *Polybetes phytagoricus* expuestas a cipermetrina. Tahir *et al.* (2019) encontraron un aumento en la actividad de la acetilcolinesterasa y la carboxilesterasa en arañas expuestas a herbicidas e insecticidas, demostrando que actúan a nivel del sistema nervioso, (Pekár 2012, 2013). Los pocos estudios ecotoxicológicos en Latinoamérica se han focalizado en analizar efectos de diversos insecticidas sobre la alimentación y reproducción. Pero, se desconoce aún el efecto sobre aspectos como la movilidad y su posible relación con parámetros fisiológicos que la regulan, como la actividad enzimática.

Las especies *L. poliostruma* y *H. cf. bivittata*, son abundantes en el cultivo de soja y se consideran como posibles enemigos naturales (Armendano & González, 2010; Lacava *et al.*, 2020) y modelos para evaluar el efecto de agroquímicos. Por ello, en la temática de este capítulo se aborda la evaluación de los efectos de los insecticidas tiametoxam + lambdacialotrina y metoxifenocida sobre la movilidad, los ritmos de actividad y la actividad de enzimas relacionadas con la movilidad (AChE) y la detoxificación (GsT) de las arañas *L. poliostruma* y *H. cf. bivittata*. Se espera, teniendo en cuenta los resultados del Capítulo 1, que el metoxifenocida no tenga efectos en los parámetros evaluados y que el tiametoxam + lambdacialotrina, aumente la actividad de glutatión s-

transferasa (GsT), una disminución de la movilidad y un aumento de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE).

Objetivo general:

Evaluar efectos comportamentales y fisiológicos de los insecticidas tiametoxam+ lambdacioalotrina y metoxifenocida en *L. poliostruma* y *H. cf. bivittata*

Objetivos específicos:

- 1- Evaluar los efectos de los insecticidas tiametoxam+ lambdacioalotrina y metoxifenocida en el desplazamiento de ambas especies de arañas.
- 2- Evaluar los efectos de los insecticidas tiametoxam+ lambdacioalotrina y metoxifenocida en la velocidad máximas alcanzadas por ambas especies
- 3- Evaluar los efectos de los insecticidas tiametoxam+ lambdacioalotrina y metoxifenocida en los ritmos de actividad de ambas especies
- 4- Evaluar los efectos de los insecticidas tiametoxam+ lambdacioalotrina y metoxifenocida en la velocidad en la actividad de las enzimas GsT Y AChE.

Materiales y métodos

Recolección y acondicionamiento de los ejemplares en el laboratorio:

Las arañas empleadas en todos los experimentos, fueron recolectadas manualmente de tres sitios: el campus del CURE, Universidad de la República, Treinta y Tres (33°15'24.7"S; 54°25'30.2"O); alrededores de la represa Cuchilla Negra del departamento de Rivera (30°52'09.6"S; 55°36'06.0"O) y en monte nativo sin producción agropecuaria, en San José (34°19'08.1"S; 56°42'39.2"O). Todos los sitios estuvieron libres de aplicaciones de plaguicidas. Las arañas recolectadas fueron trasladadas y acondicionadas individualmente en recipientes plásticos, en el laboratorio de Ecotoxicología de Artrópodos Terrestres (CENUR Noreste sede Rivera). Las arañas recolectadas se alimentaron con larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) e hidratadas a través de algodón húmedo.

El voucher de los individuos utilizados en experimentos se conserva en el Laboratorio de Ecotoxicología e Invertebrados Terrestres del Centro Universitario de Rivera (CUR) –Universidad de la República, Uruguay.

Exposición a los insecticidas

Para evaluar los efectos de los insecticidas tiametoxam + lamdacialotriana (Engeo®) y metoxifenocida (Intrepid®), se prepararon diferentes concentraciones utilizando como solvente acetona grado analítico, (Tabla 1 y 2), para el grupo control se utilizó acetona grado analítico.

Treinta arañas por tratamiento fueron anestesiadas colocándolas durante cinco minutos en una bandeja con gel refrigerante en la base forrada con papel aluminio. Posteriormente se manipularon delicadamente con pinzas y cuando se registró una disminución en el desplazamiento, se colocó 1.0µl de la solución del insecticida sobre el abdomen con un microaplicador Hamilton (Benamú *et al.*, 2010, 2013, 2017). Se registró la movilidad en las arañas posteriormente a la aplicación. .

Análisis de movimiento

Luego de ser expuestas a las diferentes concentraciones de insecticida (Tabla 1), las arañas de la especie *H. cf. bivittata* fueron colocadas en placas de Petri® de 6 cm de diámetro y las arañas *L. poliostruma* en placas de Petri® de 10 cm de diámetro. Fueron filmadas durante 72 horas, utilizando cámaras de seguridad HD de circuito cerrado. Se mantuvo un fotoperiodo con luz natural, de aproximadamente 10 horas luz, 11 horas oscuridad y 3 horas de penumbra

Tabla 1. Concentraciones de insecticida utilizada en los ensayos.

Concentración recomendada para campo	Tiametoxam (µg/ml)	Lambdacialotrina (µg/ml)	Metoxifenocida (µg/ml)
10%	0.14	0.11	0.02
25%	0.35	0.27	0.06

Los videos fueron analizados mediante el programa Ethovision (Noldus *et al.*, 2001), generando análisis de intervalos de media hora durante las 72 h de observación postratamiento, alcanzando un total de 144 intervalos por araña. Las variables registradas fueron el desplazamiento total y la velocidad máxima alcanzada en cada intervalo analizado. Se seleccionó la velocidad máxima debido a que es un indicador del estado físico de la araña y la distancia total recorrida que se utiliza generalmente para medir la actividad. Con los valores obtenidos del desplazamiento total resultante en cada intervalo se realizó un análisis de periodicidad.

Análisis de datos

El desplazamiento total de cada intervalo y la velocidad máxima fueron analizados mediante un modelo lineal generalizado mixto (GLMM) (Zuur *et al.* 2017) de distribución normal, tomando como efecto aleatorio a cada uno de los individuos. El análisis de estas variables se realizó con los datos de los intervalos de media hora y los

totales por individuo, para la distancia recorrida y la velocidad máxima de cada individuo.

Se realizó un análisis de periodicidad de la actividad tomando la variable desplazamiento en cada araña, por cada tratamiento, utilizando modelos de estadística circular, en *L. poliostruma* se utilizó la transformación continua de Wavelet, (Sinha *et al.*, 2005) y en *H.cf. bivittata* la de chi cuadrado (Sokolove & Bushell, 1978), que permiten analizar cambios cíclicos en las variables para la mayoría de las muestras. Para ello, se utilizó el paquete Zeitgeber (Geissmann *et al.*, 2018) del software R, diseñado especialmente para el análisis de periodicidad y construcción de periodogramas. Los períodos obtenidos fueron evaluados mediante el test no paramétrico de Wilcoxon.

Para analizar los efectos en la actividad enzimática de las arañas, se siguió el mismo protocolo de exposición de las arañas utilizado para la evaluación de los efectos de los insecticidas sobre la movilidad, utilizando las concentraciones de insecticidas de la tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones de insecticida utilizada en los ensayos.

Concentración recomendada para campo	Tiametoxam (µg/ml)	Lambdacialotrina (µg/ml)	Metoxifenocida (µg/ml)
5%	0.07	0.05	-
10%	0.14	0.11	0.02
25%	-	-	0.06

Las arañas fueron sacrificadas 12 hs. postratamiento por congelamiento; posteriormente, para obtener las enzimas, se realizó la extracción de proteínas y con las muestras frescas se cuantificó la cantidad de proteína midiéndose la actividad enzimática.

Protocolo de extracción y cuantificación de proteína.

Se realizó una maceración de las arañas en una solución de homogenización (pH 7.4, 0.28 mg/ml MgCl₂ 112,8mg/ml sacarosa, 0.945mg/ml fosfato monosódico, 0.54mg/ml

fosfato disódico) hasta lograr una homogenización de la muestra a 4° C. Los homogeneizados se centrifugaron durante 10 min a 1000 g a 4 ° C. Se realizaron los ensayos enzimáticos con las fracciones subcelulares obtenidas frescas. El contenido de proteína de las fracciones subcelulares se determinó mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976).

Para medir la actividad de la acetilcolinesterasa se siguió la metodología de Ellman *et al.* (1961) midiendo la relación de hidrólisis de la acetiltiocolina en presencia de DTNB y la formación de ácido tionitrobenzoico, monitorizado a 412 nm.

Para la cuantificación de la actividad se colocaron 1000ml de buffer, 6.5 ml de acetilcolina, 33.5 ml del reactivo de Ellman (DTNB) y 16.5 de la muestra. Se registró la absorbancia durante 150 segundos a 412 nm. Cada muestra fue procesada por duplicado, si no se observaba actividad, se realizó una tercera experiencia.

Para el análisis de la actividad enzimática se calculó la cantidad de proteína de cada muestra utilizando la curva de calibración realizada.

La actividad de la acetilcolinesterasa se calculó a partir de la ecuación

$$\frac{\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}}{\text{mgr}} = \left(\frac{[\text{Vol. ensayo}(\text{ml})]}{\left(\frac{1000}{\text{EmM}} * 1 \right) * \text{Vol Homog.}(\text{ml})} \right) * \frac{\Delta DO}{[\text{prot}]}$$

Actividad de la GsT

Para cuantificar la actividad de la GsT se siguió el protocolo planteado por Habig *et al.* (1974). La reacción se lleva a cabo en un tampón fosfato 100 mM a pH 6.5 Para medir la actividad de glutatión S-transferasa (GsT) se utilizó 1 mM CDNB (1-cloro-2.4-dinitrobenzenceno) y 1 mM de GSH (glutatión reducido) como sustratos. Se midió el aumento en la absorbancia a 340 nm del conjugado CDNB-GSH (Habig & Jakoby, 1981) utilizando 1-cloro-2.4-dinitrobenzenceno (CDNB) como sustrato, durante 150 segundos. Cada muestra fue procesada por duplicado, en el caso que no se viera una actividad se realizaba un tercer ensayo.

La actividad de la GST se calculó mediante la ecuación:

$$mUGST/mg = \Delta DO * Vol. ensayo (ml) / (EmM * Vol Homog. (ml) * [prot.]) * 1000$$

Descripción de las unidades utilizadas en las ecuaciones:

EmM: coeficiente de extinción molar del conjugado CDNB-GSH (9.6 mM-1cm-1)

[prot.]: Concentración de proteína total en la muestra, obtenida por el método de Lowry.

UGST: Se define la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 µmol de sustrato en un minuto. La actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg prot) o por mililitro de disolución (U/ml).

VolHomog: volumen de homogeinato (ml)

Vol. Ensayo: volumen de ensayo (ml)

ΔDO: diferencia entre absorbancia inicial y absorbancia final.

Análisis de datos.

Los datos fueron analizados mediante el software R utilizando un GLMM en donde se puso como variable aleatoria la muestra y como variables explicativas el tipo de tratamiento. Se realizaron regresiones polinomiales entre la actividad enzimática y las dosis de insecticida recibidas por cada araña, utilizando el software Past. La dosis se expresó como la relación entre el peso insecticida aplicado sobre peso de la araña. Se calculó la cantidad de µg de insecticida por g de araña de la manera siguiente (Benamú 2010):

$$Dosis\ insecticida = \frac{\text{concentración insecticida} \times \text{volumen de gota}}{\text{peso de la araña} \times 10^6}$$

RESULTADOS

Análisis de la movilidad

Las dos especies de arañas recorrieron diferentes distancias cuando estuvieron activas en los diferentes tratamientos (LMM, $f=7.59$, $DF=146$, $p<0.001$), y los efectos fueron diferentes en cada especie con diferencia significativa (LMM, $f=5.87$, $DF=146$, $p<0.001$). En *H. cf. bivitatta* hubo un aumento de la movilidad en la exposición al insecticida metoxifenocida y esta diferencia fue significativa para las dos concentraciones respecto al grupo control ante concentración de 10 % (contraste: $p=0.008$) y ante la concentración de 25% (contraste: $p=0.001$) (Fig. 1). Además se observó una mayor dispersión en las distancias recorridas por las arañas expuestas a ese insecticida, principalmente ante la concentración de 25%. Con el tiametoxan + lambdacialotrina *H. cf. bivitatta* disminuyó las distancias recorridas durante 30 min. sin mostrar diferencias significativas respecto al control (contraste: $p>0.05$ en ambos casos). Adicionalmente la variación del efecto del insecticida sobre la distancia recorrida fue mucho menor a la presentada por metoxifenocida.

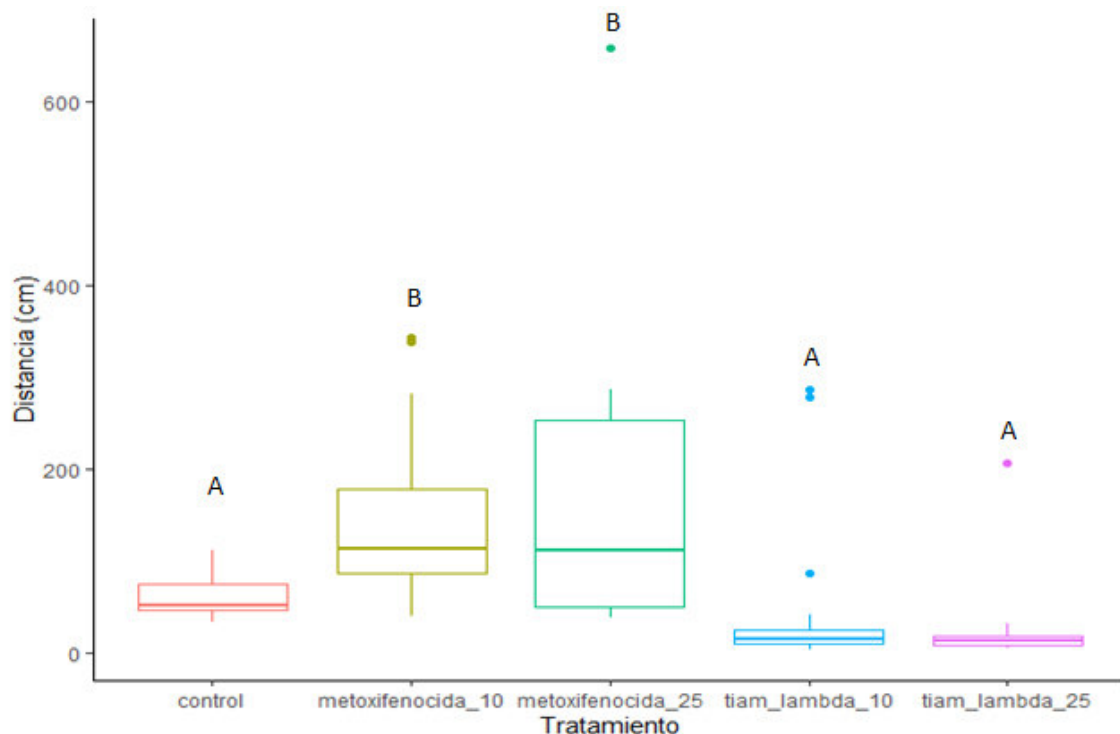


Figura 1: Box plot de promedios de las distancias recorridas durante 30 min. por *H.cf. bivitatta*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos.

Lycosa poliostruma recorrió menores distancias que *H. cf. bivittata* (LMM, $f=45.24$, $DF=146$, $p<0.001$) (Figs. 1 y 2). *Lycosa poliostruma* también presentó cambios en la movilidad según el tipo de insecticida de exposición. El metoxifenocida al 10% incrementó las distancias recorridas respecto al grupo control (contraste: $p=0.01$). Sin embargo, con el aument

o de concentración (25%) produjo una disminución de la movilidad respecto al grupo control pero sin diferencias significativas (Fig. 2). El tiametoxam + lambdacialotrina produjo en ambas concentraciones una disminución de las distancias recorridas respecto al grupo control al 10% (contraste: $p=0.001$) y al 25% (contraste: $p=0.003$). Las dispersiones de las distancias recorridas fueron similares ante exposición a metoxifenocida en sus diferentes concentraciones y el grupo control.

