



UNIVERSIDAD METROPOLITANA DE CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
INSTITUTO DE ENTOMOLOGÍA



Tesis:

“Determinación de efectos fenotípicos y epigenéticos en moscas del género *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae) derivados de la presencia de Imidacloprid en el ambiente de desarrollo larval”

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN
ENTOMOLOGÍA

Por: Gabriela Olivares Castro

Director de Tesis
Cristian Villagra Gil,

Co-director de Tesis
Carlos Guerrero Bosagna,

SANTIAGO – CHILE

23/09/2021

INSTITUTO DE ENTOMOLOGIA
UMCE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER

Se informa al Instituto de Entomología que la Tesis de Magíster presentada por el candidato,

Gabriela Olivares Castro

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de la tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Ciencias con Mención en Entomología en el examen de Defensa de Tesis rendido el 1 23, del 09 del 2021

DIRECTOR DE TESIS:

Cristián Villagra

Calificación:

Firma:

COMISIÓN EVALUADORA:

Alexander Vargas

Calificación:

Firma:

Christian González

Calificación:

Firma:



IDENTIFICACIÓN DE TESIS/INVESTIGACIÓN

Título de la tesis: “Determinación de efectos fenotípicos y epigenéticos en moscas del género *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae) derivados de la presencia de Imidacloprid en el ambiente de desarrollo larval”

Fecha: 23/09/2021

Facultad: Ciencias Básicas.

Departamento: Instituto de Entomología.

Programa: Magíster en Ciencias con Mención en Entomología.

Grado: Magíster en Ciencias con Mención en Entomología.

Profesor Guía:

AUTORIZACIÓN

Se autoriza la reproducción total o parcial de este trabajo de investigación para fines académicos por cualquier medio o procedimiento, siempre que se haga la referencia bibliográfica que acredite el presente trabajo y sus autores/as, y a su vez el alojamiento de éste en el repositorio institucional SIBUMCE del sistema de bibliotecas UMCE.

Gabriela Olivares Castro

Santiago de Chile, 23/09/2021.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis padres que hicieron posible la realización de este trabajo. A mi pareja por acompañarme y ayudarme en todo este proceso. Y a mis amigos, por ser un soporte emocional durante el proceso de investigación y escritura de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a Joaquín Ossandón por toda su ayuda y apoyo. A mis padres por estar siempre para mí y hacer posible materialmente que esta tesis se realizase. Al profesor Cristián Villagra por toda su ayuda y consejos, y al Profesor Christian González por ayuda con determinación taxonómica de la especie de estudio. También agradezco a mis amigos por acompañarme y darme ánimos.

ÍNDICE

RESUMEN	7
I. INTRODUCCIÓN	8
2.1 Plasticidad fenotípica	12
2.2 Epigenética	14
2.3 Dípteros cadavéricos	17
1.4 Contaminación por Pesticidas y consecuencias	20
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
III. HIPÓTESIS.....	27
IV. OBJETIVOS.....	28
V. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1 Experimento	29
6.2 Análisis de muestras	37
6.3 Análisis estadísticos:	37
6.1 Ensayo de tolerancia al compuesto.....	38
6.2 Experimento central	39
6.2.1 Análisis descriptivos	39
6.2.2 Análisis estadístico inferencial.....	53
VII. DISCUSIÓN.....	67
7.1 Discusión de los resultados.....	67
7.1.1 Larvas.....	69
7.1.2 Pupas.....	71
7.1.3 Adultos.....	73
7.2 Respuestas a la exposición a toxinas en dípteros	75
7.3 Respuestas ante pesticidas por exposición a dosis subletales.	79
7.4 Costo ambiental del uso de pesticidas	82
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
X ANEXOS	112
Anexo A: Insect Epigenetic Mechanisms Facing Anthropogenic- Derived Contamination, an Overview	112
Anexo B: Estadígrafos.....	145

RESUMEN

El uso de pesticidas se ha propuesto como una herramienta fundamental y de amplio uso en contextos silvoagropecuarios, bajo el esquema de producción intensiva industrializada, en todo el mundo. Desafortunadamente, estos pesticidas han demostrado efectos no deseados, dentro de los que se destacan los efectos sobre organismos “no blanco” como polinizadores, controladores biológicos y organismos detritívoros. Los pesticidas neonicotinoides se propusieron como una alternativa que causaría menos daños letales a estos organismos, siendo Imidacloprid uno de los más utilizados. Sin embargo, el uso de este pesticida ha sido relacionado con el problema de colapso de colmena en abejas de miel, y se han descrito efectos en dosis subletales, de los que se han observado ventajosos en algunos insectos y negativos en otros. En esta investigación se evaluaron los efectos del Imidacloprid en dosis subletales en *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Se encontraron efectos adversos, asociados a el tamaño poblacional, los que se expresaron hasta la cuarta generación después de exposición. Los resultados sugieren que *L. sericata*, no gatillarían efectos horméticos luego de la exposición a dosis subletales de Imidacloprid, por el contrario, le afecta negativamente. Se discuten estos hallazgos a luz de los mecanismos de regulación que ayudan a explicar la plasticidad fenotípica durante el desarrollo en insectos y sus potenciales vinculaciones con procesos de cambio transgeneracionales.

Palabras claves: Biocidas, Hormésis, Plasticidad del desarrollo, Nicho ontogénico, Diptera: Calliphoridae, *Lucilia sericata*

I. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas o pesticidas corresponden a las sustancias que son empleadas para combatir organismos no deseados (i.e. plagas), ya sea a través de su prevención, repelencia o destrucción, en el contexto silvoagropecuario y otras actividades económicas intensivas (Stanley & Preetha, 2016). En la actualidad, los pesticidas corresponden fundamentalmente a formulaciones químicas y son ampliamente usados durante la producción, depósito, transporte, reparto y elaboración de alimentos (Crossthaite *et al.*, 2017). También muchos pesticidas son aplicados en el control doméstico y urbano de organismos considerados plagas (Bergesen *et al.*, 2019; Meftaul *et al.*, 2020). En conjunto con su uso intensivo y extensivo de plaguicidas, durante las últimas décadas se han acumulado graves evidencias de los daños que estos pueden provocar al medio ambiente (Geiger *et al.*, 2010; Syromyatnikov *et al.*, 2020). Por ejemplo, al perjudicar a organismos que no son blanco del control de plagas, como nuestra propia especie y organismos beneficiosos como polinizadores, siendo reconocida en la actualidad la relación entre el uso indiscriminado de pesticidas y el deterioro de la salud humana y la biodiversidad de nuestro planeta (Sud, 2020).

En los últimos años, como potencial “solución” a esta falta de especificidad de muchos plaguicidas, se ha promocionado el uso de los neonicotinoides, una clase de pesticidas que afecta los receptores de acetilcolina, por lo que se propuso inicialmente que, su daño letal hacia organismos no blanco, sería menor (e.g. Jeschke & Nauen, 2008). Como atributo adicional de estas sustancias se destacó que los pesticidas neonicotinoides funcionarían sistémicamente, pudiendo aplicarse desde la semilla y luego difundir por las hojas, tallos, raíces y otros órganos de la planta, lo que se propuso garantizaría el control de enemigos naturales como insectos

herbívoros (Lu *et al.*, 2018). A partir de estas propiedades y promoción, el uso de formulaciones de este tipo se ha masificado a nivel mundial (Elbert, *et al.*, 2008).

No obstante, últimamente se ha revelado que los neonicotinoides pueden mantenerse en niveles residuales en el medio ambiente contaminando organismos, suelos y cursos de agua. Esta contaminación puede tener efectos secundarios de diversa severidad según el compuesto y la dosis aplicada (Botías *et al.*, 2015; Bebane *et al.*, 2019). Recientemente, se ha reportado que pesticidas neonicotinoides gatillarían citotoxicidad y genotoxicidad en las mismas plantas cultivadas que se pretende proteger (Georgieva *et al.*, 2021). Por otra parte, se ha establecido un vínculo entre el uso de neonicotinoides y el problema de colapso de colmena (PCC) en abejas de miel, que ha estado afectando a estos insectos a escala global (Chensheng *et al.*, 2012). Se han encontrado efectos de neonicotinoides en el desarrollo, morfología y conducta de distintos insectos (Abdel-Haleem *et al.*, 2018; Maloney *et al.*, 2018). Adicionalmente se ha demostrado en algunos casos que mecanismos epigenéticos moleculares subyacen a los cambios fenotípicos observados (Hu *et al.*, 2018), cambios que pueden ser heredados por la descendencia (Villagra & Frías, 2020).

Dentro de la diversidad de insectos que se ven afectados por el uso de estos pesticidas se encuentran los dípteros; desde los sírfidos (Diptera: Syrphidae) que comparten parcialmente nicho trófico con otros polinizadores como abejas (Basley *et al.*, 2018), como las moscas domésticas (Diptera: Muscidae) y mosquitos (Diptera: Culicidae) que son blanco directo de estos pesticidas (Uragayala *et al.*, 2015; Yusmalinar *et al.*, 2017), y de forma colateral con las especies de moscas que componen la fauna cadavérica, como Calliphoridae, Sarcophagidae, Muscidae y Phoridae, cuyo nicho puede encontrarse en zonas urbanas, rurales, agrícolas y silvestres (Jales *et al.*, 2020). Además, varias especies de califóridos son polinizadores en su

etapa adulta, lo que incrementa sus posibilidades de verse expuestos a pesticidas (Howlett, 2012; Saeed *et al.*, 2016; Herrmann *et al.*, 2019; Cook *et al.*, 2020).

El potencial de letalidad de estos insecticidas ha sido investigado en moscas cadavéricas (Kather, 2021; Correia *et al.*, 2010; Nurita & Hassan, 2010), sin embargo, hasta donde nos fue posible constatar, los efectos subletales de la exposición a neonicotinoides en moscas cadavéricas no han sido explorados. Es necesario subsanar este vacío de conocimiento debido al rol determinante que juegan las moscas en la descomposición y reciclaje de la materia orgánica, siendo un componente clave de esta función ecosistémica. Además, estos insectos se han propuesto como fuentes de alimento alternativas en procesos productivos (Weidner *et al.*, 2020), y se usan en la resolución de casos forenses, en donde se consideran un indicador fundamental para determinar la data de muerte (Byrd & Castner, 2009).

Considerando lo anterior en esta tesis se estudiaron las potenciales modificaciones a nivel fenotípico y fenológico que pudiesen ocurrir debido a la exposición e ingesta de dietas contaminadas con Imidacloprid en los estados larvales de moscas cadavéricas.