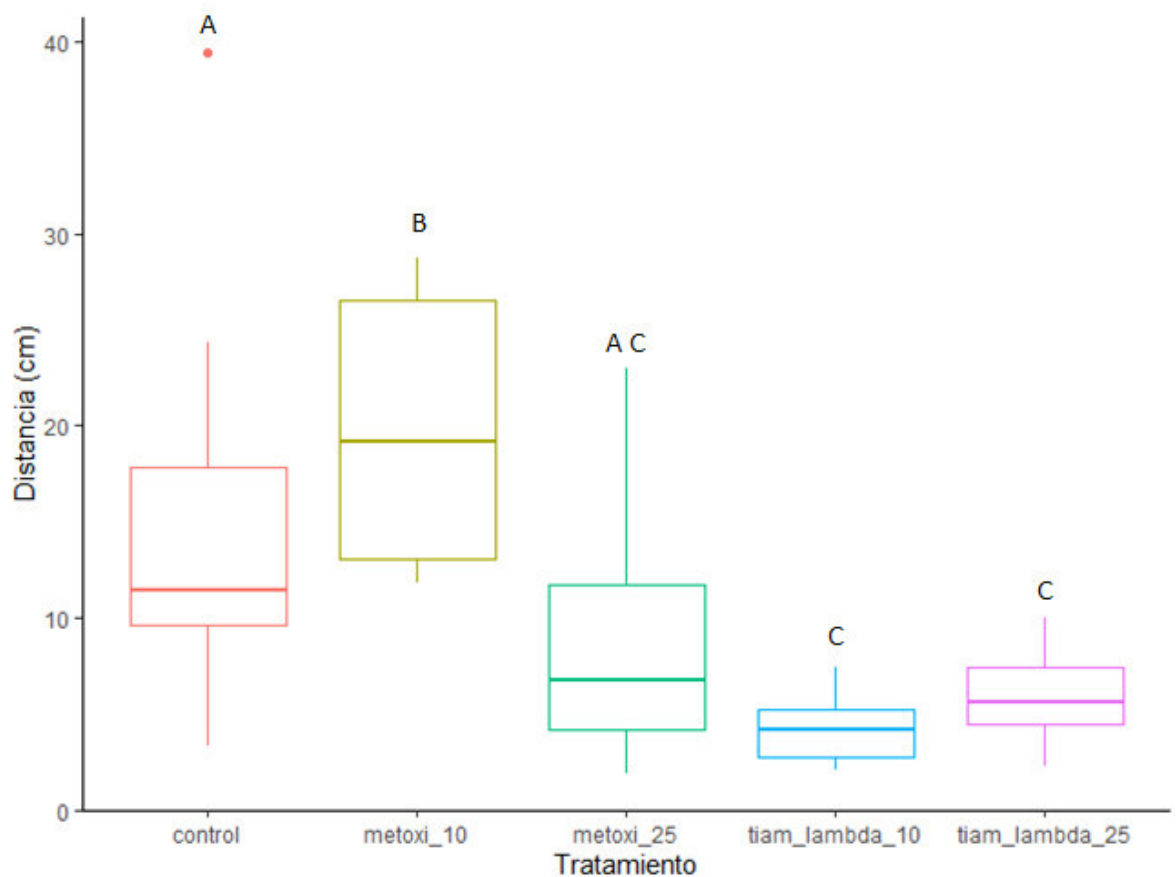


Figura 2: Box plot de promedios de las distancias recorridas durante 30 min. por *L. poliostruma*). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos.

En *H. cf. bivitatta* se observó un efecto significativo de los tratamientos y las velocidades máximas alcanzadas (LMM, $f=24.6$, $DF=111$, $p<0.001$). Las arañas expuestas a metoxifenocida presentaron mayores velocidades máximas en los períodos de actividad y diferentes significativamente del grupo control (Fig. 3) (contrastes: $p<0.001$ para ambas concentraciones). Además este insecticida produjo una mayor variación en las velocidades máximas alcanzadas respecto a los demás tratamientos. Tiametoxam + lambdacialotrina en ambas concentraciones presentó diferencias significativas respecto al grupo control (contraste: $p<0.001$).

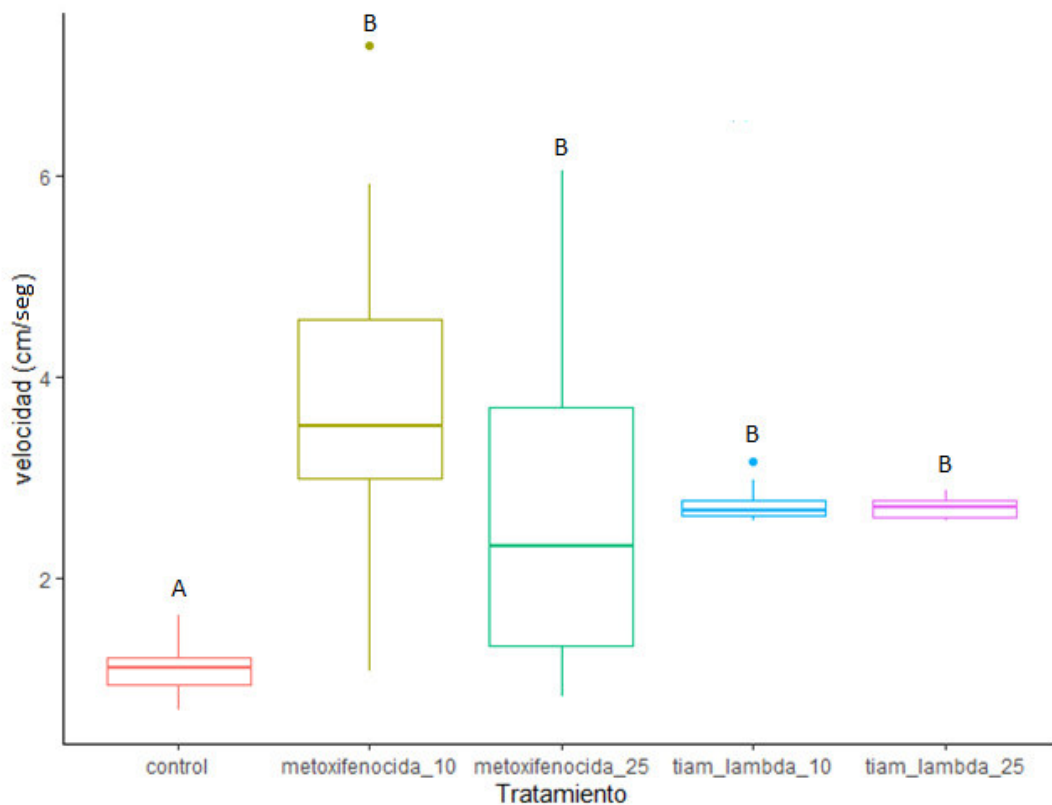


Figura 3: Box plot de los promedios de las velocidades máximas alcanzadas durante 30 min. por *H. cf. bivitatta*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos.

Las velocidades máximas alcanzadas en los períodos de actividad por *L. poliostruma* presentaron cambios según el tipo de tratamiento (LMM, $f=14.39$, $DF=53$, $p<0.001$). En todas las concentraciones de metoxifenocida hubo un aumento en las velocidades máximas pero no fueron significativamente diferentes al grupo control (Fig. 4.). Las arañas expuestas a tiametoxam + lambdacialotrina presentaron un comportamiento contrario al observado en *H. cf. bivittata*, las arañas alcanzaron menores velocidades máximas respecto al grupo control, con diferencias significativas (contraste: $p=0.01$ para el 10%, contraste: $p=0.02$ para el 25%). También hubo diferencias entre los tratamientos metoxifenocida y tiametoxam +lambdacialotrina. La dispersión encontrada en los valores fue mayor en el tratamiento con metoxifenocida en ambas concentraciones respecto al grupo control y al grupo tratado con tiametoxan + lambdacialotrina.

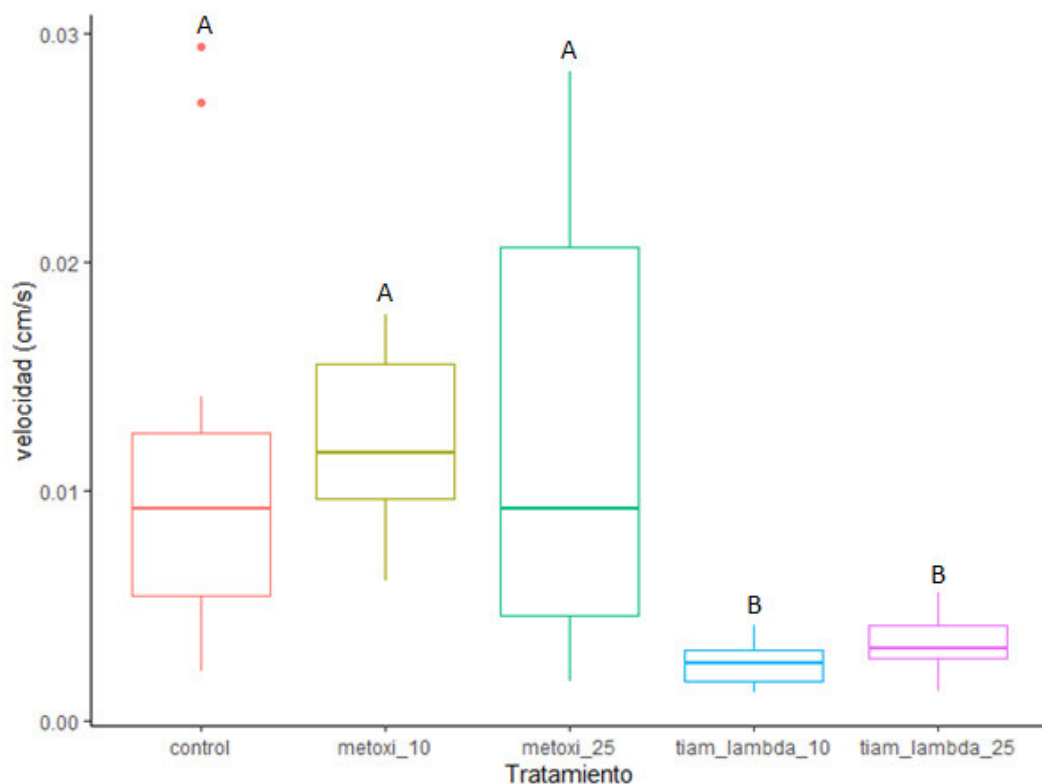


Figura 4: Box plot de los promedios de las velocidades máximas alcanzadas durante 30 min. por *L. poliostruma*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos.

Las velocidades máximas alcanzadas por ambas especies fueron diferentes, siendo *H. cf. bivittata* la que presentó mayores velocidades máximas registradas (LMM, $f=286$, $DF=146$, $p<0.001$).

Metoxifenocida produjo un aumento en la actividad de *H. cf. bivittata* y fue mayor que las del grupo control, incluso en momentos de menor actividad (Fig. 5). Se observó que los intervalos de confianza de las arañas tratadas con metoxifenocida no se solapan en los momentos de mayor actividad con el grupo control. Adicionalmente puede observarse que existe una mayor diferencia entre los períodos de alta actividad y baja actividad de las arañas tratadas con metoxifenocida respecto al grupo control. Por otro lado, las arañas tratadas con tiametoxam + lambdacialotrina presentaron una menor movilidad respecto al grupo control. También pudo observarse, que los intervalos de confianza no se solapan la mayor parte del tiempo entre las arañas tratadas con el insecticida y las del control. A las 24 hs postratamiento se observa una mayor actividad en las arañas tratadas con tiametoxam + lambdacialotrina al 10 %. A las 48 hs postratamiento las arañas tratadas con tiametoxam + lambdacialotrina al 25% aumentaron su actividad.

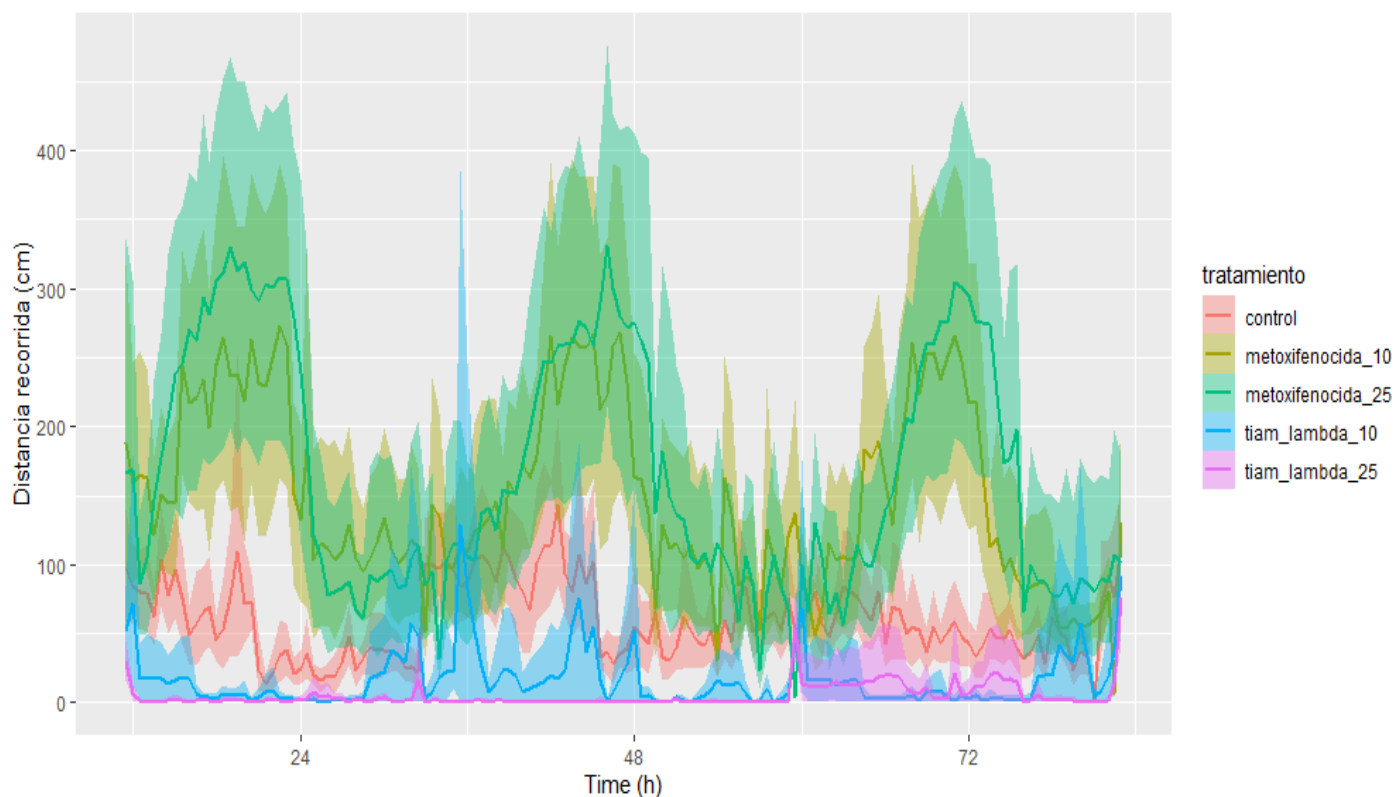


Figura 5: Promedios (indicados por las líneas) e intervalos de confianza de 95% (indicados por el sombreado) de las distancias recorridas durante 30 min, por *H. cf. bivitatta* en los distintos tratamientos durante las 72 hs postratamiento. El solapamiento de los intervalos de confianza indica que no hay diferencias significativas entre las medias calculadas. Los individuos que murieron no fueron incluidos en el análisis.