Además, se desarrolló un ensayo sobre las conexiones entre los efectos que se han caracterizado debido a pesticidas neonicotinoides y los procesos epigenéticos que se han encontrado vinculados como gatillantes y reguladores (Anexo A).

Los organismos interactúan dinámicamente con su ambiente a lo largo de su ontogenia generando transformaciones o conservación de sus rasgos a través de esta dinámica (i.e. nicho ontogénico; Werner & Gilliam, 1984; Vargas *et al.*, 2021). En este proceso los seres vivos pueden experimentar de manera contexto-dependiente variaciones en su desarrollo, estos

cambios pueden expresarse como plasticidad fenotípica (e.g. morfología y conducta), definida como el resultado mismo de dinámica de interacción organismo-ambiente (West-Eberhard, 2003), Esto también puede reflejarse en la acción de distintas instancias de regulación de la auto-organización del organismo, por ejemplo mediante la acción de mecanismos epigenéticos en las células vivas (Skinner & Guerrero-Bosagna, 2009). Éstos últimos corresponden a diferentes mecanismos moleculares capaces de modificar la expresión génica a través del nicho ontogénico sin alterar la secuencia de ADN (Lacal & Ventura, 2018), estas modificaciones pueden ser heredadas y perpetuarse en un linaje si confieren ventajas (Burggren, 2016).

Los estímulos estresantes pueden tener efectos en el organismo a lo largo de su vida y en algunos casos en su descendencia (Cridge *et al.*, 2017; Faulk & Dolinoy, 2011). El estudio de los efectos de estímulos ambientales estresantes (como compuestos químicos tóxicos) sobre todo en los estados tempranos de la ontogenia de los organismos ha sido destacado en variados sistemas de estudio (Jadiya & Nazir, 2012; Manikkam *et al.* 2012; Jacobs *et al.*, 2017), esto debido a que este periodo es reconocido como particularmente susceptible a modificaciones (Goff & Lord, 2010). La presencia de determinados compuestos químicos en el sustrato de alimentación y crecimiento de insectos pertenecientes a la entomofauna cadavérica y detritívora ha demostrado tener consecuencias observables en su fenotipo y epigenoma de distintos modelos de estudio (Reynolds *et al.*, 2016; Burggren, 2017). Por ejemplo, en *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) se descubrió que esta es capaz de generar resistencia a Imidacloprid a dosis subletales de este compuesto, presentando incluso una respuesta de hórmesis (Yusmelinar *et al.*, 2017). Esto último corresponde a la situación en la que un organismo presenta una respuesta de estimulación de sus procesos biológicos a dosis bajas de un tóxico, pero inhibición a dosis altas del mismo (Calabrese & Baldwin, 1998). Por otro lado, al exponer a *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera: Acrididae) a dosis subletales de

Imidacloprid, se observó una reducción en la respuesta de evasión de colisiones y salto de escape (Parkingson *et al.*, 2019). En *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae) la exposición a dosis subletales de Imidacloprid afectó la asignación de sexo para la descendencia (Cook *et al.*, 2015).

La exposición a pesticidas es un fenómeno complejo, que posee múltiples aristas, desde la concentración hasta las propiedades fisicoquímicas del o los compuestos que pueden tener la formulación aplicada (Peng, & Yang, 2016; Maloney *et al.*, 2018). Por otro lado, las características de los organismos afectados, e.g. estado de desarrollo o la especie, también pueden determinar los tipos de efectos que la contaminación por estos pesticidas causará en el ambiente (Nurita & Hassan 2010). Esta multiplicidad de variables que entran en juego cuando un organismo es expuesto a uno de estos químicos vuelve clave que sean evaluados los diferentes efectos que pueden provocar en distintos modelos de estudio y en distintas condiciones contextuales. A continuación, se revisan los temas y conceptos que son relevantes para esta investigación y sus anexos.

2.1 Plasticidad fenotípica

La plasticidad fenotípica ha sido descrita como “la habilidad de un organismo de alterar su fenotipo en respuesta a influencias ambientales, sin modificar su genotipo” (Cridge *et al.* 2017; West-Eberhard, 2003). Para un rasgo pueden presentarse múltiples variaciones las que pueden ser considerablemente diferentes entre sí (Cridge *et al.*, 2017). En este contexto, otro concepto relevante, ampliamente documentado en insectos (Stark *et al.*, 1999; Perlowagora-Szumlewicz 1973), son las “fenocopias”, las que entenderemos como un fenotipo producido por efecto del ambiente que se asemeja a otro de origen genético, un ejemplo sencillo es la piel bronceada

(fenocopia) como símil de la piel morena (rasgo de base genética) (revisado por Oyama, 2000). La exposición a condiciones ambientales extremas o estresantes durante el desarrollo puede inducir la aparición de fenocopias, por ejemplo, la exposición a temperaturas altas durante el desarrollo tiene una asociación con la aparición de fenocopias de morfotipos, conductas y fenología en insectos (West-Eberhard, 2003; Williams *et al.*, 2009).

Es importante recalcar que la expresión de plasticidad fenotípica puede ocurrir a lo largo de toda la ontogenia del individuo, y que este no sólo está sujeto a los cambios del ambiente que lo rodea (West-Eberhard, 2003), sino que también a los cambios experimentados por su propio organismo a lo largo del tiempo en un constante proceso de autorregulación o autopoiesis (Maturana & Varela, 1973). Un ejemplo de esto es la capacidad de aclimatación a nuevos ambientes que poseen los organismos, la que puede involucrar cambios en los distintos niveles de regulación biológica según las condiciones lo requieran, destacando la contexto-dependencia de estos procesos (Whitman, 2009). Estos fenómenos tienen un correlato a nivel molecular, pero no propiamente genético, pues no generan cambios en las secuencias que conforman su genoma, sino que lo que observamos son modificaciones de la expresión del mismo, es decir estamos viendo cambios a nivel epigenético (Jaenisch & Bird, 2003).

En dípteros, como en la mayoría de los insectos holometábolos, parte de los cambios plásticos ocurre con relación al sustrato de alimentación y desarrollo de la fase larval (Gobbi *et al.* 2013; Kaspi *et al.*, 2002). Este ambiente es crucial para la conformación de distintos atributos especie-específicos como la morfología, conducta y fenología de las moscas (Bauer *et al.*, 2020; Elora & Sakar, 2018; Nash & Chapman, 2014). Cuando este ambiente de desarrollo es modificado por un evento natural o experimentalmente, es posible detectar cambios conspicuos en rasgos fenotípicos, lo que ha sido ampliamente estudiado en distintos sistemas modelo de biología del desarrollo y genética (Villagra Frías-Laserre, 2020). Por ejemplo, en la mosca del vinagre,

Drosophila melanogaster (Meigen, 1830) (Diptera: Drosophilidae), se ha reportado que la concentración de carbohidratos, proteínas y cantidad de alimento disponible en su dieta larval son capaces de afectar la proporción del tamaño de los segmentos corporales del imago de esta especie (Shingelton *et al.*, 2017). Por otro lado, en el mosquito de la fiebre amarilla, *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), tanto la temperatura, dieta y densidad poblacional durante la etapa larval influencia fuertemente la tasa de desarrollo de esta especie (Couret *et al.*, 2014). De forma similar, temperaturas diferentes gatillan cambios en la duración de los periodos larval y pupal en la mosca de la carroña *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae).

La exposición a sustancias tóxicas durante la etapa larval es capaz de generar marcados efectos fenotípicos en varias especies (e.g. Glendinning *et al.*, 1999; Orr *et al.*, 2021). Por ejemplo, al ser expuesta a bromuro de butilscolamina (C₂₁H₃₀NO₄⁺) en su sustrato de crecimiento, la mosca oriental de las letrinas, *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) puede presentar cambios en su tasa de desarrollo y morfología (Oliveira *et al.*, 2009). Por otro lado, en la mosca de la carne, *Phormia regina* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae), se han encontrado diferencias en el tamaño larval ante la presencia de etanol en su sustrato de crecimiento (Tabor *et al.*, 2005) y en *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae) se han reportado diferencias en las tasas de crecimiento larvario de moscas criadas en distintos tipos de tejidos (Clark *et al.*, 2006).

2.2 Epigenética

En este trabajo entenderemos el concepto de epigenética como los cambios en la expresión génica, que no tienen un correlato de modificaciones en secuencias de ADN y que son

heredables en el desarrollo de un linaje celular (intergeneracionalmente), además de aquellas que pueden perpetuarse transgeneracionalmente desde un individuo a su descendencia por una o más generaciones (Bird, 2007; Faulk & Dolinoy, 2011; Vidaki *et al.*, 2013; Frías-Lasserre *et al.*, 2018).

Podemos dividir los mecanismos que operan en los cambios epigenéticos moleculares en “pre-transcripcionales” y “post-transcripcionales”, según el momento del proceso de expresión génica en el que tienen lugar (Meyers *et al.*, 2012). Los primeros funcionan modificando químicamente la expresión del ADN o a las proteínas que lo mantienen como cromatina; siendo los más estudiados la metilación del ADN y las modificaciones de histonas (Vidaki *et al.*, 2013; Hunt *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2015). En cuanto a mecanismos post-transcripcionales la síntesis y funcionamiento de ARNs (“ncARNs”) no codificantes es el más conocido (Andersen & Panning, 2003; Frías-Lasserre & Villagra, 2017).

Dentro de estos, por ejemplo, se encuentran los micro ARN (“miRNAs”). Estos son capaces de ligarse a ARN mensajeros (ARNm) de modo que los degradan o inhiben su traducción inactivando la expresión de genes (Bushati & Cohen, 2007). Estos mecanismos epigenéticos moleculares en algunos casos se han podido correlacionar con aspectos fenotípicos. Sin embargo, en insectos esta conexión ha sido escasamente explorada, encontrándose, por ejemplo, relación con aspectos del desarrollo y longevidad (Loet *al.*, 2018).

Faulk & Dolinoy (2011) describen que hay cinco factores ambientales que son determinantes en el origen y mantención de las modificaciones del epigenoma, estos son el comportamiento, el estrés (biótico y abiótico), la nutrición, la presencia de toxinas y la estocasticidad de la ubicación de las marcas de metilación en los distintos loci. Acorde a estos autores la influencia de estos factores es especialmente significativa durante los primeros estadios de desarrollo (Faulk & Dolinoy, 2011). Otro factor relevante en cuanto a la variación del epigenoma son las

condiciones ambientales, lo que ha sido observado experimentalmente (Khosla *et al.*, 2006; Sánchez, 2010).