Metoxifenocida produjo un aumento en la actividad de *L. polioestoma* y *H. cf. bivitatta*, pero en *L. polioestoma* no fue mayor que las del grupo control, como se observa en el grado de solapamiento de los intervalos de confianza entre las arañas tratadas y el grupo control (Fig. 6). Adicionalmente, la actividad de las arañas tratadas con metoxifenocida fue mayor en las primeras 24 hs y fue decayendo a las 48 hs hasta alcanzar distancias similares a las del grupo control. Por otro lado, las arañas tratadas con tiametoxam + lambdacialotrina presentaron una menor movilidad respecto al grupo control en algunos intervalos de tiempo, y la actividad en general fue constante. A diferencia de lo observado con *H. cf. bivitatta*, no se ven grandes cambios entre los períodos de mayor actividad y los de menor actividad.

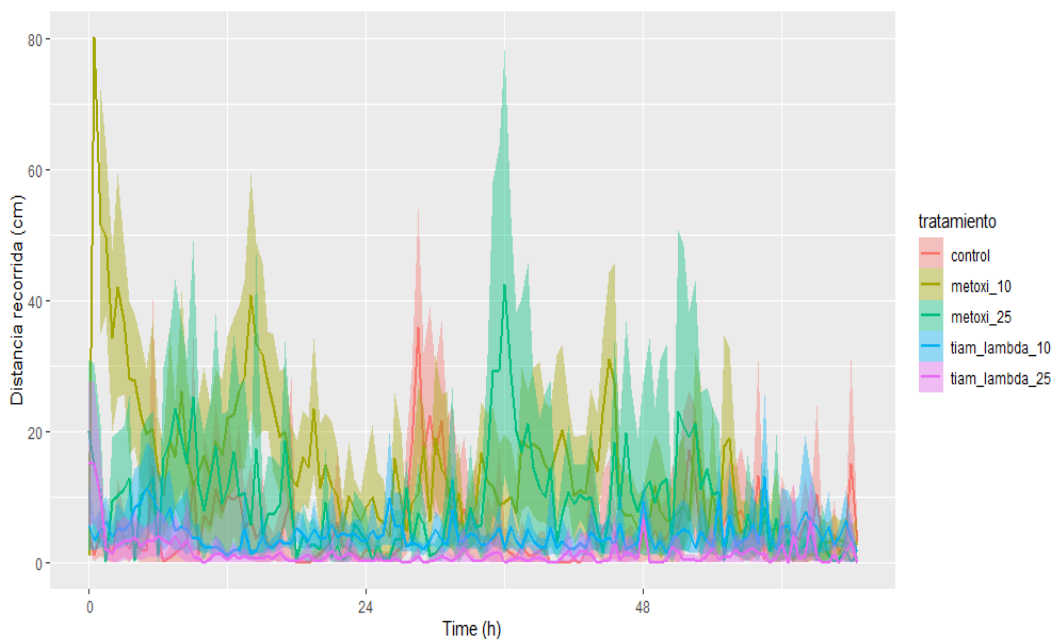


Figura 6: Promedios (indicados por las líneas) e intervalos de confianza de 95% (indicados por el sombreado) de las distancias recorridas por *L. poliostruma* en los distintos tratamientos durante las 72 hs postratamiento. El solapamiento de los intervalos de confianza indica que no hay diferencias significativas. Los individuos que murieron no fueron incluidos en el análisis

El análisis de periodicidad de la actividad de *H. cf. bivitatta* se ajustó al modelo de periodicidad de chi cuadrado (Sokolove and Bushell 1978). No todas las arañas evaluadas presentaron períodos significativos, por lo tanto no fueron consideradas en posteriores comparaciones. El grupo control de *H. cf. bivitatta* presentó ciclos de actividad de aproximadamente 26 horas, mientras los tratados con insecticidas presentaron ciclos de actividad más cortos (Fig. 7).

Al compararse los valores de los ciclos de actividad entre los tratamientos se encontró un efecto significativo del tratamiento sobre los valores de los ciclos ($f=2.62$, $p=0.046$). Se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos de tiametoxam + lambdacialotrina y el control ($p<0.001$, para las dos concentraciones) y entre los dos tratamientos de tiametoxam + lambdacialotrina y metoxifenocida al 10% ($p=0.02$ para las dos concentraciones) (Fig. 7).

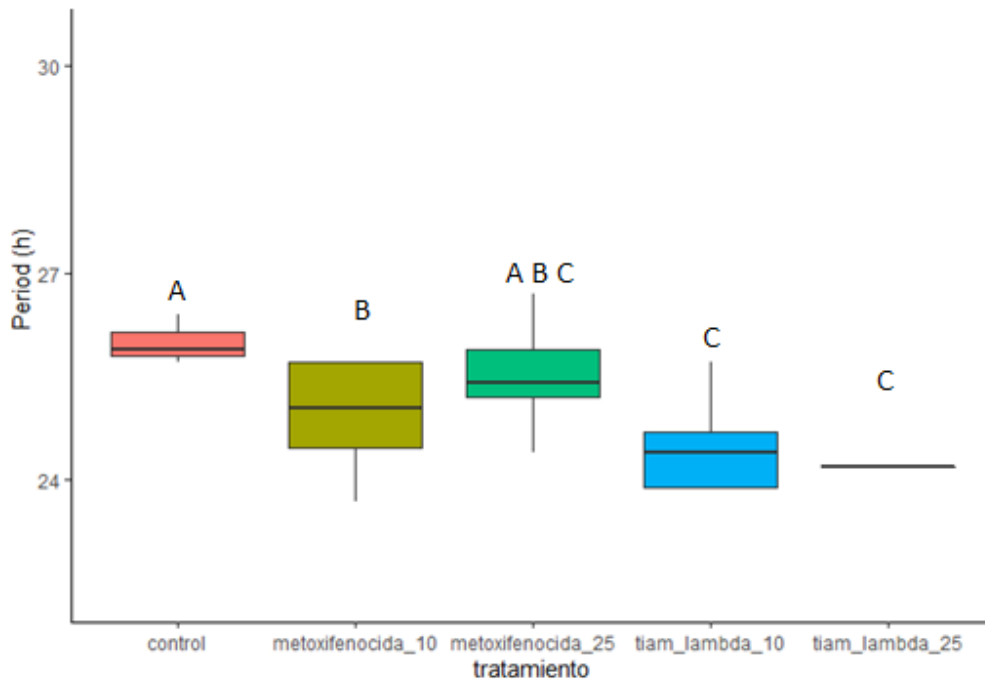


Figura 7. Duración de los ciclos de actividad de *H. cf. bivittata* entre los distintos tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos.

Los valores del poder de los componentes espectrales (power spectra) en las diferentes horas del ciclo de *H. cf. bivittata*, fueron mayores en las tratadas con insecticida que las del grupo control, siendo más pronunciado en las arañas expuestas a metoxifenocida (Fig. 8). La falta de solapamiento entre algunos de los intervalos de confianza en los tratamientos de metoxifenocida con el grupo control, concuerdan con las diferencias significativas observadas en este parámetro (Fig.8). Por lo tanto, las diferencias de actividad en los ciclos son más pronunciadas cuando las arañas son expuestas a los insecticidas, respecto al grupo control (Fig. 5). Los picos de actividad en las arañas tratadas con el tiemtoxam + lambdacialotrina son de menor duración en comparación con otros grupos experimentales (Fig. 8). Adicionalmente los tratamientos con insecticida presentaron un mayor rango en los valores del power spectra en relación al grupo control. Se observó además en los tratamientos con tiametoxam + lambdacialotrina un cambio muy pronunciado en este parámetro, pasando de los valores más bajos a los más altos en un rango de aproximadamente una hora.

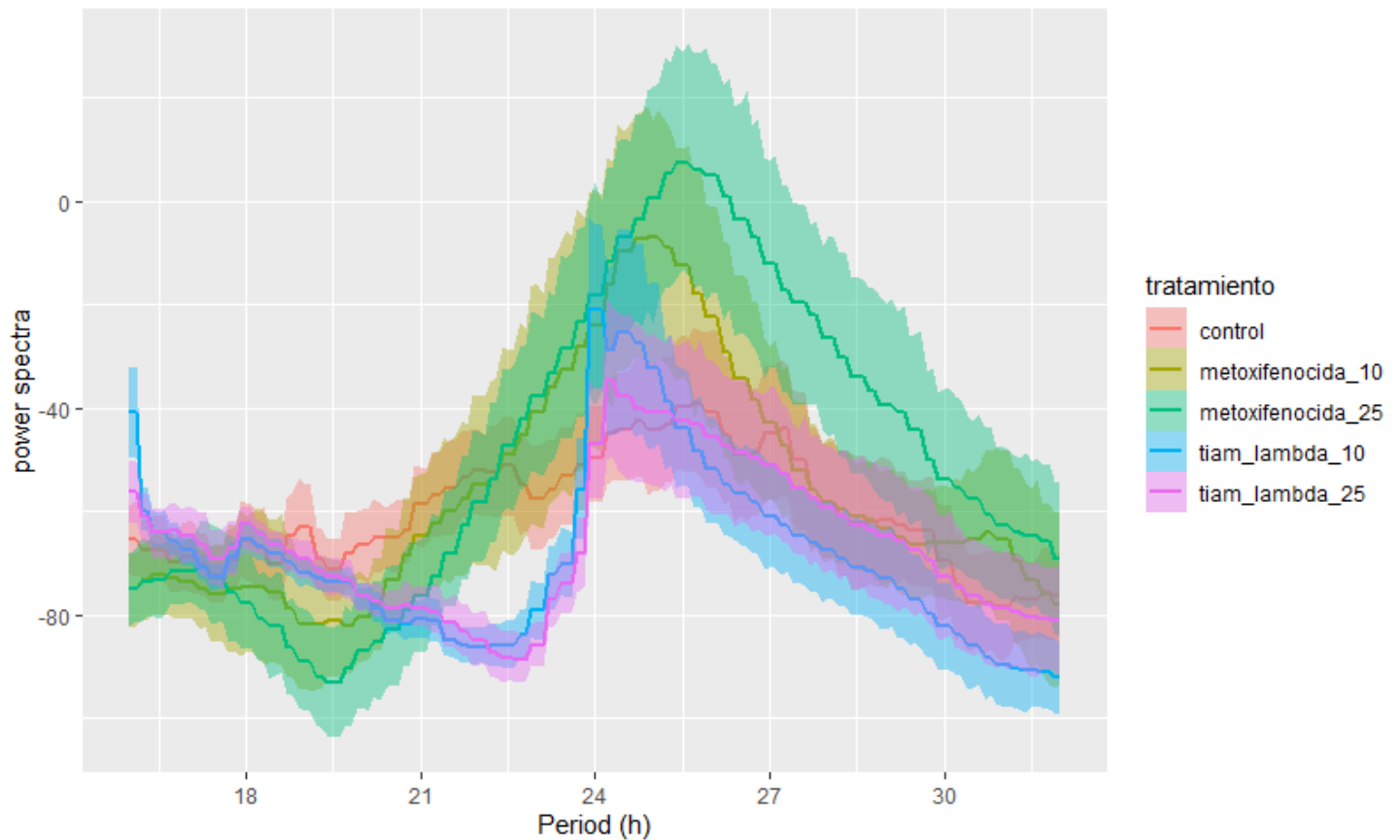


Figura 8. Promedios (indicados por las líneas) e intervalos de confianza de 95% (indicados por el sombreado) de los valores del poder de los componentes espectrales (power spectra) de *Hognia H. cf. bivitatta*. El solapamiento de los intervalos de confianza indica que no hay diferencias significativas.

Los ciclos de actividad de las arañas presentaron un efecto diferente al encontrado en *H. cf. bivitatta*, los ciclos de actividad de las arañas tratadas con los insecticidas fueron mayores al grupo control, sin embargo solo presentó diferencias significativas entre tiametoxam + lambdacialotrina al 10 % y el grupo control (contraste: $p=0.03$) (Fig. 9)

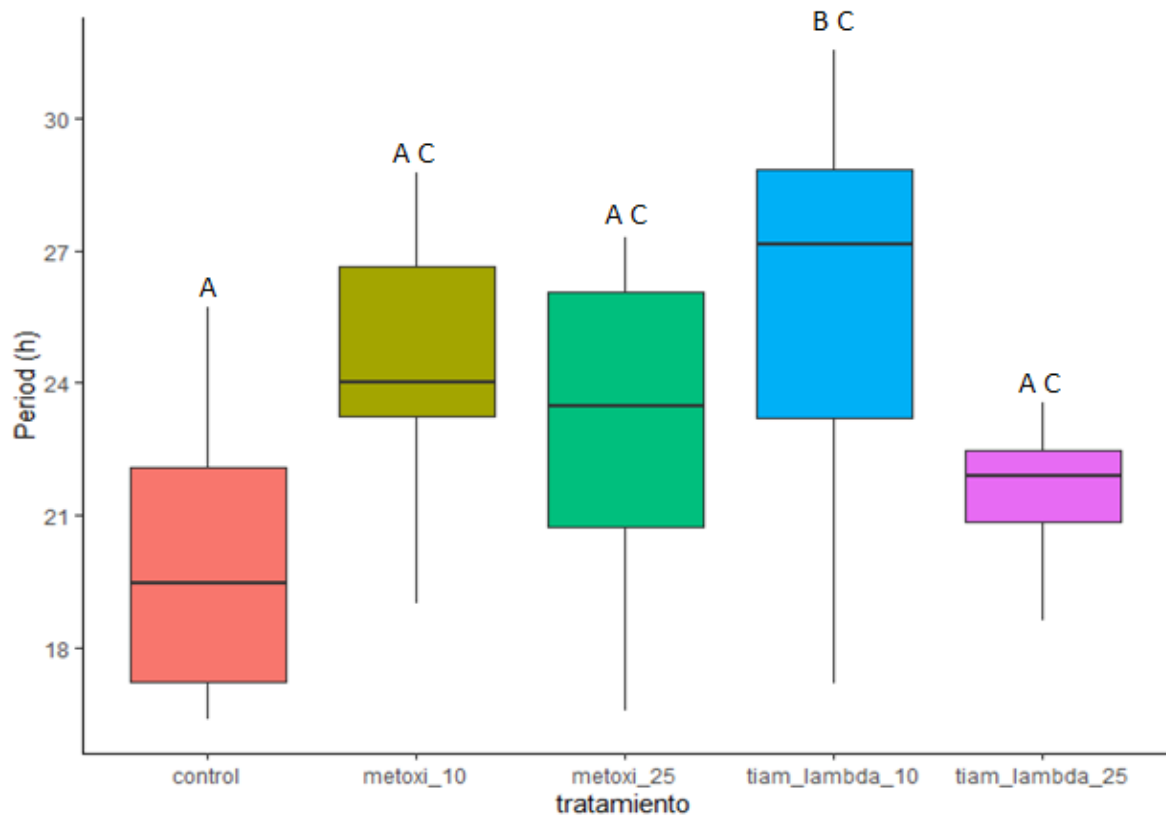


Figura 9. Duración de los ciclos de actividad de *L. polioestoma* entre los distintos tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos.

Los valores del power spectra en las diferentes horas del ciclo de *L. polisotoma* con los diferentes tratamientos, mostraron que fueron mayores ante metoxifenocida. Sin embargo, estos valores fueron más bajos que los encontrados en *H. cf. bivittata*, y no varían mucho en los momentos de mayor actividad respecto a los de menor actividad (Fig. 10). Las arañas tratadas con tiametoxam + lambdacialotrina al 10% presentaron los valores más bajos de power spectra y fueron significativamente diferentes a los del grupo control, la mayor parte del tiempo (Fig. 6). Los tratamientos con metoxifenocida presentaron valores más variados del power spectra que los demás tratamientos, indicando respuestas muy variadas en estos tratamientos, situación reflejada en la movilidad encontrada en estos tratamientos.

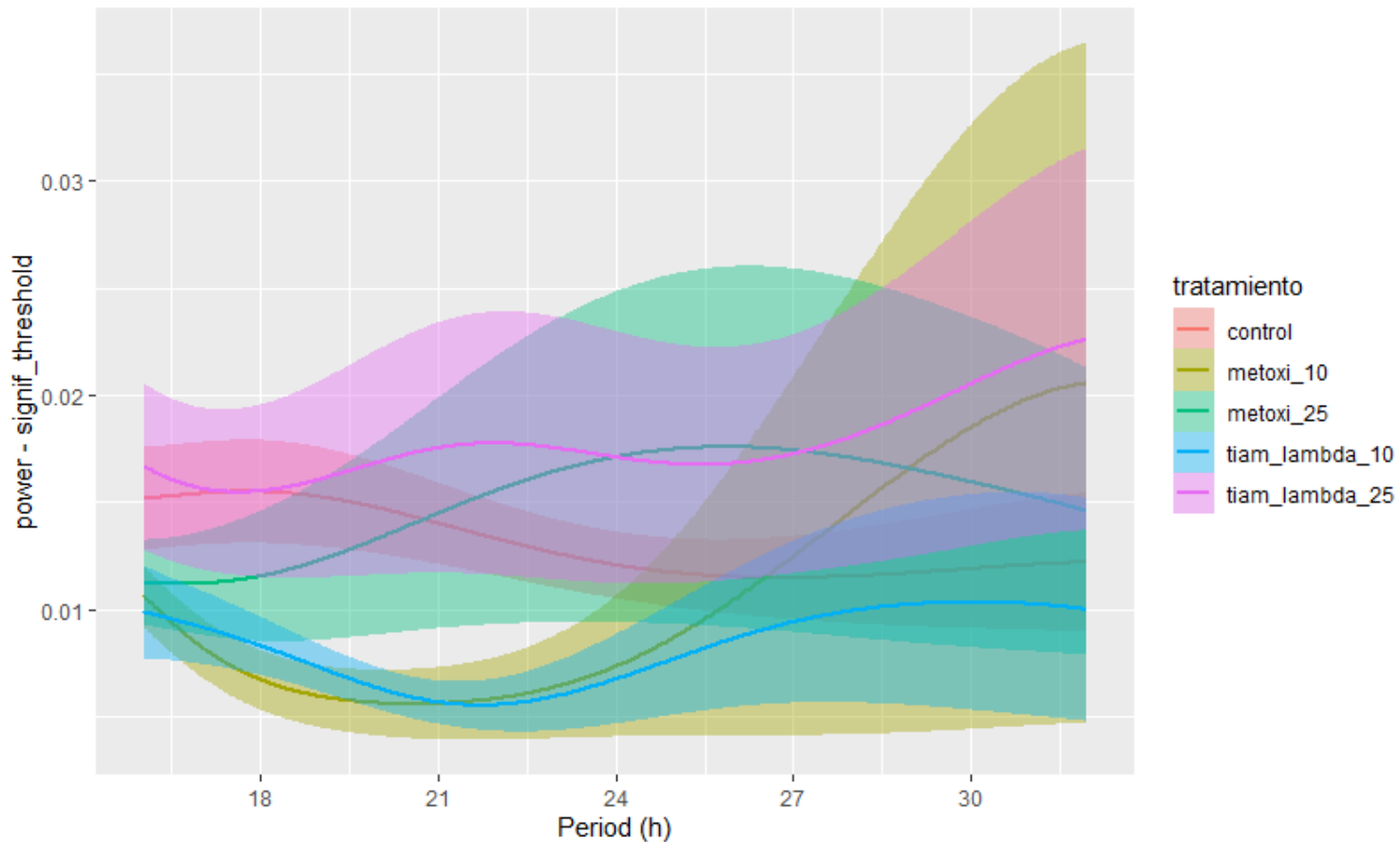


Figura 10. Promedios (indicados por las líneas) e intervalos de confianza de 95% (indicados por el sombreado) de Valores de power spectra de los periodogramas calculados de *L. polioestoma*. El solapamiento de los intervalos de confianza indica que no hay diferencias significativas.

Análisis de las actividades enzimáticas.

La mayor actividad de la AChE ocurrió en los tratamientos con metoxifenocida pero, cuando se compararon estas actividades en *L. poliostruma* no se encontraron diferencias significativas respecto a las concentraciones y tipo de insecticida (mediante GLMM) (Fig.11).

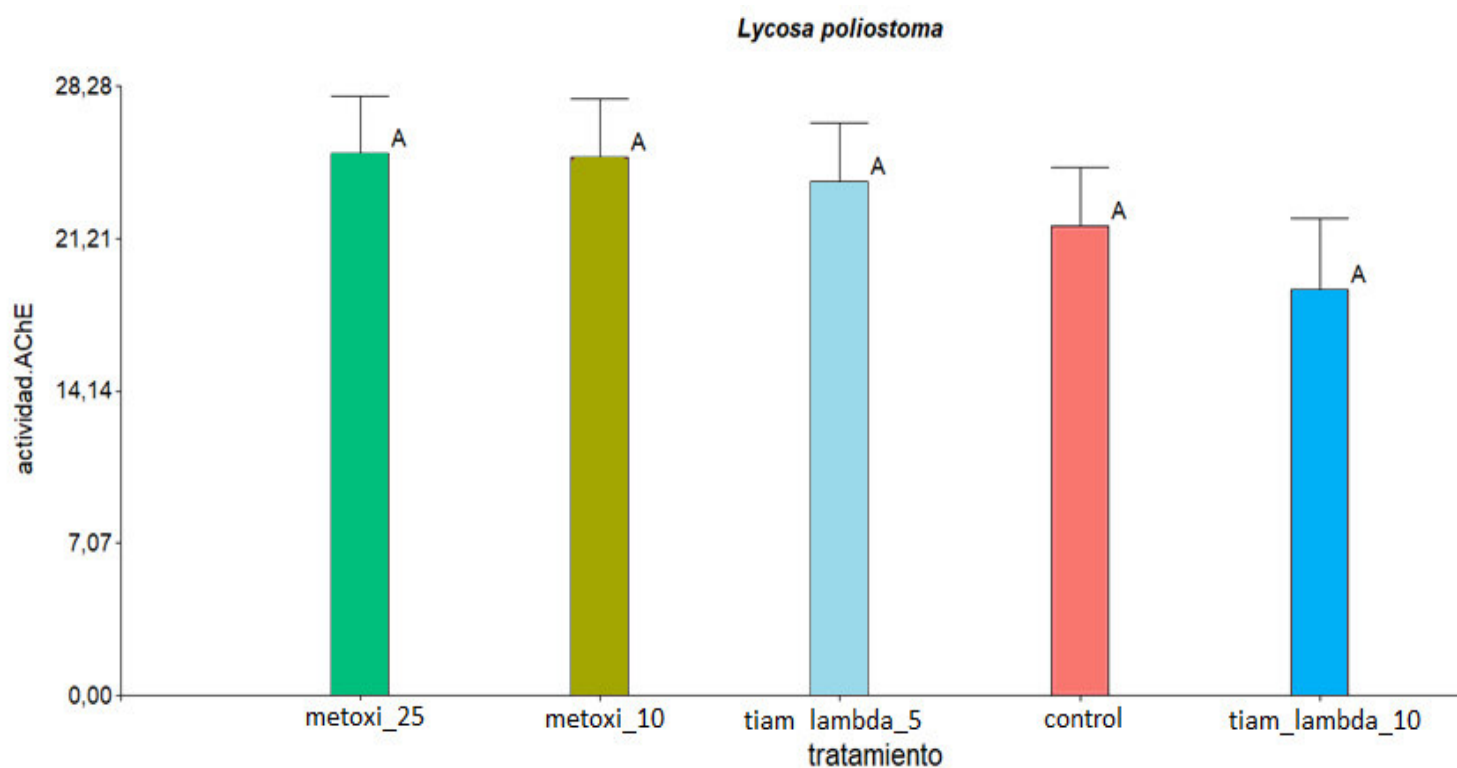


Figura 11. Medias e intervalos de confianza de la actividad de la AChE (umol/min/mgr) en *L. poliostruma* en los diferentes tratamientos. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los grupos.

Sin embargo, se encontró un cambio en la actividad de la enzima cuando se analizaron las dosis que recibió cada araña de cada insecticida de manera independiente (Fig. 12). Cuando se compararon las actividades de AChE en función de la dosis de tiametoxam + lambdacialotrina, la actividad se ajustó a un modelo polinomial de segundo orden (actividad AChE = $-59.08 X^2 + 43.59 X + 19.74$, siendo X la dosis del insecticida,

$R^2=0,27$, $p=0.01$) en este modelo se estima un aumento de la actividad de AChE en dosis más bajas llegando a una asíntota, seguida de una disminución con dosis más altas. Con el insecticida metoxifenocida la actividad de AChE tuvo un aumento de actividad siguiendo un patrón similar a un modelo de segundo orden en función de la dosis del insecticida (actividad de AChE= $-255.2 X^2 + 103.99 X + 17.68$, siendo X la dosis del insecticida, $R^2=0.33$, $p=0.002$).

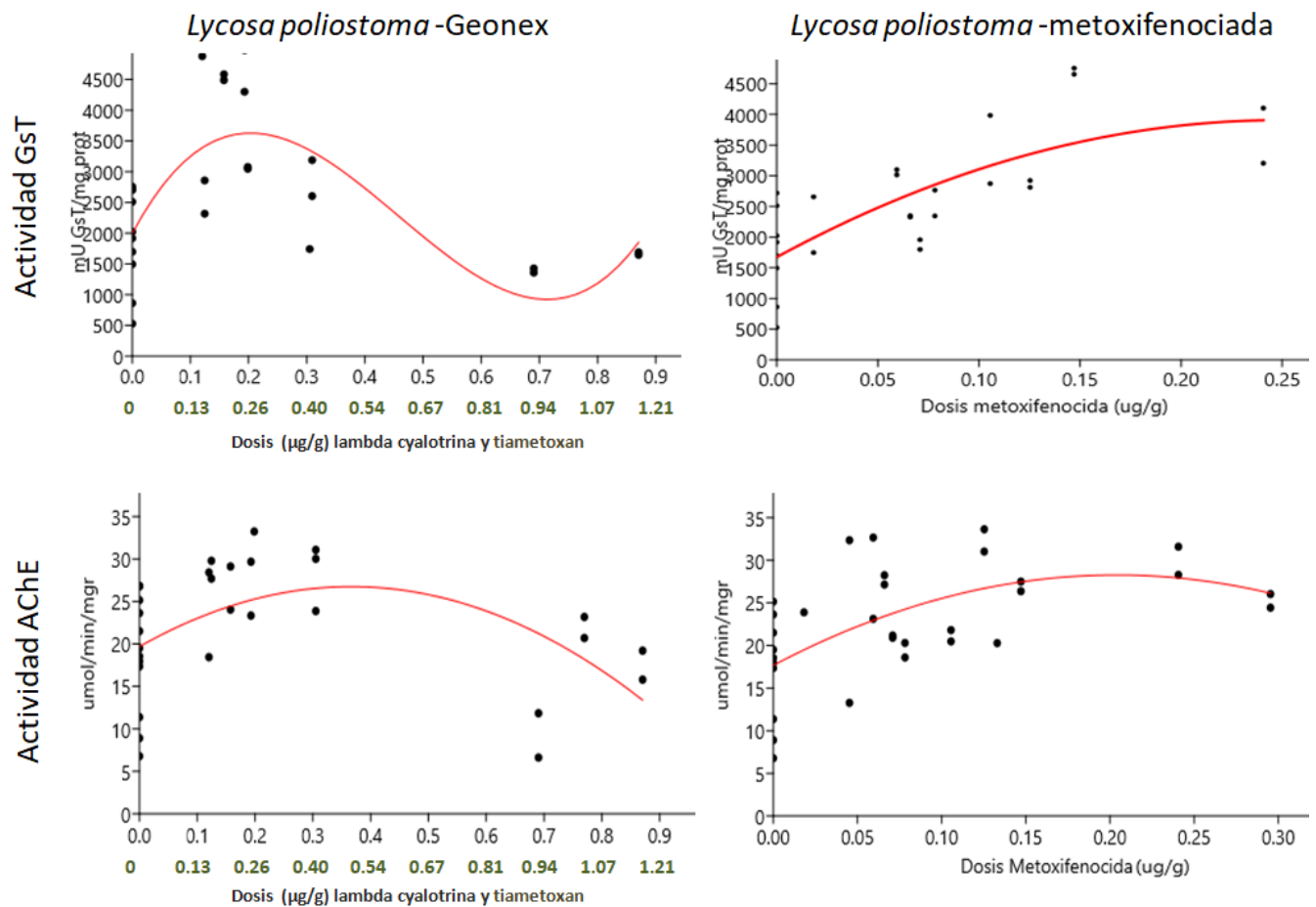


Figura 12: Actividad enzimática de GsT y AChE en *L. poliostruma* en función de la dosis en µg/g. En el caso del insecticida Engeo® en el eje de las X se dan las dosis de cada principio activo lambdacyalotrina arriba y tiametoxam debajo. Las líneas indican las regresiones de cada caso.

La actividad de la GsT en *L. poliostruma* no presentó un efecto significativo debido al tratamiento (GLMM $f=1.14$ $p=0.35$). Sin embargo, presentó diferencias significativas entre el grupo control y los tratados con tiametoxam + lambdacialotrina al 5%, $p=0.03$, mediante el análisis de contrastes (Fig.13). Adicionalmente, el comportamiento de la actividad enzimática de la GsT respecto a la dosis de insecticida se ajustó a regresiones de diferente orden, según el tipo de insecticida. Las arañas expuestas a tiametoxam + lambdacialotrina presentaron un mejor ajuste con una regresión polinomial de tercer orden (Actividad GsT = $40789.8 X^3 - 56086.5 X^2 + 17746 X + 1997$, X =dosis del insecticida, $R^2=0.52$, $p<0.001$), con un aumento de la actividad de la enzima en dosis menores y disminuyendo ante dosis altas (Fig. 12). La actividad de la GsT con las arañas tratadas con metoxifenocida presentó un aumento en función de la dosis del insecticida ajustándose a una regresión polinomial de segundo orden (Actividad GsT = $-35848.3 X^2 + 17894 X + 1675$, X =dosis del insecticida, $R^2=0.56$, $p<0.001$)(Fig.12).