A la fecha los estudios de epigenética se han enfocado principalmente en su aplicación en contextos clínicos (Laird, 2003; Burdge & Lillycrop, 2010; Heyn & Esteller, 2012; Mukherjee *et al.*, 2015) y en segunda instancia a estudiar la relación entre los cambios del epigenoma y estresores ambientales (Feil & Fraga, 2012; Vandegehuchte & Jansen, 2013). En el caso de las investigaciones que evalúan la relación entre compuestos contaminantes y sus consecuencias epigenéticas se ha encontrado que pesticidas, y compuestos químicos derivados de la industria farmacéutica, pueden contaminar diversos ecosistemas generando alteraciones fisiológicas y del desarrollo en vertebrados e invertebrados (Lu *et al.*, 2018; Craddock *et al.*, 2019; Annabi, Salem & Abid-essefi, 2019).

Además, los contaminantes pueden bioacumularse y pasar a diferentes eslabones de la cadena trófica. Actualmente se están revelando que las alteraciones detectadas en animales ocurren con la participación de mecanismos epigenéticos (Brevik *et al.*, 2017; Oppold *et al.*, 2015; Collota *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2010). Estos pueden estar involucrados en la expresión de patologías como también en la reparación y desarrollo de mecanismos de resistencia, pudiendo involucrar herencia epigenética transgeneracional en el proceso (Bebane *et al.*, 2019). En insectos el foco principal han sido las interacciones entre pesticidas y abejas, principalmente *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) en donde se han realizado avances significativos incluso vinculando el uso de pesticidas neonicotinoides con el síndrome de colapso de colonias (ver revisión artículo adjunto), que ha preocupado profundamente a la comunidad científica desde su descripción en los primeros años del siglo XXI (Li *et al.*, 2011; Chensheng *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2018). En dípteros las observaciones se han realizado principalmente en relación al control de plagas como *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) y *Chironomus riparius* (Diptera:

Chironomidae) (Basley *et al.*, 2018), *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) (Kavi *et al.*, 2014; Yusmalinar *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2017) y la capacidad de estos de generar resistencia a distintos pesticidas.

2.3 Dípteros cadavéricos

Los insectos han demostrado ser excelentes organismos modelo para estudios de plasticidad de desarrollo y epigenética (Hunt *et al.*, 2013). Esto se debe a que no sólo poseen mecanismos de plasticidad, procesos fisiológicos y epigenéticos semejantes a los observables en vertebrados (Feil & Fraga, 2012), sino que presentan múltiples ventajas en relación a estos; por una parte son fáciles de almacenar y reproducir, lo que reduce costos y requerimientos a nivel de infraestructura (Mukherjee *et al.*, 2015), por otra poseen ciclos de vida relativamente rápidos que facilitan el estudio de múltiples generaciones en periodos cortos de tiempo (Bingsohn *et al.*, 2016; Holt, 2017), lo que permite evaluar el componente transgeneracional de las modificaciones fenotípicas y del epigenoma, como también de las variaciones que estas pueden experimentar en el tiempo (Mukherjee *et al.*, 2015). Además, el que los insectos posean estadios de desarrollo claramente delimitados facilita el estudio de modificaciones y factores que afecten los procesos de la ontogenia de los organismos (Košťál, 2006; Pincebourde & Casas, 2015). Por último, la experimentación en insectos tiene relativamente menos complicaciones y cuestionamientos éticos que el trabajo con otros animales, lo que facilita el acceso a los especímenes y el desarrollo de las investigaciones (Mukherjee *et al.*, 2015; Bingsohn *et al.*, 2016).

Uno de los modelos ampliamente utilizados en el estudio de la plasticidad del desarrollo y epigenética molecular son los dípteros asociados a la descomposición (Tabor *et al.*, 2005;

Tarone, 2007; George *et al.*, 2009; Tarone *et al.*, 2011; De Carvalho, *et al.*, 2012; Reynolds *et al.*, 2013; Verma, 2013; Rezende *et al.*, 2014; Reynolds *et al.*, 2016; Ekrakene & Odo, 2017; Salimi *et al.*, 2018). Estas moscas son las primeras en llegar a restos de animales, pasados minutos desde el deceso, para oviponer privilegiando los orificios naturales del cuerpo (Byrd & Castner, 2009). Tras un máximo de aproximadamente 24 horas desde la oviposición, dependiendo de la especie, estos huevos eclosionan e inician su fase larvaria (Greenberg, 1991). Las larvas pueden alimentarse de los restos en descomposición o de larvas de otras especies, y por lo corriente, pasan por tres estados de desarrollo larvario antes de pupar (Greenberg, 1991; Byrd & Castner, 2009). Cuando ya están listas para pupar se desplazan alejándose de los restos, luego de lo cual finalmente pupan, permaneciendo en este estado por intervalos variables y altamente susceptibles a los cambios ambientales, hasta que llega el punto de emerger para el imago y reiniciar el ciclo (Gennard, 2007).

Estas moscas son un buen modelo de estudio de la influencia de la dieta en el desarrollo de rasgos fenotípicos (Nash & Chapman, 2014). Además, se ha explorado los posibles efectos fenotípicos y fisiológicos de drogas presentes en la dieta de desarrollo usando este tipo de moscas como modelo de estudio (George *et al.*, 2009; Giao *et al.*, 2017). Esto debido a que alteraciones de su fenología, conducta y morfología producto de tóxicos en su ambiente de desarrollo, podrían ser clave en su aplicación forense (Samili *et al.*, 2018).

Gracias a estas aproximaciones se ha podido determinar que la presencia de las drogas etanol y cannabis en la dieta larval de la mosca *Chrysomya rufifacies* (Macquart, 1842) (Diptera: Calliphoridae) es capaz de acelerar su desarrollo (Verma, 2013); otros estudios han evidenciado que la presencia de fármacos como Paracetamol en la dieta de *Calliphora vicina* (Robineau-Cescoidy, 1830) (Diptera: Calliphoridae) acelera la tasa de desarrollo larval (O'Brien & Turner, 2004). La presencia o ausencia de contaminantes como pesticidas en insectos necrófagos,

determinada por medio de un análisis entomotoxicológico, podría ser un indicador, por ejemplo, de desplazamiento de los restos en caso de encontrarse un químico no presente en el contexto ambiental en el que se encuentren los restos, o de no encontrarse en los insectos asociados al cuerpo, en un ambiente que sí los presente (Keh, 1985).

Dentro de los modelos de estudio pertenecientes a Diptera, la familia Calliphoridae ha sido de gran interés para los entomólogos forenses desde los inicios de la disciplina, de hecho, Mégnin (1894) describe su presencia desde la primera de sus ocho escuadras cadavéricas (Byrd & Castner, 2009). Numerosos estudios de entomología forense se han enfocado en esta familia (Carvalho *et al.*, 2001; Grassberger & Reiter, 2002; Kaneshrajah & Turner, 2004; Campobasso *et al.*, 2004; Tabor *et al.*, 2005; Clarks *et al.*, 2006; Kharbouche *et al.*, 2007; Fathy *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; George *et al.*, 2009; Picard & Wells, 2010; Frederickx *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012; Verma, 2013; Bala & Sharma, 2015; Gião *et al.*, 2017; Badenhorst & Villet, 2018). Otra característica relevante es que varios miembros de esta familia son polinizadores en su fase adulta, con una potencial ventaja ante las abejas en ciertos contextos por su tolerancia a bajas temperaturas y alta humedad ambiente (Howlett, 2012; Saeed *et al.*, 2016; Herrmann *et al.*, 2019).

Una especie de particular interés es *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae), pues constituye un indicador de tiempo mínimo transcurrido desde la muerte por su temprana llegada a los restos (Ortloff *et al.*, 2012), y ha sido objeto de estudios sobre su tolerancia a pesticidas por su condición de plaga en la crianza de ovinos (Bagnall *et al.*, 2017; Kotze *et al.*, 2015) y estudios de entomotoxicología (Essarras *et al.*, 2018; Ishak *et al.*, 2018; Ishak *et al.*, 2019). En esta investigación se ha seleccionado a *L. sericata*, reportada en Chile por Figueroa-Roa y Linhares en 2002, se trata de una especie ubicua tanto en zonas urbanas como rurales (Williams *et al.*, 2014). En la Región Metropolitana de Santiago nos ha sido posible capturar

especímenes de esta especie y mantener crianzas de la misma siguiendo un protocolo mixto que combina lo propuesto por Kotzé *et al.* (2015), Lennie & Birt (1966) y experimentación propia.

1.4 Contaminación por Pesticidas y consecuencias

El uso de pesticidas en general suele tener efectos en especies que no son su blanco original, por ejemplo, existe evidencia contundente que el uso de neonicotinoides en cultivos de maíz tiene relación con el síndrome de colapso de colonias de *A. mellifera* (Li *et al.*, 2011) y otras patologías en esta especie (Lu *et al.*, 2018). Otros ejemplos incluyen, el efecto de organofosfatos en el sistema reproductor masculino de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) (Mandi *et al.*, 2020); los efectos negativos en la supervivencia *Ischnura elegans* (Odonata: Coenagrionidae) y *Daphnia magna* (Cladocera: Daphniidae) de pesticidas antimosquitos en cultivos de arroz (Subrero *et al.*, 2018); y la reducción en la riqueza de abejas nativas en áreas silvestres cercanas a campos de cultivos asociado al uso de neonicotinoides (Main *et al.*, 2019).

Actualmente, el uso de pesticidas no se limita al contexto agrícola, al punto que existen insecticidas diseñados para uso en el hogar, cuyos efectos han revelado preocupantes tendencias en cuanto a su relación con diversas patologías en vertebrados (Richards *et al.*, 2016; Van Maele-Fabry *et al.*, 2019). Se ha observado que siguen presentes en las aguas servidas de zonas urbanas y rurales, contaminando ambientes productivos y silvestres. Los residuos de pesticidas pueden bioacumularse tanto especies de importancia económica como nativas, pudiendo transferirse a través de la cadena trófica, causando enfermedades. Entre los pesticidas que prevalecen en las aguas que llegan a grandes ríos está descrito el Imidacloprid en Estados Unidos (Sutton *et al.*, 2019).

A esto se suman los patrones de dispersión que llevan partículas de agro-pesticidas a contextos domésticos en zonas densamente pobladas con escasa separación entre lo rural y lo urbano, como en Francia, donde se ha descrito un considerable transporte de partículas de pesticidas en el polvo, que puede encontrarse al interior de hogares (Béranger *et al.*, 2019). Lo que también ha sido observado en regiones con climas templados, en Estados Unidos, en donde la presencia de pesticidas tanto en hogares como en ambientes rurales es abundante y extendida (Richards *et al.*, 2016).

Otra forma de contacto con los pesticidas se da en contextos ocupacionales, principalmente por granjeros u otros trabajadores asociados al quehacer agrícola, en quienes se han encontrado significativos efectos nocivos tras la exposición a diversos tipos de pesticidas con efectos que van desde la oncogenia (Gosh *et al.*, 2018), el desarrollo de Alzheimer (Yadav *et al.*, 2016), daño directo al ADN y efectos a nivel de metilaciones del mismo (Benedetti *et al.*, 2018; Kahl *et al.*, 2018).

Por otra parte, nos encontramos con los pesticidas de forma indirecta en nuestra dieta, Bordoni & Gabianelli (2020) exponen extensa evidencia del efecto de la exposición a pesticidas por medio de trazas en los alimentos, y sus efectos a nivel de desarrollo y salud, considerando tanto los efectos de presiones ambientales en contextos de gestación, los factores mutagénicos, fisiológicos y los efectos a nivel epigenético, que tiene la exposición a estos compuestos, destacando que en un mismo alimento podemos encontrarnos con múltiples compuestos en conjunto, cuyas interacciones tienen mayores efectos que su presencia por separado (Bordoni & Gabbianelli, 2020).

Se ha observado en reiteradas ocasiones que los pesticidas generan cambios a nivel epigenético tanto en vertebrados como en invertebrados, ya sea originando patologías o afectando facultades fundamentales de los organismos (Song *et al.*, 2010; Collotta, Bertazzi &

Bollati, 2013; Hallman *et al.*, 2014; Ghosh *et al.*, 2018; Kahl *et al.*, 2018; Benedetti *et al.*, 2018), como en invertebrados (Oppold *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2017; Brevik *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2018; Bantz *et al.*, 2018; Bebane *et al.*, 2019). Todavía no se conoce la envergadura real de estos cambios, pero se ha ido explorando en función de los fenotipos asociadas a las modificaciones observadas a nivel epigenético. La potencial heredabilidad de estas modificaciones abre un abanico de posibilidades adaptativas, las que podrían jugar a favor de la conservación de especies en el actual panorama climático en el que todos los organismos se enfrentan a considerables desafíos para seguir existiendo.

Hay evidencia de los pesticidas pueden producir cambios epigenéticos tanto a nivel de metilaciones de ADN (Ghosh *et al.*, 2018; Benedetti *et al.*, 2018; Kahl *et al.*, 2018; Bebane *et al.*, 2019) como de acetilación/desacetilación de histonas (Song *et al.*, 2010; Ghosh *et al.*, 2018), y alteraciones de miRNAs (Collota *et al.*, 2013). Estos cambios pueden manifestarse como plasticidad fenotípica, por ejemplo, en cambios de tamaño ante variaciones de temperatura (Hwang & Turner, 2009), cambios en la tasa de crecimiento en respuesta al tipo de comida y hacinamiento (Ireland & Turner, 2006), variaciones en la tasa de crecimiento ante la exposición a compuestos artificiales (Rezende *et al.*, 2014), entre otros resultados posibles.

Como mencionamos anteriormente *A. mellifera* ha sido un foco particularmente frecuente de estudio para las investigaciones sobre la interacción de pesticidas con especies que no son su blanco original. Por ejemplo, el trabajo de Bebane y colaboradores (2019) identificó expresión diferencial de genes entre abejas tratadas y no tratadas con concentraciones de Imidacloprid equivalentes a la existentes en el contexto agrícola, identificando que estas diferencias se debían a metilaciones en sitios CPG, incluidos algunos que manejaban la acetilación de histonas H3, pero al realizar experimentos semejantes con *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) no

identificaron cambios equivalentes en el epigenoma de ese organismo. Los resultados de este estudio evidencian la importancia de estudiar la mayor diversidad de especies que sea posible.

Podemos decir que los triunfos en el control de aplicación de compuestos químicos en la producción agrícola históricamente se han visto empañados por sus lamentables efectos colaterales en los ecosistemas en los que se han aplicado. Muchos organismos no-blanco se han reportado afectados por estos contaminantes. Siendo capaces de bioacumular estos compuestos que luego pueden ser transferidos a través de la cadena trófica, aumentando el número de niveles víctimas de la aplicación de estos compuestos tóxicos (Chopra *et al.*, 2010).

Dentro de los tipos de pesticidas disponibles en el mercado actualmente un competidor relativamente reciente pero que ha ido acaparando atención son los neonicotinoides, que tienen la ventaja de se unen a los receptores de acetilcolina, pero lo hacen con mayor efectividad en invertebrados que en vertebrados (Haleem *et al.*, 2018), lo que ha llevado a un amplio uso de los mismos (Lu *et al.*, 2018). Siendo el Imidacloprid uno de los más populares, ha sido foco de estudios sobre su interacción con distintos insectos como *A. mellifera* como insecto no objetivo, pero también ha sido un foco de investigación su interacción con plagas como *M. domestica* y *Ae. aegypti*, en donde se han estudiado la letalidad en distintas concentraciones (Farahat *et al.*, 2018), y los efectos de dosis subletales en el desarrollo de resistencia a estas sustancias (Kavi, *et al.*, 2014; Yusmalinar *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2017), otra plaga contra la que el Imidacloprid es utilizado son los piojos de ovejas (Liceboss Corp., 2020).

El plaguicida Imidacloprid ha sido utilizado para el control de dípteros que son considerados plagas como *M. domestica* (Kavi *et al.*, 2014; Yusmalinar *et al.*, 2017), *Ae. aegypti* y *Chironomus riparius* (Basley *et al.*, 2018). Respecto a la mosca plaga cosmopolita *Lucilia cuprina* también existe evidencia de su control por medio de Imidacloprid (Dunford *et al.*, 2013). Ya sea producto de deriva de pesticidas o intencionalmente las consecuencias sobre la plasticidad del desarrollo

y epigenética de estas aplicaciones no han sido evaluados experimentalmente en este género de moscas. Esto hace relevante estudiar sus efectos tanto intra como intergeneracionalmente debido a que podrían ser un buen bioindicador de contaminación por este tipo de pesticida debido a su resistencia a insecticidas (East *et al.*, 1992; Rugg *et al.*, 1995).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los neonicotinoides son pesticidas muy populares utilizados tanto en el contexto agrícola como en ambientes domésticos (Lu *et al.*, 2018). Uno de estos neonicotinoides es el Imidacloprid ($C_9H_{10}ClN_5O_2$) que puede ser comprado en Chile libremente en el formato “cebo granulado para hormigas” marca Anasac Chile.

Para ser un compuesto de tan fácil acceso en Chile y que está pensado para un uso doméstico, en los últimos años se ha ido acumulando evidencia de su nocividad para especies que no son el objetivo de su uso como, por ejemplo, las abejas (Bebane *et al.*, 2019; Farahat *et al.*, 2018) incluso en dosis subletales (Hu *et al.*, 2018).

Otro tipo de insectos que pueden verse afectados son aquellos asociados a la descomposición, tanto detritívoros como necrófagos y necrófilos, tales como dípteros califóridos y sarcófagidos. Los restos en descomposición pueden encontrarse cerca de lugares de aplicación de insecticidas o deberse a aplicación de los mismos, por ejemplo, corresponder a un animal intoxicado.

En este contexto las dosis a las que la entomofauna cadavérica puede ser expuesta son variables, si son muy altas probablemente los insectos mueran y el proceso de consumo y degradación que realizan quedará truncado. Pero si las dosis presentes son subletales queda espacio para otra clase de respuestas y cambios, que pueden incluso ser ventajosos en ciertos casos, por ejemplo, el desarrollo de tolerancia a los compuestos (Yusmalinar *et al.*, 2017).

De esto se desprende la pregunta cuáles son los efectos podría ocasionar una dosis subletal en especies de moscas cadavéricas de la familia Calliphoridae, las que son las primeras en llegar a

los restos tras el deceso (Byrd & Castner, 2009) y tendrían más posibilidades de encontrarse con trazas de pesticida si la muerte estuviese relacionada con la toxina (Jales *et al.*, 2020). También en su etapa adulta los califóridos se alimentan de néctar, cumpliendo un rol como polinizadores (Howlett, 2012; Saeed *et al.*, 2016; Herrmann *et al.*, 2019), lo que incrementa las posibilidades de exposición a pesticidas.

III. HIPÓTESIS

- 1) La presencia de Imidacloprid en la dieta de desarrollo larval afecta el fenotipo y/o la fenología de las larvas, pupas e imagos de *L. sericata*.

- 2) Los cambios experimentados debido a la exposición a Imidacloprid en la dieta de desarrollo larval son heredables en *L. sericata*.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Determinar si la presencia de Imidacloprid en la dieta de desarrollo de *L. sericata* es capaz de producir cambios fenotípicos cuantificables a nivel de morfología y fenología, y/o alteraciones en la plasticidad de su desarrollo.

2. Objetivos específicos

1) Determinar y caracterizar los efectos del Imidacloprid, evaluado en distintas concentraciones, sobre la fenología de *L. sericata* alterando sus tasas de desarrollo.

2) Identificar y describir los efectos de la Imidacloprid en la morfología de *L. sericata* en sus distintos estadios de desarrollo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Los distintos estados de desarrollo de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae) fueron criados y utilizados como organismo modelo. Los especímenes fueron determinados taxonómicamente con la clave de Whitworth (2010) y gracias a las sugerencias del Profesor Christian González Aravena, IE UMCE.

6.1 Experimento

Se establecieron cultivos de *L. sericata* en condiciones de temperatura (~26C°) controlado por el termostato de la cámara de crianza y humedad (~70%) controlada con un medidor de humedad y un sistema de humidificación ambiente artesanal, con ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas siendo un total de cuatro colonias fundadoras. Los adultos de la especie se obtuvieron a partir de capturas usando trampas cebadas con hígado de pollo. La trampa fue elaborada con una botella de plástico de un litro, la que se dispuso en una superficie plana a un metro y medio del suelo, durante el abril y julio del año 2020. Después de revisiones periódicas de la trampa, se seleccionaron los especímenes que parecían ser *L. sericata*, cuya identificación fue corroborada posteriormente con la clave de Whitworth (2010), y fueron almacenados vivos en cajas de plástico con tapa de velo, con una sección con velcro para poder hacer las manipulaciones necesarias, alimentadas con sacarosa ad libitum y agua en un algodón humedecido. Las colectas se realizaron con al menos cuatro días de separación, a fin de reducir el riesgo de que las moscas colectadas para diferentes colonias estuvieran emparentadas, por no fue posible comprobar que

tal fuera el caso. Las colonias fundadoras fueron expuestas a un sustrato de oviposición (hígado de pollo homogenizado), una vez que los huevos eran depositados, se trasladaron junto al sustrato a una caja de plástico con la tapa perforada para permitir el ingreso de aire, a los tres días tras la eclosión de los huevos las larvas eran traspasadas a contenedores con vermiculita y tapas perforadas para permitir el ingreso de aire. Finalmente, después de la pupación se transfirieron las pupas de nuevo a la caja con tapa de velo, para que completaran su ciclo de vida (Fig. 1).