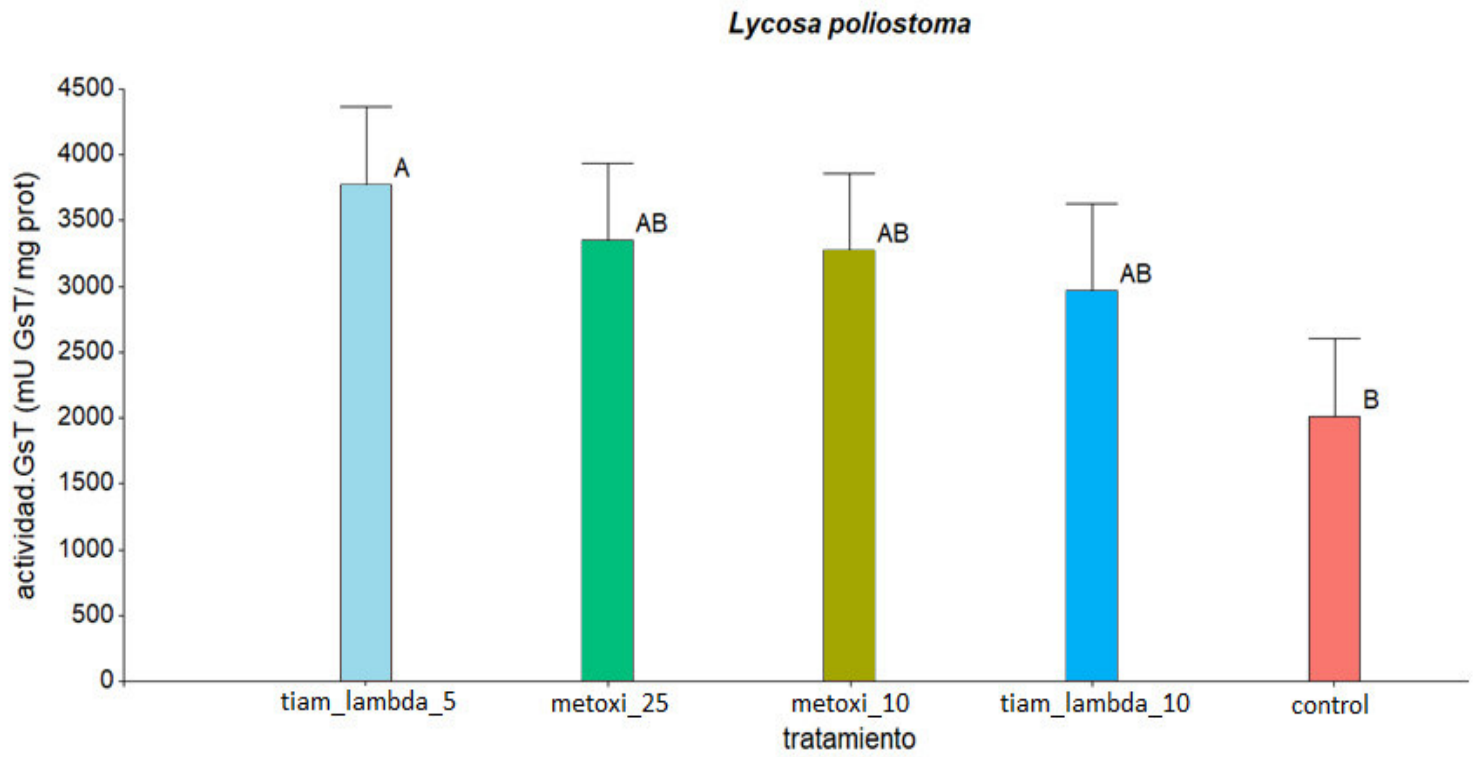


Figura 13: Medias e intervalos de confianza de la actividad de la GsT en los diferentes tratamientos. Los grupos con letras diferentes indican que hay diferencias significativas entre los grupos.

La comparación de la actividad de AChE en *H. cf. bivitatta* no presentó un efecto significativo del tratamiento (GLMM $f=1.86$, $p=1.3$). Sin embargo, la actividad de AChE presentó diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas de tiametoxam + lambda cialotrina (contraste: $p=0.04$) (Fig. 14). La comparación de la actividad de AChE en función de la dosis de insecticida, mostró una tendencia a disminuir la actividad de AChE ante Tiametoxam + lambdacialotrina pero no fue significativa (Fig. 15). Ante metoxifenocida, la actividad de AChE presentó una tendencia al aumento en función de la dosis del insecticida de manera lineal, pero dentro del límite de significancia ($1.16X+11.55$, $R^2=0.10$, $p=0.05$).

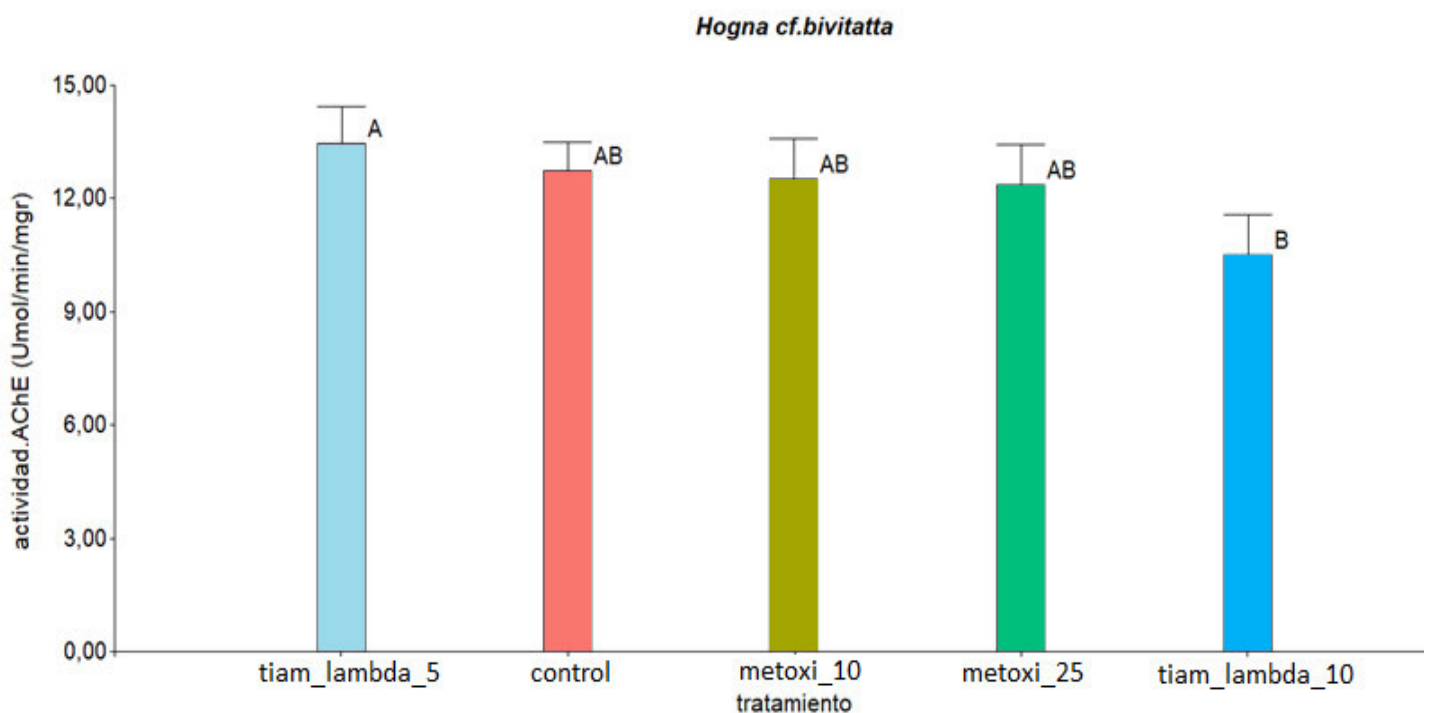


Figura 14: Medias e intervalos de confianza de la actividad de la AChE (umol/min/mgr) en *H. cf. bivitatta* en los diferentes tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos.

La actividad de la GsT en *H. cf. bivitatta* presento efectos significativos con los tratamientos (GLMM, $F=8.79$, $p<0.001$) (Fig.16). Se observaron diferencias significativas entre la actividad de GsT en las arañas expuestas a tiametoxam + lambdacialotrina respecto al grupo control (contraste: $p<0.001$, en ambas concentraciones). En las concentraciones de metoxifenocida al 10% se observaron valores significativos (contraste: $p=0.03$ con tiametoxam + lambdacialotrina a l 10%; contraste: $p=0.02$ con tiametoxam + lambdacialotrina al 5%). Respecto a las concentraciones de metoxifenocida al 25% se encontró una diferencia muy significativa en ambas comparaciones (contraste: $p<0.001$) (Fig. 15). Adicionalmente, la actividad de la GsT presentó diferencias significativas entre la concentración de metoxifenocida al 10% respecto al control (contraste: $p<0.001$)(Fig. 15).

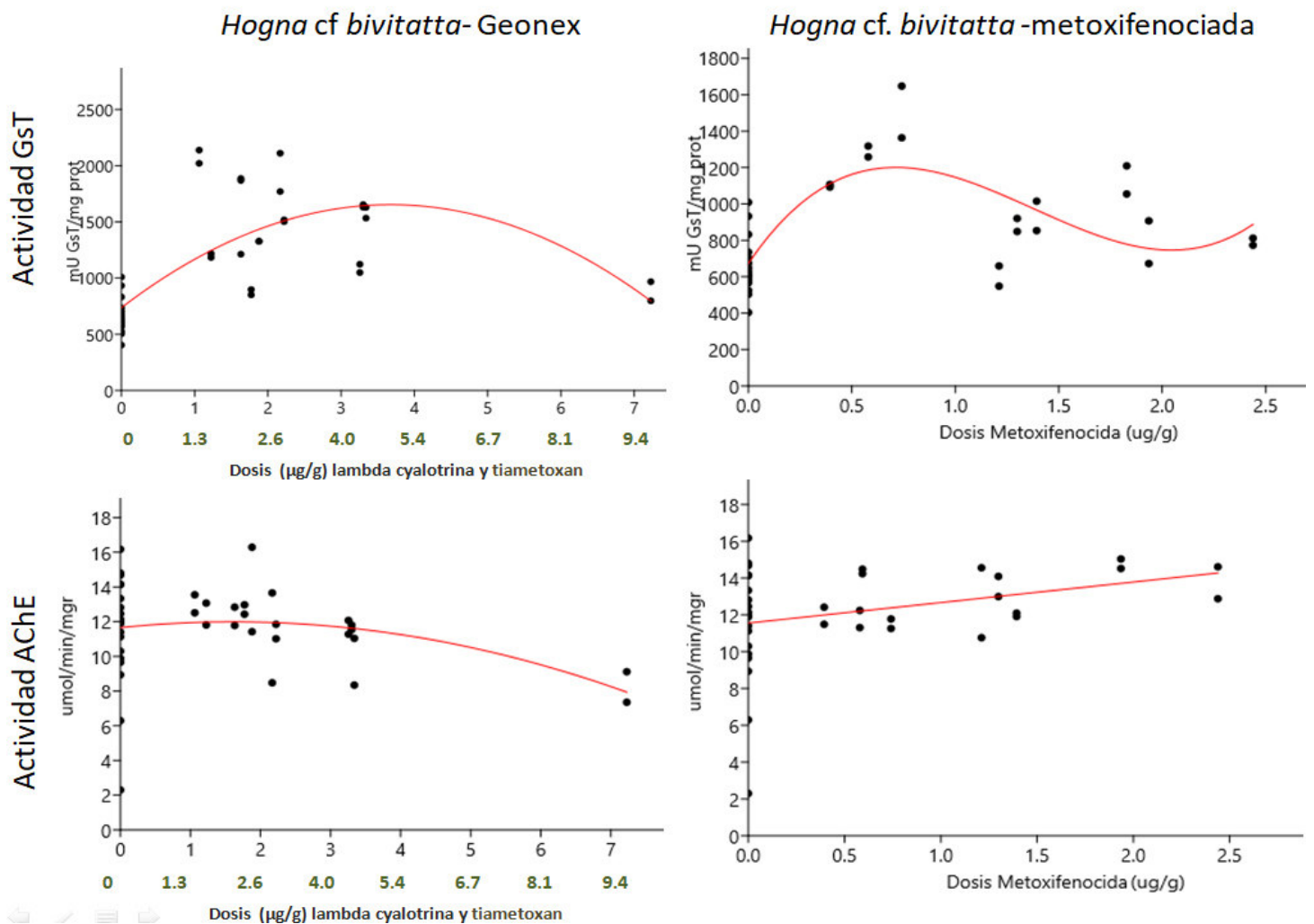


Figura 15: Actividad enzimática de GsT y AChE en *H.cf. bivitatta* en función de la dosis en µg/g. En el caso del insecticida engeo en el eje de las X se dan las dosis de cada principio activo lambda

Se encontró que la actividad enzimática respecto a la dosis de insecticida se ajustó a diferentes regresiones polinomiales según el tipo de insecticida. Las arañas expuestas a tiametoxam + lambdacialotrina presentaron un mejor ajuste a una regresión polinomial de segundo orden (Actividad GsT= $-67.9 X^2 + 499.06 X + 763.35$, X = dosis insecticida, $R^2=0.55$, $p<0.001$). La actividad de la enzima aumentó en las dosis menores y disminuyó ante dosis más altas (Fig.15). La actividad de GsT con las arañas tratadas con metoxifenocida, se ajustó a una regresión polinomial de tercer orden observando aumento de actividad de GsT en dosis más bajas y disminución en dosis más elevadas (actividad de GsT= $382.9 X^3 - 1584.14 X^2 + 1673.2 X + 673.9$, $R^2=0.47$, $p<0.001$) (Fig.15).

Al comparar las actividades enzimáticas de los grupos control de ambas especies se encontraron diferencias significativas en la actividad de GsT ($t=-4.97$, $p<0.001$) y de AChE($t=-3.66$, $p=0.002$), observando una mayor actividad en las enzimas en ambos casos de *L. poliostruma* (figuras anteriores).

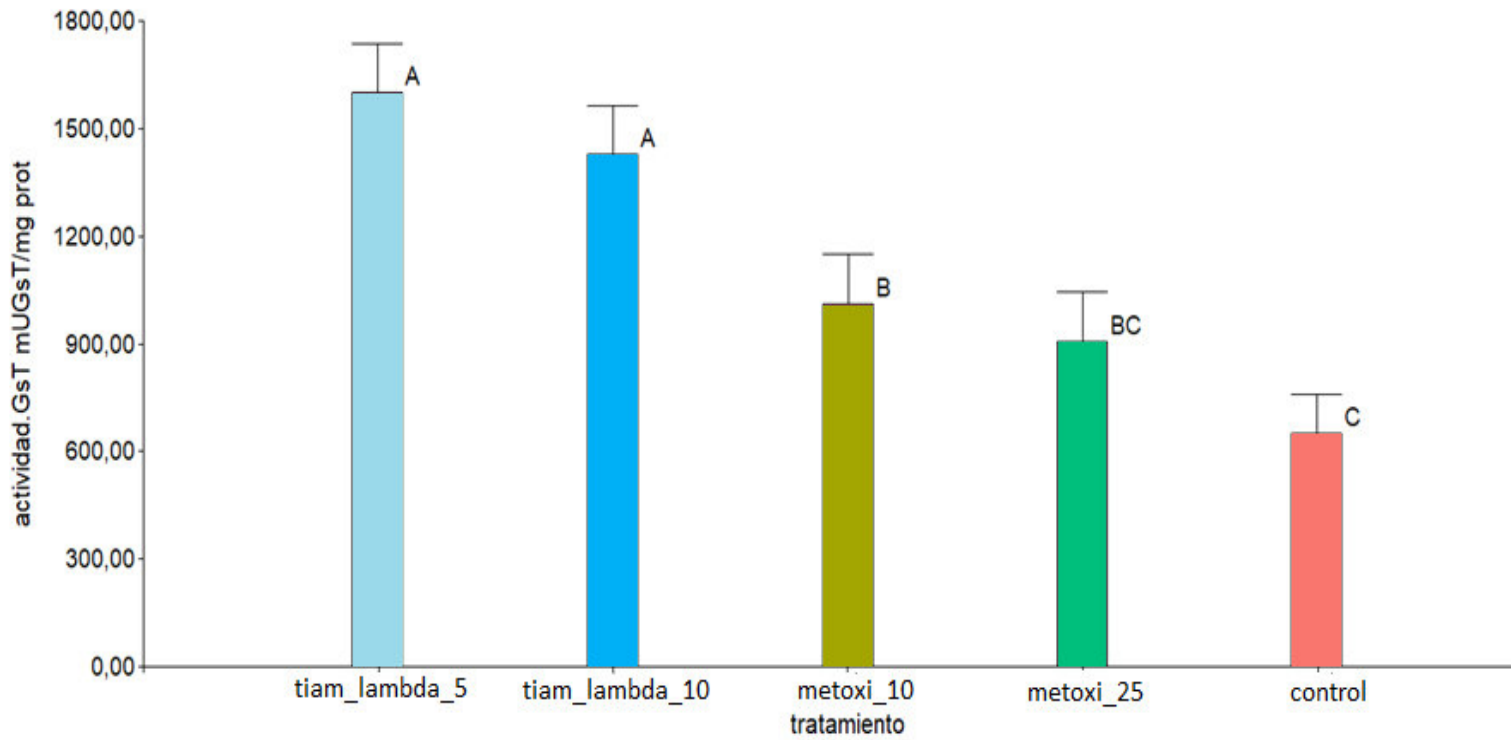


Figura 16: Medias e intervalos de confianza de la actividad de la enzima GsT en *H. cf. Bivitatta* en los diferentes tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos.