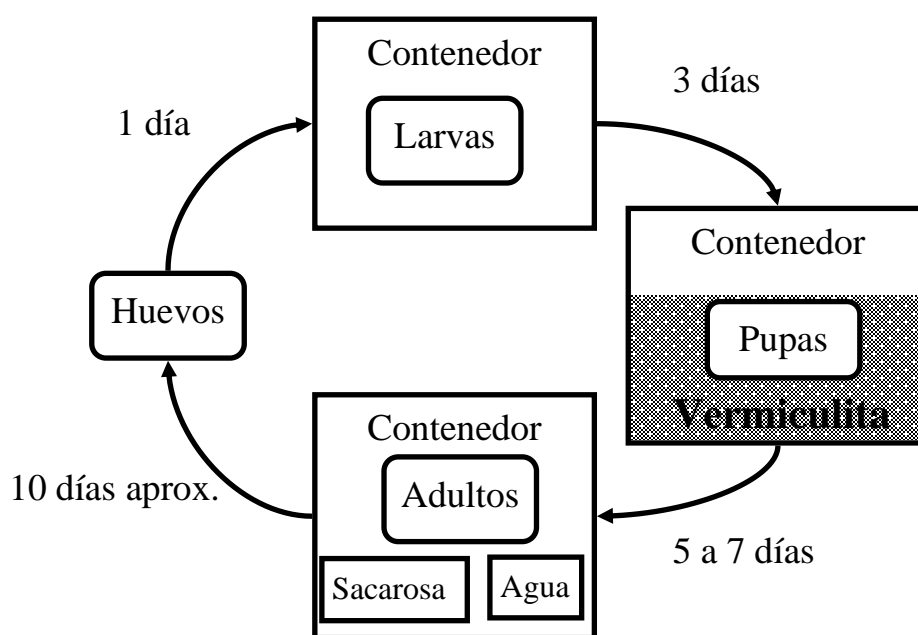


Figura 1: Ciclo de crianza de *L. sericata* bajo condiciones controladas.

Con especímenes de estas cuatro colonias se realizó un ensayo de tolerancia al compuesto de interés exponiendo entre 4 y seis larvas de cada a una de las colonias a tres concentraciones distintas de Imidacloprid además de hacer un control no expuesto y luego observar su sobrevivencia y desarrollo, hasta la adultez. Las dietas fueron preparadas siguiendo la metodología propuesta por Young *et al.* (2019). Para esto se procesó en una licuadora (1 minuto) un kilo de hígado de pollo Ariztía® hasta obtener una pasta de textura homogénea. Se preparó una dilución de

Imidacloprid a 10ppm (estándar Sigma Aldrich 37994-100MG) en agua destilada (Clase III, Megaquim ®).

Luego, en tubos falcon estériles de 50 ml, se prepararon tres soluciones a partir de esta disolución inicial: 5000 ul en 50ml de hígado (1ppm) [1]; 500 ul en 50 ml (0.1 ppm) [2] y 50 ul en 50 ml (0.01 ppm) [3]. Además, se consideró un control [c] que solo contenía hígado homogeneizado al cual se agregó 500 ul de agua destilada. Estas dietas se homogenizaron en vórtex (MX28) a máxima potencia (2500rpm) por 30 segundos cada una. A continuación, se distribuyó el contenido de estas dietas en placas Petri Falcon ® (60x 15 ml) estériles, conteniendo cada una 10 gramos de las dietas, masado en balanza de precisión (QUIMIS®). A partir de los resultados del experimento de tolerancia al compuesto (ver sección resultados), se definió que a fin de que el experimento central fuese viable se contrastaría la concentración de 0,1 ppm, con un control sin compuesto.

El experimento central consistió en alimentar a larvas de una colonia fundadora con hígado de pollo mezclado con 0,1ppm de Imidacloprid, y separar un número igual de larvas de la misma colonia y camada para usar como control, sin exponerlos al pesticida. Así los grupos tienen un origen único y se reduce el ruido de las diferencias adaptativas que introduciría distintos orígenes parentales. Las dietas de esta generación fueron preparadas siguiendo el protocolo ya descrito. A partir de la F2 ambas colonias, en todos los replicados, fueron alimentadas con hígado de pollo sin tratar, hasta la F4 cuando terminó el experimento (fig. 2).

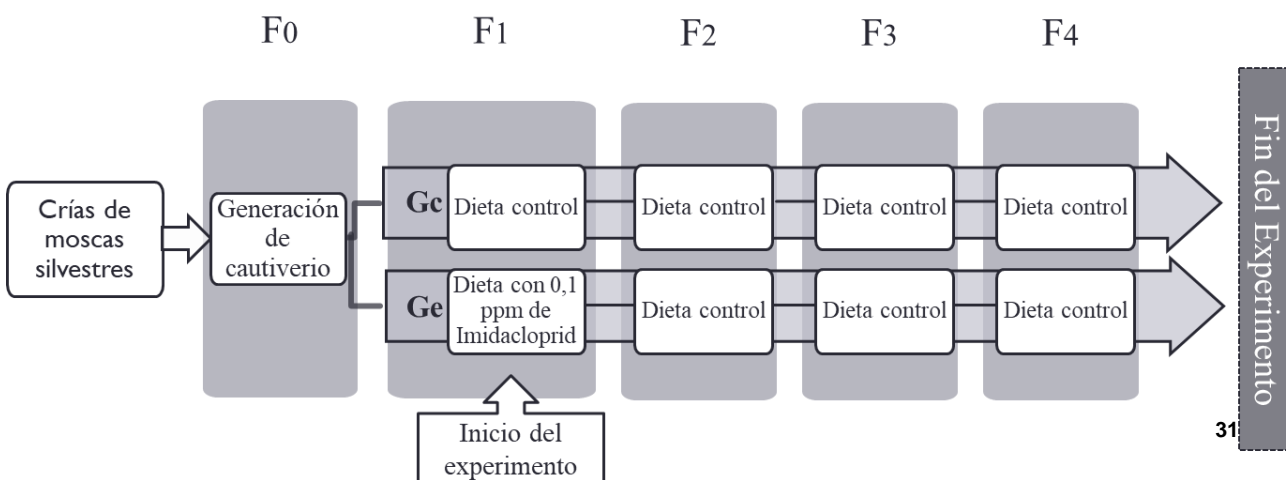


Figura 2: Esquema del experimento destacando las generaciones consideradas (F_{0-4}). La exposición experimental a IMI en dieta larval en F_1 versus control y las subsecuentes generaciones mantenidas en dieta no contaminada, para evaluar la permanencia o desaparición de los posibles efectos gatillados por le pesticida.

Para el experimento se realizaron ocho replicados, con una colonia expuesta al compuesto y otra no expuesta cada uno. Se definió que si un replicado llegaba a la segunda generación era válido y no había que repetirlo, esto en función del tiempo disponible para realizar el experimento. Siguiendo este criterio fue necesario repetir un replicado. El replicado uno tuvo 85 y 86 larvas iniciales, mientras que todos los otros replicados iniciaron con 100 larvas, esto se debió meramente a la disponibilidad de larvas al iniciar el experimento. El protocolo de crianza estuvo conformado por varias etapas subsecuentes. En primer lugar, se ubicó sustrato de oviposición (hígado de pollo) a disposición de las moscas de la colonia fundadora. Una vez depositados los huevos, se traspasó el sustrato con los huevos a un contenedor de plástico transparente de 10cm x 10cm x 5cm, con la tapa perforada para permitir el ingreso de aire (Fig. 3 y 4).



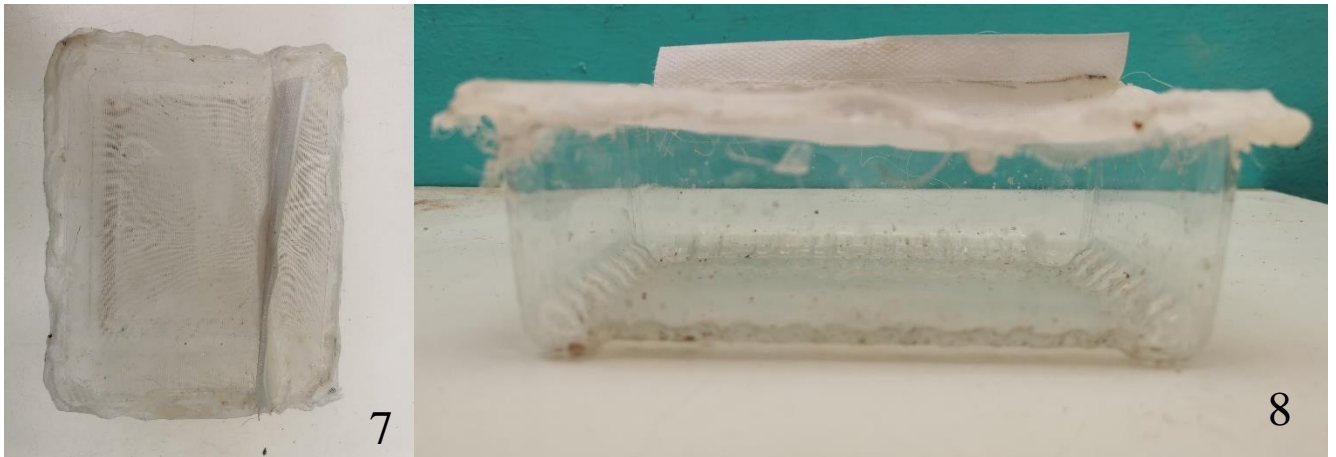
Figuras 3 y 4: Contenedores plásticos para larvas de *L. sericata*

Pasados tres días desde la eclosión de los huevos, se trasladaron las larvas a sustrato de pupación (vermiculita humedecida) en un contenedor de plástico 10cm x 10cm x 5cm con la tapa perforada para permitir el ingreso de aire (Fig. 5 y 6).



Figuras 5 y 6: Contenedores plásticos para pupas de *L. sericata*

Entre siete y cinco días desde la aparición de las primeras pupas, se trasladaron las pupas al contenedor para adultos, correspondiente a una caja de plástico de 15cm x 11cm y 5,5cm, con velo en lugar de tapa, con una apertura sellada con velcro para poder realizar las manipulaciones necesarias (agregar el sustrato de oviposición, por ejemplo) (Fig.7 y 8).



Figuras 7 y 8: Contenedores de plástico para adultos de *L. sericata*

Una vez emergidos los adultos entre 4 y 7 días se les entrega una porción reducida de hígado de pollo, para que las hembras puedan desarrollar sus ovarios, este se deja por dos días en el contenedor, para luego ser removido. A partir de dos días después de la remoción las hembras ya están en condiciones de oviponer y reiniciar el ciclo. Una vez que las hembras pusiesen los huevos, se esperaba hasta el traspaso de las larvas antes de sacrificarlos, en caso de que fuese necesario recolectar más huevos. Luego de ese plazo los adultos eran sacrificados con frío, dejándolos una hora en un congelador a -4°C . Los adultos fueron alimentados con sacarosa ad libitum y tenían acceso a agua por medio de un algodón humedecido (Fig. 1). Se tomaron muestras de las distintas etapas de desarrollo, considerando las limitantes que ejercía la necesidad de preservar las colonias en condiciones de poder llegar a la cuarta generación, por lo que debí ajustar el protocolo original. Empleando dos muestras de larvas, tomando muestras de un mayor (larva A) y un menor tamaño (larva B) en cada réplica para tratar de reflejar la diversidad existente entre las larvas de tercer instar, una muestra de pupas y todos los adultos en buen estado que estuviesen disponibles, por cada colonia en cada generación. Las muestras

fueron fijadas en etanol desnaturalizado al 95° y almacenadas en tubos Eppendorf debidamente rotulados.

Las muestras tomadas fueron posteriormente fotografiadas con una cámara modelo H1400 Shenzhen microtechnology de 14 Mega pixeles, con el software de captura fotográfica S-Eye versión 1.4.1.425 de YangWang technology Co. Las imágenes capturadas fueron tomadas en blanco y negro, por limitantes de la cámara. Con las imágenes obtenidas se realizaron mediciones de los tamaños en larvas, pupas y adultos con el software de procesamiento fotográfico ImageJ versión 1.53e.

Las medidas tomadas fueron largo máximo y ancho máximo para larvas y pupas, en el caso de las pupas al realizarse medir con un procesador de imagen era posible obtener un largo total incluso si la larva estaba curvada, al poder tomar medidas complementarias. En los adultos se midió largo máximo en vista lateral, y ancho y largo de pronoto en vista dorsal. El largo máximo se tomó desde los extremos más alejados a lo largo de cada espécimen, el ancho en la porción más gruesa del espécimen (ver Fig. 9 y 10). Las mediciones de pronoto se tomaron siguiendo los siguientes criterios: para el ancho se medía sobre la sutura transversa, para el alto desde el escutelo hasta el extremo superior del pronoto (ver Fig. 11 y 12).

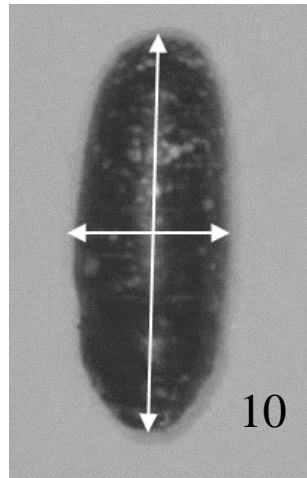
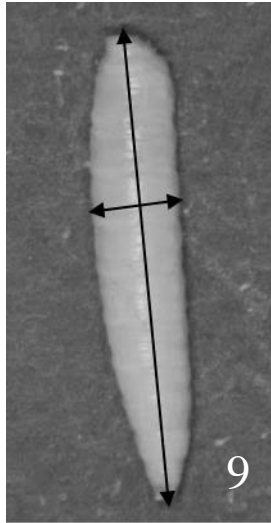
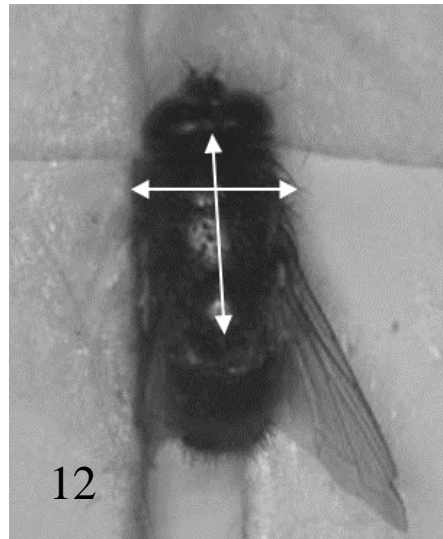
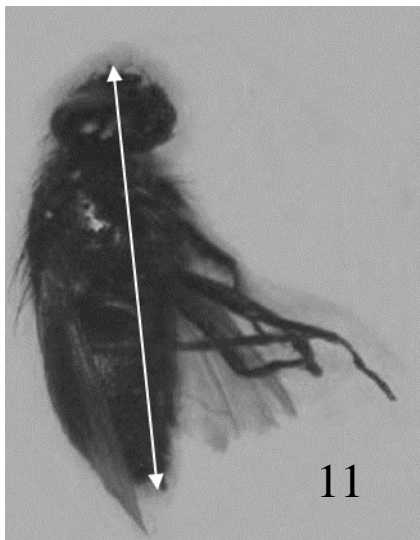


Figura 9 y 10: medidas de ancho máximo y largo máximo en larvas y pupas correspondientemente.



Figuras 11 y 12: Medidas de largo máximo en el imago de *L. sericata*, en vista lateral, y medidas del pronoto en vista dorsal.

6.2 Análisis de muestras

Para analizar las muestras se procesaron ambas larvas, pupas y adultos sacados al azar de entre los disponibles de cada colonia. Hubo casos en que sólo había una muestra disponible, y casos en que sólo se podía tomar una de las medidas en casos con sólo dos especímenes disponibles, en esos casos se tomaron las medidas que eran posibles, y el resto se consideró como dato perdido.

A lo largo del proceso fueron registradas las fechas en las que las moscas alcanzaban cada hito vital, además de registrarse los números de especímenes presentes en cada etapa. Al realizar las manipulaciones necesarias en los adultos fue frecuente que especímenes se escapasen, por lo que el número final de adultos corresponde a los recuperados y no al total inicial. Se sacrificó a los adultos una vez que ya había traspasado la generación siguiente al contenedor de pupación.

6.3 Análisis estadísticos:

Analicé las mediciones morfológicas de larvas y adultos de *L. sericata* con el software SPSS Statistics versión 22 (IBM USA). Estructuré la base de datos en función de generación y número de replicado, esto para maximizar las posibilidades de análisis, quedando con un total de 48 casos.

Primero se realizaron análisis descriptivos, evaluando la cantidad de larvas vivas, larvas muertas, pupas y adultos presentes. Luego se evaluaron los datos con prueba de T de Student de muestras independientes, pruebas de T de Student pareadas y correlación de Pearson, cuando fue procedente. Además, para evaluar las relaciones entre generaciones, se aplicaron pruebas de T de muestras pareadas en Excel Profesional Plus 2019 (Microsoft, USA).

VI. RESULTADOS

6.1 Ensayo de tolerancia al compuesto

En cuanto a supervivencia de larvas y pupas y llegada a la adultez de *L. sericata* expuesto a distintas concentraciones de IMI en la dieta, se observó diferencias en la supervivencia de larvas, mostrándose que el tratamiento con menor letalidad es el tratamiento de IMI a 0,1 ppm en dieta de hígado de pollo. El número de individuos que llegaron a adultos en el tratamiento de 0,1 ppm fue equivalente a la del control (Ver tabla 1 en Anexo B). De hecho, solo presentó efectos letales en un ensayo en que el control tampoco llegó a pupar. Al evaluar con estadísticos descriptivos se observa que el número de larvas vivas presentó mayores medias en los controles (3,2) y en el tratamiento de 0,1 ppm (2,2), presentando también valores máximos más altos en estos tratamientos (Ver tabla 2 en Anexo B). Al evaluar las larvas muertas los tratamientos de 1ppm y 0,01 ppm arrojaron las medias más altas, con el mismo número (3,8), siendo el valor mínimo el control (2,4) (Ver tabla 3 en Anexo B). En el número de pupas también se observan medias más grandes en el control (2,6) y en 0,1ppm (1,8) (Ver tabla 4 en Anexo B). Por último, al comparar el número de adultos se vuelven a observar medias más altas en el control (2,6) y en 0,1ppm (1,6) (Ver tabla 5 en Anexo B). Estos resultados respaldan la decisión de tomar la concentración de 0,1ppm como concentración de estudio al evidenciar las diferencias en la supervivencia de los especímenes.

6.2 Experimento central

En el experimento sobre los efectos de exposición a Imidacloprid durante el desarrollo larval sobre el fenotipo de *L. sericata*, seis de los ocho replicados llegaron a término exitosamente, y en dos se perdieron una de las colonias. Una de las colonias perdidas corresponde a un grupo control (replicado III) y la otra al grupo expuesto (replicado VII), ambos colapsaron en la segunda generación. Así que se trabajó con los datos de los seis replicados del experimento que llegaron a la cuarta generación. Se decidió utilizar sólo los datos de las colonias que llegaron a término, para que los datos fuesen equivalentes entre generaciones. En uno de los replicados (replicado VIII) las pupas de la cuarta generación no eclosionaron, así que se trabajó considerando un número de adultos cero para los análisis.

6.2.1 Análisis descriptivos

A continuación, se presentan los estadísticos descriptivos para los distintos estados de desarrollo, separando por tratamiento (control o expuesto) y generación (primera a cuarta). Estos se realizaron para caracterizar de forma general las distintas variables observadas y su comportamiento a lo largo del experimento, con el fin de evidenciar las tendencias que pudiesen existir.

Larvas

Si analizamos el número de larvas vivas, segregando por generación y tratamiento (Tabla 2) podemos observar que la desviación estándar se va incrementando entre las generaciones, tanto en el control como los expuestos, lo que implica una mayor dispersión de los datos conforme avanzan las generaciones.

La Tabla 1 muestra que el número máximo observado en el control fueron 833 larvas en la tercera generación, mientras que el mayor número de larvas de las colonias expuestas se alcanzó en la cuarta generación con un total de 449 ejemplares. También es posible observar que las medias por generación son más altas en los controles que en las colonias expuestas al compuesto. En la Figura 13 se observan las diferencias entre controles y expuestos en número de larvas vivas, evidenciando las tendencias descritas en la Tabla 2, Observándose en la figura 13 que los valores en general fueron más altos en los controles que en los expuestos. En el gráfico se agrupó a las generaciones en un solo valor, para poder observar las diferencias en detalle.