DISCUSIÓN

El efecto de los dos insecticidas sobre las dos especies de arañas fue diferente. Los cambios en la movilidad respecto al grupo control, pudo deberse a los diferentes principios activos y mecanismos de acción de los distintos insecticidas. Ante la exposición de tiametoxam + lambdacialotrina la disminución en las trayectorias que recorrían las arañas fue similar entre las especies, probablemente porque el insecticida está compuesto por un piretroide más un neonicotinoide, principios activos que afectan los canales de sodio- potasio a nivel del sistema nervioso (He, 1994). Los efectos de descoordinación de la actividad locomotora hasta parálisis fueron observados también por Pekár, (2012), y aparecen también en otros artrópodos benéficos, enemigos naturales como *Coccinella septempunctata* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera, Coccinellidae) ante tiametoxam y lambdacialotrina (Afza *et al.*, 2020). Otros neonicotinoides afectan a *Stethorus punctillum* (Weise, 1891) (Coleoptera, Coccinellidae) y *Chrysoperla rufilabris* (Burmeister, 1839) (Neuroptera, Chrysopidae) (Szczepaniec *et al.*, 2011), y abejas expuestas a imidacloprid (Lambin *et al.*, 2001). Se han registrado efectos negativos en arañas de la familia Lyniphiidae expuestas a Cipermetrina (Shaw *et al.*, 2005).

El aumento en la movilidad producido por metoxifenocida respecto a tiametoxam + lambdacialotrina en *H. cf. bivitatta*, contrasta con lo encontrado en míridos, en donde metoxifenocida no produce cambios en la movilidad (Kim *et al.*, 2006). Pese a ello, debe destacarse que en este caso particular, no se cuantificaron las distancias recorridas, lo que dificulta la evaluación de este parámetro, a efectos comparativos. En otros estudios se registró que otros agroquímicos estimulan la movilidad en insectos expuestos a concentraciones subletales de insecticidas (Tooming *et al.*, 2017) y en arañas expuestas a herbicidas (Pekár & Beneš, 2008). El aumento de la movilidad de las arañas expuestas al metoxifenocida al 10% y una reducción frente a la concentración del 25%, de *L. poliostruma* podría deberse a la hormesis, efecto que consiste en que el insecticida en bajas concentraciones produce un aumento en la actividad (movimiento) y en altas dosis produce el efecto contrario (Cutler & Guedes, 2017; Mallqui *et al.*, 2014). Este mismo efecto ha sido observado en varios insectos ante distintos insecticidas en diferentes parámetros evaluados (Cutler & Guedes, 2017; Mallqui *et al.*,

2014). El aumento en las velocidades máximas de las arañas de *H. cf. bivitatta* ante metoxifenocida coinciden con las mayores distancias recorridas, sin embargo, ante tiametoxam + lambdacialotina se registraron mayores velocidades máximas, pero menores distancias recorridas, debido probablemente a que las arañas presentaron alta movilidad en un breve período de tiempo, porque el insecticida produce una alta irritabilidad en artrópodos (Spíndola et al. 2013). Por otro lado, las arañas de *L. poliostruma* expuestas a metoxifenocida no presentaron diferencias respecto al control en sus velocidades máximas, aunque manifestaron una disminución de las velocidades cuando fueron expuestas a tiametoxam + lambdacialotrina, debido posiblemente a que los insecticidas neonicotinoides y piretroides causan ataxia (movimientos locomotores descoordinados) y postración (Punzo 1993).

La movilidad y velocidad máximas alcanzadas coinciden con los ritmos de actividad de la especie *H. cf. bivitatta*. En esta especie se vio un cambio en la movilidad más marcado entre los períodos de mayor actividad respecto a los de menor actividad, en arañas expuestas a metoxifenocida en comparación al grupo control. Este comportamiento podría explicar las mayores variaciones encontradas en la distancia recorrida cada media hora y las velocidades máximas alcanzadas. Por otro lado, ante tiametoxam + lambdacialotrina no tuvo este contraste entre los períodos de máxima y mínima actividad, lo que explica las dispersiones en los parámetros de movilidad y velocidad similares a las del grupo control. La exposición de las arañas ante metoxifenocida produjo ciclos de actividad más cortos respecto al control, que podría explicarse como una aceleración en la actividad ligada a cambios fisiológicos en las arañas. Los ritmos de actividad en artrópodos corresponden a diversos cambios en el sistema nervioso, como el conjunto de proteínas PER y CRY y expresión de genes como timeless (tim), doubletime (dbt), dClock (dClk), existentes en la escala zoológica, desde artrópodos hasta mamíferos (Panda et al., 2002). Estos cambios mencionados podrían manifestarse en las arañas expuestas al metoxifenocida, ya que se ha encontrado, que la expresión de genes relacionados a la detoxificación pueden ser regulados por los ritmos circadianos (Hamby et al., 2013). Por otro lado, los ciclos de actividad de las arañas de *H. cf. bivitatta* expuestas a tiametoxam + lambdacialotrina, aunque fueron más cortos no pueden asociarse con una aceleración ya que las arañas presentaron picos de actividad muy variados y posiblemente la disminución en los ciclos de actividad se deban a los efectos que tienen los piretroides y neonicotinoides

sobre el sistema nervioso, como ataxia y parálisis (Afza *et al.*, 2020; Pekár, 2012; Shaw *et al.*, 2006).

La diferencia en los efectos de los insecticidas encontrados en *L. poliostruma* respecto a *H. cf. bivittata*, no fueron significativamente diferentes a los del grupo control, esto puede deberse a que *L. poliostruma* tiene una amplia variación de respuestas a los insecticidas, que se evidenciaron en las grandes dispersiones de los resultados encontrados. Las diferencias encontradas entre las arañas tratadas con tiemetoxam + lambdacialotrina al 10% en los valores del power spectra fueron los más bajos, indicando que la variación entre los periodos de alta actividad y menor actividad no son marcadas, por lo tanto no podríamos afirmar que hay un cambio en los ritmos de actividad de *L. poliostruma*.

Lycosa poliostruma y *H. cf. bivittata* ante metoxifenocida presentaron mayor variación en las respuestas comportamentales de movilidad y velocidad, reflejándose en esto las mayores dispersiones encontradas. Por lo tanto, surge la hipótesis de que la baja toxicidad del insecticida produciría diferentes respuestas en los individuos de la misma especie asociadas a componentes genéticos y o ambientales.

Considerando la actividad enzimática, las arañas presentaron diferentes respuestas fisiológicas cuando fueron expuestas a los insecticidas, esta afirmación se ve reflejada en los diferentes ajustes a las regresiones polinomiales encontradas entre la dosis del insecticida y la actividad de cada enzima. En *L. poliostruma* la actividad de la AChE presentó una respuesta similar a una hormensis con el tiemetoxam + lambdacialotrina, esta repuesta fue diferente para el caso de *H. cf. bivittata*, se vio una disminución menos significativa, esto estaría indicando que la actividad de la actividad de la AChE se ve afectada por la aplicación de tiemetoxam+lambdacialotrina. El efecto podría explicarse porque los principios activos del insecticida actúan uniéndose a los receptores nicotínicos de la acetilcolina del sistema nervioso de los insectos (Wiesner & Kayser, 2000). En contraste con estos resultados, el metoxifenocida, que actúa a nivel hormonal, no produjo el mismo efecto en la AChE en las dos especies, sólo se observó un aumento de la AChE para *L. poliostruma*. Se han registrado en otros estudios, una disminución de la actividad de la AChE en abejas *Apis mellifera* expuesta al insecticida foliar del tipo organofosforado Bracket[®] (acefato 97%), sin embargo con otros insecticidas no se vio ningún efecto (Zhu *et al.*, 2017). Cabe destacar que varios de estos trabajos evalúan la

comparación de tratamientos (Kocamaz & Oruc, 2020; Laino & Garcia, 2020; Wilczek *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2017) y no la concentración que recibe cada individuo como en el presente estudio. Los diferentes pesos de las arañas generaron variación en los resultados que no permiten apreciar diferencias en los tratamientos. Pese a lo escaso de este tipo de evaluación, hay trabajos evaluando los efectos de las radiaciones sobre las actividades enzimáticas en abejas, donde al igual que en este estudio, se ajustaron a regresiones polinomiales de segundo y tercer orden (Gagnaire *et al.*, 2019).

La variedad de la actividad de la GsT en ambas especies, en los dos insecticidas evaluados y en las dosis recibidas por las arañas, se debió a que esta enzima es una barrera fisiológica para la desintoxicación, ya que modifica los xenobióticos solubles en agua para facilitar su excreción (Habig *et al.*, 1974). En las arañas expuestas a tiametoxam + lambdacialotrina se observó un proceso similar a la hormesis registrado en varios insectos (Cutler & Guedes, 2017), ante bajas dosis del insecticida, hay un estímulo en la actividad enzimática y a altas dosis una disminución, cuando las dosis del insecticida se acerca a la letalidad (Cutler & Guedes, 2017). La diferente respuesta de las actividades enzimáticas entre las especies expuestas a metoxifenocida, aumentando en *L. poliostruma* y similar a una hormesis en *H. cf. bivittata*, podría deberse a que las concentraciones de metoxifenocida son menos letales que las de tiametoxam + lamndacialotrina y a que las arañas presentan actividades enzimáticas diferentes. *L. poliostruma* es una especie que tiene mucho más actividad de las enzimas de AChE y GST que *H. cf. bivittata*, incluso en los grupos control, marcando diferentes estrategias de defensa y de detoxificación ante xenobióticos, que pueden explicar las diferencias encontradas.

Considerando que la baja actividad de la AChE está relacionada a una hiperactividad (Pekár, 2012), el aumento de movilidad y actividad de la enzima observado en las arañas expuestas a metoxifenocida, parecen contradictorios. Posiblemente, podrían estar ocurriendo otros procesos fisiológicos no evaluados en este trabajo, que expliquen porque hay un aumento en la movilidad de las especies, aun teniendo un aumento en la actividad de la AChE.

En este trabajo se observa que las arañas responden fisiológicamente y comportalmente a los insecticidas, los cambios vistos en la movilidad y las actividades enzimáticas indican que los individuos desencadenan una serie de respuestas que involucran el

proceso de detoxificación. Es conocido que los mecanismos fisiológicos de desintoxicación son procesos que incluyen un paquete de enzimas que aceleran la excreción de xenobióticos (Wilczek *et al.*, 2004; Wilczek *et al.*, 2003). En el caso particular ante metoxifenocida, el aumento en la movilidad de las arañas podría jugar un papel importante en la desintoxicación ya que el movimiento en las arañas se produce por cambios en las presiones de la hemolinfa (Foelix, 2011). La actividad locomotora es un comportamiento que aumenta la circulación y podría permitir excretar rápidamente el xenobiótico. Esta respuesta ya ha sido registrada en cangrejos de la especie *Trichodactylus borellianus* (Nobili, 1896), que luego de ser expuestos a insecticidas aumentaron su metabolismo y locomoción (Montagna & Collins, 2008). En *L. poliostruma* ante metoxifenocida se observó en las primeras 48 horas postratamiento un aumento en la movilidad y que se redujo luego de las 48 horas, posiblemente en dicho tiempo puedan metabolizar el insecticida. Algunos trabajos sugieren que metoxifenocida es de rápida metabolización en himenópteros (Schneider *et al.*, 2008). Hay trabajos que proponen que la irritabilidad es un comportamiento que podría ser adaptativo frente a la exposición de los organismos a xenobióticos (Gould, 1984), también podría ser un comportamiento relacionado a la metabolización y excreción del organismo, pero se necesitan estudios que evalúen las movildades de las arañas y la capacidad de excreción de xenobióticos.

A nivel general la exposición a tiametoxan + lambdacialotrina causa efectos nocivos sobre las arañas en concentraciones similares a metoxifenocida. Por ello, es esperable que tiametoxan + lamndacialotina cause mayores efectos a corto plazo sobre los enemigos naturales respecto a metoxifenocida. la diferencia de efectos que tuvieron los insecticidas tanto a nivel comportamental en la movilidad, la velocidad de períodos de actividad en general y la actividad enzimática en ambas especies, indicaría que existen distintos mecanismos en cada especie para reaccionar ante los insecticidas. Sin embargo, algunos efectos fueron similares como el aumento en las actividades de la GsT y en la movilidad cuando las arañas estuvieron expuestas a metoxifenocida, indicando respuestas conservativas a los insecticidas dentro de las especies de esta familia. Futuros estudios deberían vincular las respuestas a los insecticidas con aspectos evolutivos, para lograr entender como estas especies se encuentran asociadas a los agroecosistemas

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Los insecticidas evaluados en este trabajo, tiametoxam + lambdacialotrina y metoxifenocida, impactaron a las especies *L. poliostruma* y *H. cf. bivittata*, a nivel letal y subletal. En el caso de los subletales se vieron reflejados en distintos aspectos a nivel comportamental como la captura de presas, movilidad, los ritmos de actividad y efectos fisiológicos como actividad enzimática. El insecticida de amplio espectro tiametoxam + lambdacialotrina produce efectos más nocivos en las arañas en comparación al metoxifenocida, reflejado en la mayor mortalidad encontrada, la reducción en la captura de presas y la movilidad. Se ha encontrado que el tiametoxam suele producir mortalidad en enemigos naturales (Prabhaker et al., 2011; Yao et al., 2015; Řezáč et al., 2019a,b) y en menor medida la lambdacialotrina (Cloyd, 2012). Sin embargo algunos trabajos plantean que cuando estos principios activos se combinan en un solo insecticida pueden producir efectos sinérgicos aumentando su mortalidad (Asogwa et al., 2011). Por otro lado, el metoxifenocida tuvo una tasa de mortalidad menor y por lo tanto parece ser menos nocivo para las arañas. Resultados similares se han encontrado con otros enemigos naturales en el que el insecticida metoxifenocida causa muy baja mortalidad (Schneider et al., 2008; Řezáč et al., 2010). No obstante se ha encontrado que puede disminuir la fecundidad en algunos insectos (Kim et al., 2006).

Respecto a los efectos subletales encontrados a nivel comportamental y fisiológico para el insecticida tiametoxam + lambdacialotrina, tanto para *L. poliostruma* como para *H. cf. bivittata* se encontraron efectos adversos. La falta de movilidad que fue producida por el insecticida tiametoxam + lambdacialotrina fue uno de los aspectos más determinantes, pues puede influir en varios factores relacionados con la sobrevivencia, dentro de ellas la reducción en la captura de presas. Esto último se ha registrado en otras especies con insecticidas considerados de amplio espectro (Benamú et al. 2007, 2013; Hanna & Hanna, 2013). La pérdida de movilidad también se ha encontrado como un efecto subletal en otros enemigos naturales contaminados con piretroides, neonicotinoides, y organofosforados en altas dosis, este efecto es atribuido a los principios activos de los insecticidas que actúan produciendo una desregulación de la sinapsis en el sistema nervioso (Baatrup & Bayley, 1993; Campos et al., 2011; Shaw et al., 2006). Los cambios que se vieron en los ritmos de actividad también pueden explicarse por el factor mencionado anteriormente.