Tabla 1: Estadístico descriptivos de número de larvas vivas de *L. sericata* por generación y tratamiento

Expuesto o control	generación		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación
							estándar
control	1	larvas vivas	6	31	85	57,67	19,449
		N válido (por lista)	6				
	2	larvas vivas	6	181	432	337,50	106,152
		N válido (por lista)	6				
	3	larvas vivas	6	164	833	383,17	241,447
		N válido (por lista)	6				
	4	larvas vivas	6	52	369	254,17	110,765
		N válido (por lista)	6				
expuesto	1	larvas vivas	6	50	81	63,67	11,708
		N válido (por lista)	6				
	2	larvas vivas	6	108	313	207,33	71,026
		N válido (por lista)	6				
	3	larvas vivas	6	86	280	214,50	68,243
		N válido (por lista)	6				
	4	larvas vivas	6	29	449	185,67	150,923
		N válido (por lista)	6				

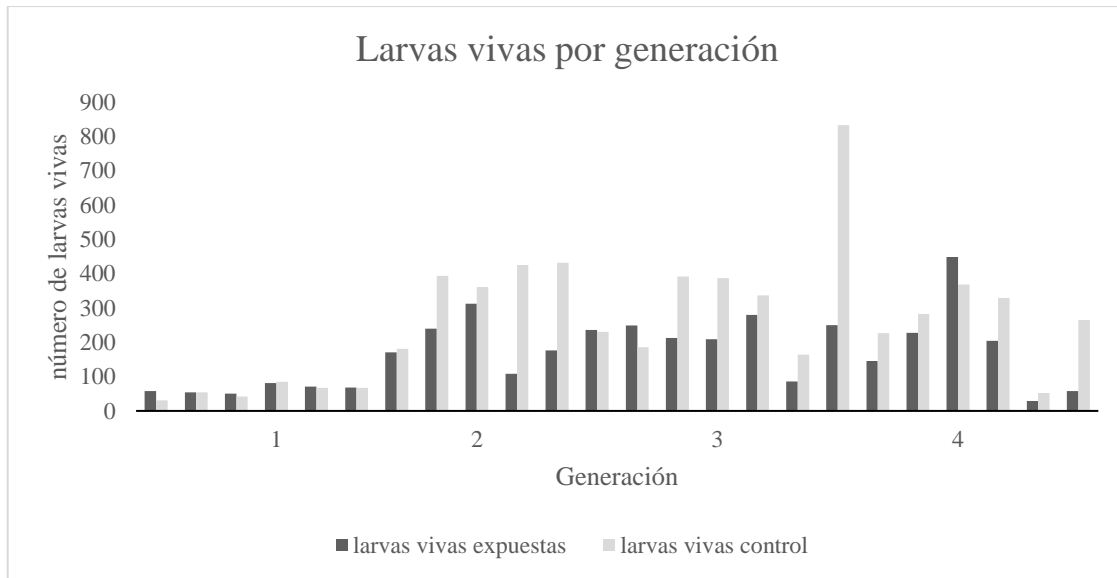


Figura 13: Larvas vivas de *L. sericata* por generación

Si contrastamos a nivel de porcentajes de larvas que sobrevivieron con los mismos estadísticos, se observa una reducción generalizada de la desviación estándar, y que las diferencias entre control y expuesto a nivel de media se reducen (Ver tabla 6 en Anexo B). De hecho, las medias tienden a ser mayores en las colonias expuestas que en los controles, a excepción de la segunda generación. En cuanto a los valores mínimos estos también tienden a ser mayores en los expuestos que en los controles, exceptuando también la segunda generación.

Si contrastamos el número de larvas muertas por generación y tratamiento (Tabla 2) se observa que desde la segunda generación en adelante no se hubo colonias en las que no se registraron larvas muertas, tanto en los expuestos como en los controles. El valor más alto de larvas muertas se observa en los expuestos, al igual que la media más alta, ambas en la segunda generación.

Tabla 2: Estadísticos descriptivos de larvas muertas de *L. sericata* por generación y tratamiento

Expuesto o control	generación	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación	
						estándar	
control	1	larvas muertas	6	15	58	39,83	15,993
		N válido (por lista)	6				
	2	larvas muertas	6	0	9	4,83	3,656
		N válido (por lista)	6				
	3	larvas muertas	6	0	208	63,17	76,528
		N válido (por lista)	6				
	4	larvas muertas	6	0	110	22,67	43,015
		N válido (por lista)	6				
expuesto	1	larvas muertas	6	19	50	34,00	11,747
		N válido (por lista)	6				
	2	larvas muertas	6	0	246	101,67	115,618
		N válido (por lista)	6				
	3	larvas muertas	6	0	11	3,83	5,565
		N válido (por lista)	6				
	4	larvas muertas	6	0	17	5,17	6,646
		N válido (por lista)	6				

En la Figura 14 se observa el número de larvas muertas por generación y tratamiento, y se observa una falta de patrones claros en la distribución, y que en varios casos el valor de larvas muertas fue cero o muy bajo.

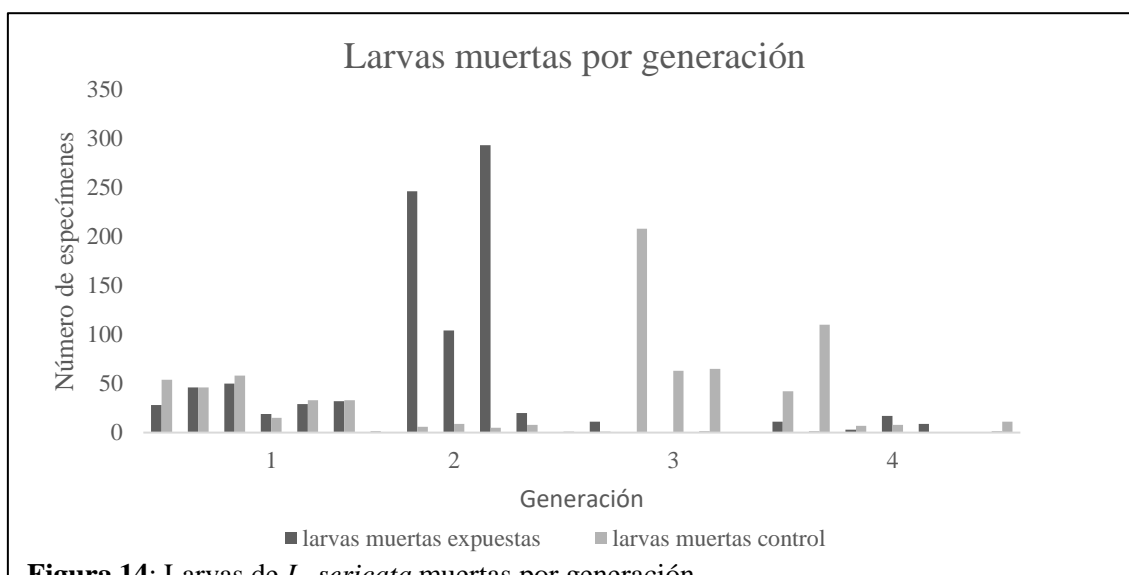


Figura 14: Larvas de *L. sericata* muertas por generación

Al evaluar el porcentaje de mortalidad de las larvas se obtiene que en la primera generación la media más alta es en los controles, pero no hay una tendencia clara a ir en incremento o descenso en el resto de las generaciones (Ver tabla 8 en Anexo B). Por otra parte, al estudiar los largos máximos de las muestras de larvas es posible ver las diferencias entre los especímenes más grandes (larva A) y más pequeños (larva B). Se observa que los rangos de tamaño son más grandes en las larvas B que en las A (Ver tabla 9 en Anexo B). Si evaluamos el ancho de las larvas vemos que las larvas más pequeñas (B) son más diversas en tamaño que las más grandes (A) (Ver tabla 10 en Anexo B).

Pupas

En la Tabla 3 observamos que en las pupas las desviaciones estándar son más altas en los controles que en las colonias expuestas, contrastando por generación. También una vez más nos encontramos con que las medias son mayores en los controles que en las colonias expuestas.

Además, en las pupas expuestas se observa como los mínimos van disminuyendo en cada generación.

Tabla 3: Estadísticos descriptivos de número de pupas de *L. sericata* por generación y tratamiento

Expuesto o control	generación		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación
							estándar
control	1	pupas total	6	19	63	39,83	19,020
		N válido (por lista)	6				
	2	pupas total	6	12	217	79,67	76,959
		N válido (por lista)	6				
	3	pupas total	6	27	246	85,50	85,601
		N válido (por lista)	6				
	4	pupas total	6	5	76	45,00	31,736
		N válido (por lista)	6				
expuesto	1	pupas total	6	24	47	38,67	8,359
		N válido (por lista)	6				
	2	pupas total	6	20	194	77,33	65,674
		N válido (por lista)	6				
	3	pupas total	6	11	119	61,17	45,155
		N válido (por lista)	6				
	4	pupas total	6	3	161	36,67	61,360
		N válido (por lista)	6				

En la Figura 15, se observa la dispersión de los datos de pupas por generación y tratamiento, se ve que los números son más bajos en la primera generación. Esto se debe a que en esta generación el número de larvas había sido limitado artificialmente, lo que se refleja en el gráfico.

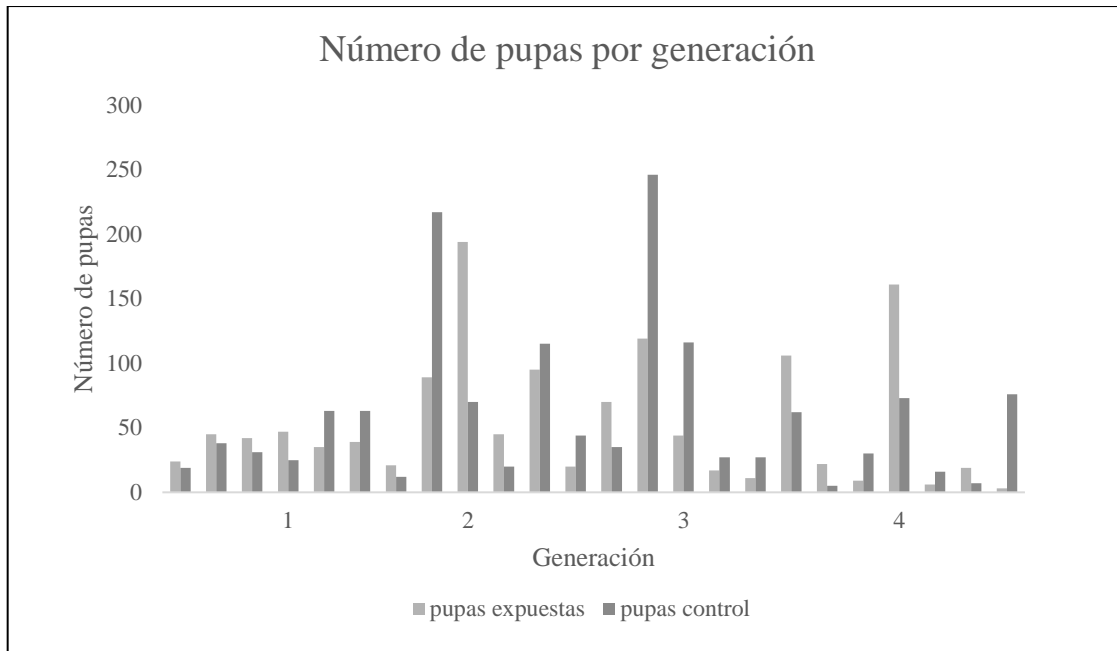


Figura 15: Número de pupas de *L. sericata* por generación y tratamiento.