Por otro lado, el metoxifenocida parece ser relativamente inocuo para algunos procesos como la captura de presas, sin embargo las arañas expuestas a este insecticida tuvieron cambios en los otros comportamientos evaluados como la movilidad y los ritmos de actividad. El aumento en la movilidad observado en ambas especies y los cambios en los ritmos de actividad observados en *H. cf. bivitatta* podrían asociarse a variaciones en procesos fisiológicos, debido a que estos involucran cambios en la expresión de genes y actividades enzimáticas (Panda et al., 2002; Tietjen & Cady, 2007). El aumento en la movilidad ha sido registrado para algunos insecticidas como organofosforados en isópodos de la especie *Porcellio scaber* (Latreille, 1804) (Baatrup & Bayley, 1993; Bayley & Baatrup, 1996), pero es la primera vez que se registra con este tipo de insecticida en arañas. Por otro lado, el cambio en los ritmos de actividad observado en *H. cf. bivitatta* puede asociarse con cambios fisiológicos en las actividades enzimáticas. A pesar que el metoxifenocida ha sido recomendado debido a la compatibilidad que se ha demostrado en otros enemigos naturales (Brunner et al., 2001; Hewa-Kapuge et al., 2003; Schneider et al., 2008; Gentz et al., 2010; Rimoldi et al., 2012), los efectos obtenidos en este estudio sugieren que el insecticida sí estaría produciendo efectos que pueden repercutir en la sobrevivencia de estas especies.

Los efectos a nivel fisiológico de las actividades enzimáticas de la GsT y AChE muestran que el tiametoxam + lambdacialotrina produce mayores efectos en este nivel que el metoxifenocida. La GsT es una de las principales enzimas de desintoxicación relacionada a el metabolismo de xenobioticos de los organismos (Sheehan et al. 2001) y su actividad vario más que la AChE, que actúa a nivel de proteínas asociadas a la sinapsis neuronal. Estos cambios enzimáticos se han registrado para varios piretroides y organofosforados (Laino & Garcia, 2020; Van Erp *et al.*, 2002), por lo tanto ambas especies de arañas respondieron fisiológicamente a ambos insecticidas. El hecho de que el aumento de movilidad se viera también reflejado en una disminución de la AChE era un posible resultado esperado, ya que la AChE disminuye la acetilcolina que es el neurotransmisor responsable de la sinapsis neuronal, pero no fue observado en este estudio, probablemente haya otros procesos no evaluados aquí que expliquen porque hay un aumento en la movilidad y no una disminución de la actividad de AChE en ninguna de las especies estudiadas.

Si bien ambas especies tienen tamaños muy diferentes presentaron CL₅₀ similares en ambos insecticidas, efecto que no se mantuvo con las demás variables evaluadas en este

trabajo. Los cambios comportamentales de las arañas expuestas a los insecticidas, fueron más evidentes en *H. cf. bivitatta* indicando una mayor magnitud de los efectos para esta especie. Otro aspecto a destacar es que fisiológicamente son muy diferentes, en los grupos control de ambas especies *L. poliostruma* tiene mayor actividad enzimática que *H. cf. Bivitatta*, por lo cual es esperable que bajo condiciones naturales este fenómeno se repita. Se ha encontrado que en algunas especies las enzimas relacionadas al metabolismo de xenobioticos como la GsT ya tiene elevadas tasas de actividad sin necesidad de estar expuestas al xenobiotico. Estas diferencias tanto a nivel comportamental como fisiológico podría explicar el porqué pese a la diferencia del tamaño presentan CL₅₀ similares.

Estos resultados, muestran en general la relevancia que tiene abordar los estudios ecotoxicológicos desde una perspectiva multidisciplinaria, incluyendo estudios comportamentales complementados con aproximaciones fisiológicas que permitan explicar los cambios observados en los organismos usados como modelo de estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Afza, R., M. A. Riaz, and M. Afzal. 2020. Sublethal Effect of Six Insecticides on Predatory Activity and Survival of *Coccinella Septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) Following Contact with Contaminated Prey and Residues. *Gesunde Pflanz.* 72:77–86.
- Altieri, M., and C. Nicholls. 2002. Una perspectiva agroecológica para una agricultura ambientalmente sana y socialmente más justa en la América Latina del siglo XXI. Leff, E. y otros (comps.) *La transición hacia el desarrollo sustentable. Perspectiva para América Latina y el Caribe.* Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Instituto Nacional de Ecología, 286-289.
- Armendano, A., and A. González. 2010. Comunidad de arañas (Arachnida, Araneae) del cultivo de alfalfa (*Medicago sativa*) en Buenos Aires, Argentina. *Rev. Biol. Trop.* 58:757–767.
- Armendano, A., and A. González. 2011. Spider fauna associated with wheat crops and adjacent habitats in Buenos Aires, Argentina. *Rev. Mex. Biodivers.* 82:1176–1182.
- Asogwa, B. C., S. T. Penda, and W. L. Lawal. 2011. Application of Data Envelopment Analysis to Evaluate Farm Resource Management of Nigerian Farmers. *J. Agric. Sci.* 2:9–15.
- Avalos, G., Bar, M. E., Oscherov, E. B., & González, A. 2013. Diversidad de Araneae en cultivos de *Citrus sinensis* (Rutaceae) de la Provincia de Corrientes, Argentina. *Rev. de Biol. Trop.*, 61: 1243-1260.
- Baatrup, E., and M. Bayley. 1993. Effects of the pyrethroid insecticide cypermethrin on the locomotor activity of the wolf spider *Pardosa amentata*: Quantitative analysis employing computer-automated video tracking. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 26:138–152.
- Bayley, M., and E. Baatrup. 1996. Pesticide uptake and locomotor behaviour in the woodlouse: An experimental study employing video tracking and ¹⁴C-labelling. *Ecotoxicology* 5:35–45.

- Benamú, M. A. 2010. Composición y estructura de la comunidad de arañas en el sistema de cultivo de soja transgénica. Universidad Nacional de La Plata.
- Benamú, M. A., M. Lacava, L. F. García, M. Santana, and C. Viera. 2017a. Spiders associated with agroecosystems: Roles and perspectives. Pp. 275–302 in *Behaviour and Ecology of Spiders: Contributions from the Neotropical Region*. Springer International Publishing.
- Benamú, M. A., M. I. Schneider, A. González, and N. E. Sánchez. 2013. Short and long-term effects of three neurotoxic insecticides on biological and behavioural attributes of the orb-web spider *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae): Implications for IPM programs. *Ecotoxicology* 22:1155–1164.
- Benamú, M. A., M. I. Schneider, S. Pineda, N. E. Sanchez, and A. Gonzalez. 2007. Sublethal effects of two neurotoxic insecticides on *Araneus pratensis* (Araneae: Araneidae). *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 72:557–559.
- Benamú, M. A., M. I. Schneider, and N. E. Sánchez. 2010a. Effects of the herbicide glyphosate on biological attributes of *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae), in laboratory. *Chemosphere* 78:871–876.
- Benamu, M., and P. Aguilar. 2001. Araneofauna presente en huertos de manzano del valle de mala, Lima. *Rev. Peru. Entomol.* 199–210.
- Benamú, M., M. Lacava, L. F. García, M. Santana, J. Fang, X. Wang, and S. J. Blamires. 2017b. Nanostructural and mechanical property changes to spider silk as a consequence of insecticide exposure. *Chemosphere* 181:241–249.
- Bishop, L., & Riechert, S. E. 1990. Spider colonization of agroecosystems: mode and source. *Environ. Entomol.*, 19: 1738-1745.
- Blibech, I., M. Ksantini, T. Jardak, and M. Bouaziz. 2015. Effect of Insecticides on *Trichogramma* Parasitoids Used in Biological Control against *Prays oleae* Insect Pest. *Adv. Chem. Eng. Sci.* 5:362–372.
- Blum, A., I. Narbondo, and Oy. 2008a. ¿ Dónde nos lleva el camino de la soja ? Sojización a la uruguay Princ. impactos socioambientales, Uruguay, RAP-AL 42.
- Blum, A., I. Narbondo, G. Oyhançabal, and D. Sancho. 2008b. Soja transgénica y sus

- impactos en Uruguay. La nueva colonización. RAP-AL Uruguay 197.
- Bouvet, J. P. R., A. Urbaneja, M. Pérez-Hedo, and C. Monzó. 2019. Contribution of predation to the biological control of a key herbivorous pest in citrus agroecosystems. *J. Anim. Ecol.* 88:915–926.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Brunner, J. F., J. E. Dunley, M. D. Doerr, and E. H. Beers. 2001. Effect of pesticides on *Colpoclypeus florus* (Hymenoptera: Eulophidae) and *Trichogramma platneri* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), parasitoids of leafrollers in Washington. *J. Econ. Entomol.* 94:1075–1084.
- Buddle, C. M., and A. L. Rypstra. 2003. Factors initiating emigration of two wolf spider species (Araneae: Lycosidae) in an agroecosystem. *Environ. Entomol.* 32:88–95.
- Bueno, A. de F., G. A. Carvalho, A. C. dos Santos, D. R. Sosa-Gómez, and D. M. da Silva. 2017. Seletividade de agrotóxicos nos inimigos naturais: Desafios e restrições para a pesquisa e recomendações de campo. Universidade Federal de Santa Maria.
- Campos, M. R., M. C. Picanço, J. C. Martins, A. C. Tomaz, and R. N. C. Guedes. 2011. Insecticide selectivity and behavioral response of the earwig *Doru luteipes*. *Crop Prot.* 30:1535–1540. Elsevier Ltd.
- Capocasale, R. 2001. Redescrición de *Lycosa poliostruma* (C. L. Koch) (Araneae, Lycosidae). *Rev. Ibér. Aracnol.* 3:79–86.
- Cardoso, P., S. Pekár, R. Jocqué, J. A. Coddington, and C. Catterall. 2011. Global Patterns of Guild Composition and Functional Diversity of Spiders. *PLoS One* 6:e21710. Stanford University Press.
- Carlson, G. R., T. S. Dhadialla, R. Hunter, R. K. Jansson, C. S. Jany, Z. Lidert, and R. A. Slawecki. 2001. The chemical and biological properties of methoxyfenozide, a new insecticidal ecdysteroid agonist. *Pest Manag. Sci.* 57:115–119.
- Céspedes-Payret, C., G. Piñeiro, M. Achkar, O. Gutierrez, and D. Panario. 2009. The

- irruption of new agro-industrial technologies in Uruguay and their environmental impacts on soil, water supply and biodiversity: A review. *Int. J. Environ. Heal.* 3:175–197.
- Cloyd, R. A. 2012. Indirect effects of pesticides on natural enemies. Pp. 127–150 *in* R. . Soundararajan, ed. *Pesticides—Advances in Chemical and Botanical Pesticides*. In Tech, Rijeka, Croatia.
- Connell, D. W., P. Lam, B. Richardson, and Wu.R. 2009. *Introduction to Ecotoxicology*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Cutler, G., and R. N. C. Guedes. 2017. Occurrence and significance of insecticide-induced hormesis in insects. *ACS Symp. Ser.* 1249:101–119.
- Dinter, A., and H.-M. Poehling. 1995. Side-effects of insecticides on two erigonid spider species. *Entomol. Exp. Appl.* 74:151–163. John Wiley & Sons, Ltd.
- Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres, and R. M. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88–95.
- Escobar-Ramírez, S., I. Grassa, I. Armbrecht, and T. Tschardt. 2019. Biological control of the coffee berry borer: Main natural enemies, control success, and landscape influence. *Biol. Control* 136:103992.
- Etchegoyen, M., A. Ronco, P. Almada, M. Abelando, and D. Marino. 2017. Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. *Environ. Monit. Assess.* 189:63.
- Fernandes, F. L., L. Bacci, and M. S. Fernandes. 2010. Impact and Selectivity of Insecticides to Predators and Parasitoids. *EntomoBrasilis* 3:1–10. Entomo Brasilis.
- Foelix, R. F. 2011. *Biology of spiders*. Oxford University Press.
- Ford, M. J., and S. Url. 2013. Metabolic Costs of the Predation Strategy of the Spider *Pardosa amentata* (Clerck) (Lycosidae). *Oecologia* 28:333–340.
- Gagnaire, B., M. Bonnet, S. Tchamitchian, I. Cavalié, C. Della-Vedova, N. Dubourg, C. Adam-Guillermin, J. L. Brunet, and L. P. Belzunces. 2019. Physiological effects of

- gamma irradiation in the honeybee, *Apis mellifera*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 174:153–163. Elsevier Inc.
- Gajski, D., and S. Pekár. 2021. Assessment of the biocontrol potential of natural enemies against psyllid populations in a pear tree orchard during spring. *Pest Manag. Sci.* 6262. John Wiley and Sons Ltd.
- García, L. F., E. Núñez, M. Lacava, H. Silva, S. Martínez, and J. Pétilon. 2021. Experimental assessment of trophic ecology in a generalist spider predator: Implications for biocontrol in Uruguayan crops. *J. Appl. Entomol.* 145:82–91.
- Geissmann, Q., L. G. Rodriguez, E. J. Beckwith, and G. F. Gilestro. 2018. Rethomics: An R framework to analyse high-throughput behavioural data. *bioRxiv* 1–19.
- Gentz, M. C., G. Murdoch, and G. F. King. 2010. Tandem use of selective insecticides and natural enemies for effective, reduced-risk pest management. *Biol. Control* 52:208–215. Academic Press.
- Giuggia, J., G. Boito, D. Giovanini, A. Crenna, and U. Gerardo. 2011. Eficiencia de control de “orugas defoliadoras” en soja (*Glycine max* L.), con insecticidas neurotóxicos y reguladores del crecimiento de los insectos. *Rev. la Fac. Ciencias Agrar. Univ. Nac. Cuyo* 43:143–153.
- Goldberger, J. R., and N. Lehrer. 2016. Biological control adoption in western U.S. orchard systems: Results from grower surveys. *Biol. Control* 102:101–111.
- González, A., G. Liljesthröm, E. Minervino, D. Castro, S. González, and A. Armendano. 2009. Predation by *Misumenops pallidus* (Araneae: Thomisidae) on insect pests of soybean cultures in Buenos Aires Province, Argentina. *J. Arachnol.* 37:282–286.
- Gould, F. 1984. Role of Behavior in the Evolution of Insect Adaptation to Insecticides and Resistant Host Plants. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 30:34–41.
- Greenop, A., A. Cecelja, B. A. Woodcock, A. Wilby, S. M. Cook, and R. F. Pywell. 2019. Two common invertebrate predators show varying predation responses to different types of sentinel prey. *J. Appl. Entomol.* 143:380–386.
- Habig, W. H., and W. B. Jakoby. 1981. Assays for Differentiation of Glutathione S-

- Transferases. *Methods Enzymol.* 77:398–405. Academic Press.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, and W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249:7130–7139.
- Hamby, K. A., R. S. Kwok, F. G. Zalom, and J. C. Chiu. 2013. Integrating Circadian Activity and Gene Expression Profiles to Predict Chronotoxicity of *Drosophila suzukii* Response to Insecticides. *PLoS One* 8.
- Hanna, C., and C. Hanna. 2013. The lethal and sublethal effects of three pesticides on the striped lynx spider (*Oxyopes salticus* Hentz). *J. Appl. Entomol.* 137:68–76.
- He, F. 1994. Chapter 6 Synthetic pyrethroids. *Toxicology* 91:43–49. Elsevier.
- Hewa-Kapuge, S., S. McDougall, and A. A. Hoffmann. 2003. Effects of methoxyfenozide, indoxacarb, and other insecticides on the beneficial egg parasitoid *Trichograftitna* nr. *brassicae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) under laboratory and field conditions. *J. Econ. Entomol.* 96:1083–1090.
- Hewlett, J. A., A. Szczepaniec, and M. D. Eubanks. 2019. The effects of sugarcane aphid density in sorghum on predation by lady beetles and lacewings. *Biol. Control* 129:171–177. Academic Press.
- Hothorn, T., F. Bretz, P. Westfall, R. M. Heiberger, A. Schuetzenmeister, and S. Scheibe. 2016. Package “multcomp” Title Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Proj. Stat. Comput.* Vienna, Austria. 1–36.
- INIA. 2018. Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de soja período 2017. *Evaluación Cultiv. Unidad Comun. y Transf. Tecnol.* 1–93.
- Ishijima, C., A. Taguchi, M. Takagi, T. Motobayashi, M. Nakai, and Y. Kunimi. 2006. Observational evidence that the diet of wolf spiders (Araneae: Lycosidae) in paddies temporarily depends on dipterous insects. *Appl. Entomol. Zool.* 41:195–200.
- Kim, D. S., D. J. Brooks, and H. Riedl. 2006. Lethal and sublethal effects of abamectin, spinosad, methoxyfenozide and acetamiprid on the predaceous plant bug *Deraeocoris brevis* in the laboratory. *BioControl* 51:465–484.

- Kocamaz, D., and E. Oruc. 2020. Effect of Thiamethoxam and λ Cyhalothrin, Administered Individually and in Mixture on the Endocrine Function and Antioxidant Defense of Gonads of *Oreochromis niloticus*. *Pak. J. Zool.* 52:1085–1093.
- Koss, A. M., A. S. Jensen, A. Schreiber, K. S. Pike, and W. E. Snyder. 2005. Comparison of predator and pest communities in Washington potato fields treated with broad-spectrum, selective, or organic insecticides. *Environ. Entomol.* 34:87–95.
- Kreiter, N. A., and D. H. Wise. 2001. Prey availability limits fecundity and influences the movement pattern of female fishing spiders. *Oecologia* 127:417–424.
- Lacava, M. 2014. Versatilidad Predadora De Las Arañas Lobo (Araneae, Lycosidae) Y Su Efecto Sobre Insectos De Importancia Económica En Soja . Tesis de Maestría, PEDECIBA, UdelaR. Montevideo, Uruguay.
- Lacava, M., L. F. Garcia, J. P. Burla, R. Tambasco, V. Franco, and C. Viera. 2020. Abundancia t fenología de artrópodos depredadores en soja: análisis preliminar. *Boletín la Soc. Zoológica del Uruguay* 29:150–159.
- Lacava, M., L. F. García, C. Viera, and R. Michalko. 2021. The pest-specific effects of glyphosate on functional response of a wolf spider. *Chemosphere* 262.
- Laino, A., and C. F. Garcia. 2020. Study of the effect of cypermethrin on the spider *Polybetes phytagicus* in different energy states. *Pestic. Biochem. Physiol.* 165.
- Lambin, M., C. Armengaud, S. Raymond, and M. Gauthier. 2001. Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 48:129–134.
- MacFadyen, S., R. H. Gibson, W. O. C. Symondson, and J. Memmott. 2011. Landscape structure influences modularity patterns in farm food webs: Consequences for pest control. *Ecol. Appl.* 21:516–524.
- Mallqui, K. S. V., J. L. Vieira, R. N. C. Guedes, and L. M. Gontijo. 2014. Azadirachtin-induced hormesis mediating shift in fecundity-longevity trade-off in the mexican bean weevil (*Chrysomelidae: Bruchinae*). *J. Econ. Entomol.* 107:860–866.

- Marc, P., and A. Canard. 1997. Maintaining spider biodiversity in agroecosystems as a tool in pest control. *Agric. Ecosyst. Environ.* 62:229–235.
- Markó, V., B. Keresztes, M. T. Fountain, and J. V. Cross. 2009. Prey availability, pesticides and the abundance of orchard spider communities. *Biol. Control* 48:115–124. Elsevier Inc.
- Martinou, A. F., and M. C. Stavriniades. 2015. Effects of sublethal concentrations of insecticides on the functional response of two mirid generalist predators. *PLoS One* 10:1–10.
- Michalko, R., and O. Košulič. 2016. Temperature-dependent effect of two neurotoxic insecticides on predatory potential of *Philodromus* spiders. *J. Pest Sci.* (2004). 89:517–527. Springer Verlag.
- Michalko, R., S. Pekár, M. Dul'a, and M. H. Entling. 2019. Global patterns in the biocontrol efficacy of spiders: A meta-analysis. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 28:1366–1378.
- Montagna, M. C., and P. A. Collins. 2008. Oxygen consumption and ammonia excretion of the freshwater crab *Trichodactylus borellianus* exposed to chlorpyrifos and endosulfan insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 92:150–155. Elsevier Inc.
- Nentwig, W. (ed). 2013. *Spider Ecophysiology*. Springer, Bern, Switzerland.
- Noldus, L. P. J. J., A. J. Spink, and R. A. J. Tegelenbosch. 2001. EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behav. Res. Methods, Instruments, Comput.* 33:398–414. Psychonomic Society Inc.
- Nyffeler, M., and G. Benz. 1988. Feeding ecology and predatory importance of wolf spiders (*Pardosa* spp.) (Araneae, Lycosidae) in winter wheat fields. *J. Appl. Entomol.* 106:123–134. John Wiley & Sons, Ltd.
- Nyffeler, M., and K. D. Sunderland. 2003. Composition, abundance and pest control potential of spider communities in agroecosystems: a comparison of European and US studies. *Agric. Ecosyst. Environ.* 95:579–612.
- Panda, S., J. B. Hogenesch, and S. A. Kay. 2002. Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 417:329–335.

- Park, Y.-C., J.-S. Yoo, and J.-P. Kim. 2007. Diversity of Spider Communities in a Pesticide-treated Pine (*Pinus densiflora*) Forest. *J. Ecol. Environ.* 30:179–186.
- Pedersen, L. F., L. G. Dall, B. C. Sørensen, D. Mayntz, and S. Toft. 2002. Effects of hunger level and nutrient balance on survival and acetylcholinesterase activity of dimethoate exposed wolf spiders. *Entomol. Exp. Appl.* 103:197–204.
- Pekár, S. 2013. Side effect of synthetic pesticides on spiders. Pp. 415–427 in W. Nentwig, ed. *Spider Ecophysiology*. Springer New York LLC.
- Pekár, S. 2012. Spiders (Araneae) in the pesticide world: An ecotoxicological review. *Pest Manag. Sci.* 68:1438–1446.
- Pekár, S. 2002. Susceptibility of the spider *Theridion impressum* to 17 pesticides. *Anzeiger für Schadlingskd.* 75:51–55.
- Pekár, S., and J. Beneš. 2008. Aged pesticide residues are detrimental to agrobiont spiders (Araneae). *J. Appl. Entomol.* 132:614–622. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111).
- Pekar, S., and M. Brabec. 2016. Modern analysis of biological data: generalized linear models in R. Masarykova univerzita, Brno, República Checa.
- Pekár, S., and C. R. Haddad. 2005. Can agrobiont spiders (Araneae) avoid a surface with pesticide residues? *Pest Manag. Sci.* 61:1179–1185.
- Peng, Y., X. L. Shao, G. C. Hose, F. X. Liu, and J. Chen. 2010. Dimethoate, fenvalerate and their mixture affects *Hylyphantes graminicola* (Araneae: Linyphiidae) adults and their unexposed offspring. *Agric. For. Entomol.* 12:343–351.
- Persons, M. H., and A. L. Rypstra. 2001. Wolf Spiders Show Graded Antipredator Behavior in the Presence of Chemical Cues from Different Sized Predators. *J. Chem. Ecol.* 27:2493–2504. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers.
- Persons, M. H., and G. W. Uetz. 1997. The effect of prey movement on attack behavior and patch residence decision rules of wolf spiders (Araneae: Lycosidae). *J. Insect Behav.* 10:737–752. Springer US.
- Prabhaker, N., S. J. Castle, S. E. Naranjo, N. C. Toscano, and J. G. Morse. 2011.

- Compatibility of two systemic neonicotinoids, imidacloprid and thiamethoxam, with various natural enemies of agricultural pests. *J. Econ. Entomol.* 104:773–781.
- Punzo, F. 1993. Detoxification enzymes and the effects of temperature on the toxicity of pyrethroids to the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp.* 105:155–158.
- Rendon, D., M. E. A. Whitehouse, N. R. Hulugalle, and P. W. Taylor. 2015. Influence of crop management and environmental factors on wolf spider assemblages (Araneae: Lycosidae) in an Australian cotton cropping system. *Environ. Entomol.* 44:174–185.
- Řezáč, M., S. Pekár, and J. Stará. 2010. The negative effect of some selective insecticides on the functional response of a potential biological control agent, the spider *Philodromus cespitum*. *BioControl* 55:503–510.
- Řezáč, M., V. Řezáčová, and P. Heneberg. 2019a. Contact application of neonicotinoids suppresses the predation rate in different densities of prey and induces paralysis of common farmland spiders. *Sci. Rep.* 9:1–9.
- Řezáč, M., V. Řezáčová, and P. Heneberg. 2019b. Neonicotinoid insecticides limit the potential of spiders to re-colonize disturbed agroecosystems when using silk-mediated dispersal. *Sci. Rep.* 9:1–10.
- Riechert, S. E., and T. Lockley. 1984. Spiders as Biological Control Agents. *Annu. Rev. Entomol.* 29:299–320. Annual Reviews Inc. , Palo Alto.
- Rimoldi, F., M. I. Schneider, and A. E. Ronco. 2012. Short and long-term effects of endosulfan, cypermethrin, spinosad, and methoxyfenozide on adults of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). *J. Econ. Entomol.* 105:1982–1987.
- Rodrigues, E. N. L., M. de S. Mendonça, L. L. Fritz, E. A. Heinrichs, and L. Fiuza. 2013. Effect of the insecticide lambda-cyhalothrin on rice spider populations in southern Brazil. *Zoologia* 30:615–622.
- Ronco, A. E., P. Carriquiriborde, G. S. Natale, M. L. Martin, H. Mugni, and C. Bonetto. 2008. Integrated approach for the assessment of biotech soybean pesticides impact on low order stream ecosystems of the pampasic region. *Ecosyst. Ecol. Res.*

Trends 209–239.

- Rovner, J. S. 1980. Morphological and ethological adaptations for prey capture in wolf spiders (Araneae, Lycosidae). *J. Arachnol.* 8:201–215.
- Royauté, R., C. M. Buddle, and C. Vincent. 2015. Under the influence: Sublethal exposure to an insecticide affects personality expression in a jumping spider. *Funct. Ecol.* 29:962–970.
- Schneider, M. I., N. Sanchez, S. Pineda, H. Chi, and a. Ronco. 2009. Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach. *Chemosphere* 76:1451–1455. Elsevier Ltd.
- Schneider, M., G. Smagghe, S. Pineda, and E. Viñuela. 2008b. The ecological impact of four IGR insecticides in adults of *Hyposoter didymator* (Hym., Ichneumonidae): Pharmacokinetics approach. *Ecotoxicology* 17:181–188.
- Seyfollahi, F., M. Esfandiari, M. S. Mossadegh, and A. Rasekh. 2019. Functional Response of *Hyperaspis polita* (Coleoptera, Coccinellidae) to the Recently Invaded Mealybug *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera, Pseudococcidae). *Neotrop. Entomol.* 48:484–495. Springer US.
- Shaw, E. M., M. Waddicor, and A. M. Langan. 2006. Impact of cypermethrin on feeding behaviour and mortality of the spider *Pardosa amentata* in arenas with artificial ‘vegetation.’ *Pest Manag. Sci.* 62:64–68.
- Shaw, E. M., C. P. Wheeler, and A. M. Langan. 2005. The effects of cypermethrin on *Tenuiphantes tenuis* (Blackwall, 1852): development of a technique for assessing the impact of pesticides on web building in spiders (Araneae : Linyphiidae). *Acta Zool. Bulg. Supplément*:173–179.
- Sheehan, D., G. Meade, V. M. Foley, and C. A. Dowd. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360:1–16.
- Sinha, S., P. S. Routh, P. D. Anno, and J. P. Castagna. 2005. Spectral decomposition of seismic data with continuous-wavelet transform. *Geophysics* 70:19–26.

- Sokolove, P. G., and N. Bushell. 1978. The Chi Square Periodogram : Its Utility for Analysis of Circadian Rhythms. *J. Theor. Biol.* 72:131–160.
- Spíndola, A. F., C. S. A. Silva-Torres, A. R. S. Rodrigues, and J. B. Torres. 2013. Survival and behavioural responses of the predatory ladybird beetle, *Eriopis connexa* populations susceptible and resistant to a pyrethroid insecticide. *Bull. Entomol. Res.* 103:485–494.
- Suenaga, H., and T. Hamamura. 2015. Effects of manipulated density of the wolf spider, *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae), on pest populations and cabbage yield: a field enclosure experiment. *Appl. Entomol. Zool.* 50:89–97.
- Sunderland, K., and F. Samu. 2000. Effects of agricultural diversification on the abundance, distribution, and pest control potential of spiders: a review. *Entomol. Exp. Appl.* 95:1–13.
- Szczepaniec, A., S. F. Creary, K. L. Laskowski, J. P. Nyrop, and M. J. Raupp. 2011. Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid Causes Outbreaks of Spider Mites on Elm Trees in Urban Landscapes. *PLoS One* 6:e20018. Public Library of Science.
- Tahir, H. M., T. Basheer, S. Ali, R. Yaqoob, S. Naseem, and S. Y. Khan. 2019. Effect of pesticides on biological control potential of *Neoscona theisi* (Araneae: Araneidae). *J. Insect Sci.* 19:17.
- Thangavel, K., R. K. M. Baskaran, and K. Suresh. 2018. Field efficacy of ready mix formulation, Alika 247 ZC (Thiamethoxam 12.6% + Lambda cyhalothrin 9.5%) against major pests on Onion. *Ann. Plant Prot. Sci.* 26:16. Diva Enterprises Private Limited.
- Tietjen, W. J., and A. B. Cady. 2007. Sublethal exposure to a neurotoxic pesticide affects activity rhythms and patterns of four spider species. *J. Arachnol.* 35:396–406.
- Tooming, E., E. Merivee, A. Must, M. I. Merivee, I. Sibul, K. Nurme, and I. H. Williams. 2017. Behavioural effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam on the predatory insect *Platynus assimilis*. *Ecotoxicology* 26:902–913. Springer US.

- Van Erp, S., L. Booth, R. Gooneratne, and K. O'Halloran. 2002. Sublethal responses of wolf spiders (Lycosidae) to organophosphorous insecticides. *Environ. Toxicol.* 17:449–456.
- Weber, D. C. 2020. *Natural Enemies: An Introduction to Biological Control*. Second Edition . By Ann E. Hajek and Jørgen Eilenberg. Cambridge and New York: Cambridge University Press. \$49.99 (paper). xiii + 439 p.; ill.; index. ISBN: 978-1-107-66824-9. 2018. . *Q. Rev. Biol.* 95.
- Wiesner, P., and H. Kayser. 2000. Characterization of nicotinic acetylcholine receptors from the insects *Aphis craccivora*, *Myzus persicae*, and *Locusta migratoria* by radioligand binding assays: Relation to Thiamethoxam Action. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14:221–230.
- Wilczek, G., A. Babczyńska, M. Augustyniak, and P. Migula. 2004. Relations between metals (Zn, Pb, Cd and Cu) and glutathione-dependent detoxifying enzymes in spiders from a heavy metal pollution gradient. *Environ. Pollut.* 132:453–461.
- Wilczek, G., A. Babczyńska, P. Migula, and B. Wencelis. 2003. Activity of esterases as biomarkers of metal exposure in spiders from the metal pollution gradient. *Polish J. Environ. Stud.* 12:765–771.
- Wilder, S. M., and A. L. Rypstra. 2004. Chemical cues from an introduced predator (Mantodea, Mantidae) reduce the movement and foraging of a native wolf spider (Araneae, Lycosidae) in the laboratory. *Environ. Entomol.* 33:1032–1036.
- Wolfenbarger, L. L. R., S. E. Naranjo, J. G. Lundgren, R. J. Bitzer, and L. S. Watrud. 2008. Bt crop effects on functional guilds of non-target arthropods: A meta-analysis. *PLoS One* 3:e2118.
- Yao, F. L., Y. Zheng, J. W. Zhao, N. Desneux, Y. X. He, and Q. Y. Weng. 2015. Lethal and sublethal effects of thiamethoxam on the whitefly predator *Serangium japonicum* (Coleoptera: Coccinellidae) through different exposure routes. *Chemosphere* 128:49–55.
- Zhu, Y. C., J. Yao, J. Adamczyk, and R. Luttrell. 2017. Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). *PLoS One* 12:1–16.