Si contrastamos el porcentaje de larvas de *L. sericata* que puparon (porcentaje de pupación), en la tabla 4 observamos una reducción de las desviaciones estándar, y vemos que los valores mínimos se van reduciendo con cada generación en los expuestos, lo que no ocurre en los controles.

Tabla 4: Estadísticos descriptivos de porcentaje de pupación

Expuesto o control	generación	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	
control	1	Porcentaje pupas	6	29,41	94,03	70,4903	24,04720
		N válido (por lista)	6				
	2	Porcentaje pupas	6	4,69	55,08	21,9099	18,25687
		N válido (por lista)	6				
	3	Porcentaje pupas	6	7,44	62,76	23,9108	20,74135
		N válido (por lista)	6				

		N válido (por lista)	6				
	4	Porcentajepupas	6	2,20	134,62	33,4574	50,51667
		N válido (por lista)	6				
expuesto	1	Porcentajepupas	6	41,38	84,00	62,2310	17,67936
		N válido (por lista)	6				
	2	Porcentajepupas	6	8,47	61,98	35,9106	21,68722
		N válido (por lista)	6				
	3	Porcentajepupas	6	6,07	55,87	27,7160	18,67616
		N válido (por lista)	6				
	4	Porcentajepupas	6	2,94	65,52	21,4174	24,91623
		N válido (por lista)	6				

En las Figuras 15 y 16 se contrasta el número de larvas y el de pupas en los controles y expuestos, respectivamente. Se observa que hay diferencias considerables en los números de especímenes siendo mayores en las larvas que en las pupas, tanto en los controles como en los expuestos, lo que es coherente con que sólo una parte de las larvas pupa.

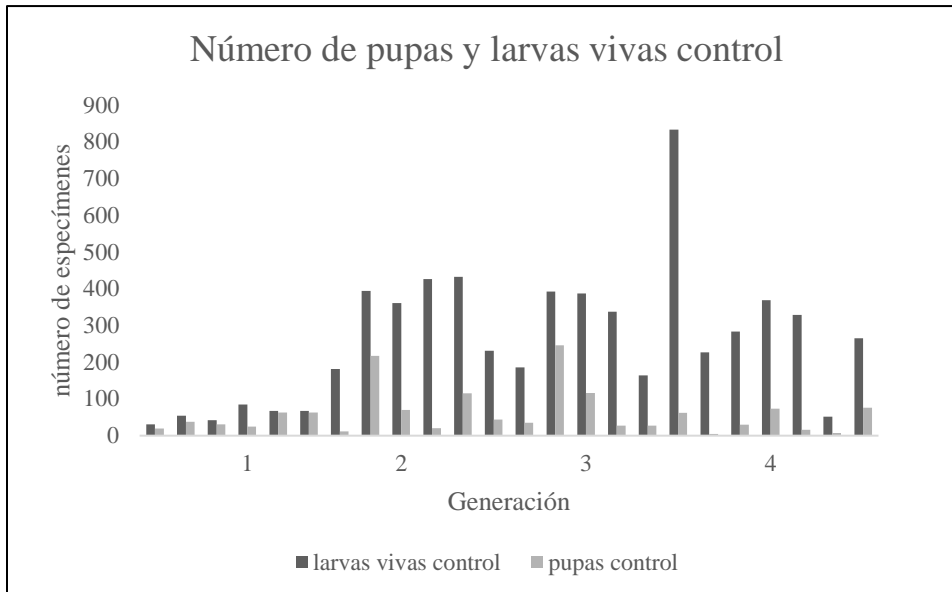


Figura 15: Contraste entre larvas vivas y pupas de *L. sericata* en los controles.

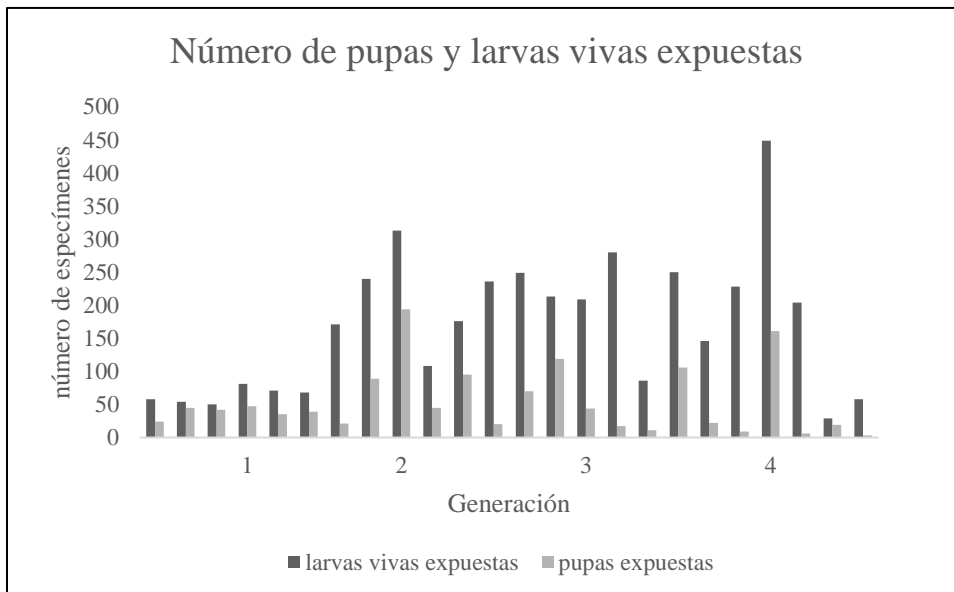


Figura 16: Contraste entre larvas vivas y pupas de *L. sericata* en los

Adultos

Las pupas de la cuarta generación del replicado 8 no eclosionaron durante el tiempo que duró el experimento, así que los análisis de adultos se realizaron asumiendo que hubo cero adultos en la ese segmento de la muestra, debido a que estas no lograron llegar a un estado de imago vivo.

En la Tabla 5 se exponen los estadísticos descriptivos del número de adultos recuperados, y se observa una leve tendencia en las medias a ser más altas en los expuestos que en los controles con excepción de la tercera generación. En el grupo de expuestos los mínimos fueron disminuyendo en tamaño con cada generación.

Tabla 5: Estadísticos descriptivos de adultos de *L. sericata* por generación y tratamiento

Expuesto o control	generación		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
control	1	adultos recuperados	6	2	51	30,33	18,522
		N válido (por lista)	6				
	2	adultos recuperados	6	9	158	51,50	55,565
		N válido (por lista)	6				
	3	adultos recuperados	6	9	112	47,33	38,417
		N válido (por lista)	6				
	4	adultos recuperados	6	1	62	16,83	23,129
		N válido (por lista)	6				
expuesto	1	adultos recuperados	6	19	39	30,50	7,148
		N válido (por lista)	6				
	2	adultos recuperados	6	14	149	60,67	50,631
		N válido (por lista)	6				
	3	adultos recuperados	6	6	84	39,33	27,926
		N válido (por lista)	6				
	4	adultos recuperados	5	2	105	26,20	44,483
		N válido (por lista)	5				

En la Figura 17 se presenta gráficamente el contraste entre los controles y los expuestos en número de adultos recuperados. Se observa que no hubo grandes diferencias, pero la tendencia es a la baja en el número de individuos, conforme avanzan las generaciones al igual que ocurre en las pupas.

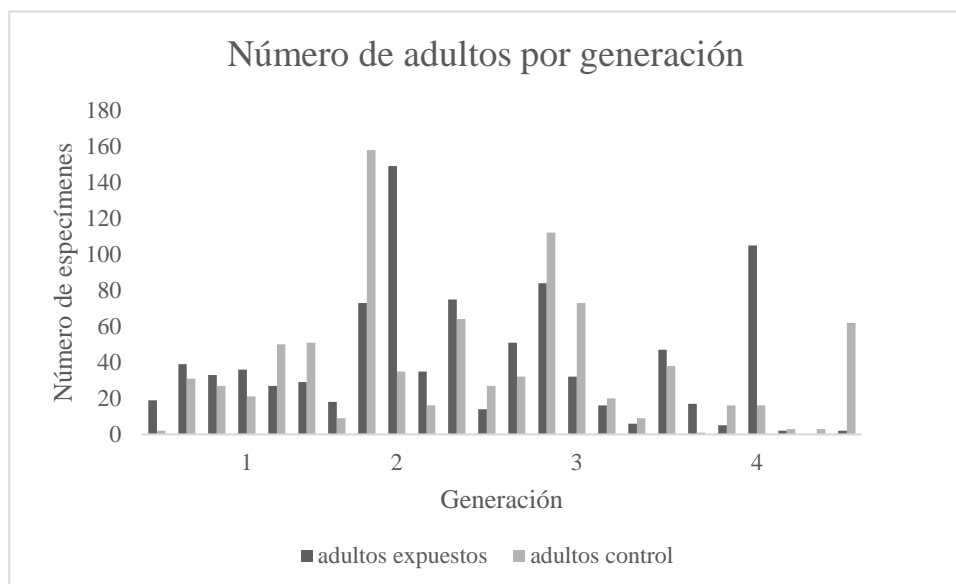


Figura 17: Número de adultos de *L. sericata* por generación según tratamiento

Al evaluar el porcentaje de especímenes que llegaron a adultos (tabla 7) se observa que las medias son más altas en los expuestos que en los controles, y los mínimos vuelven a ir disminuyendo con cada generación que pasa en los expuestos.

Tabla 6: Estadísticos descriptivos de porcentaje de adultos de *L. sericata* por generación y tratamiento

Expuesto o		Desviación				
control	generación	N	Mínimo	Máximo	Media	estándar
control	1	6	10,53	87,10	70,5866	29,54686
	N válido (por lista)	6				
	2	6	50,00	80,00	65,8045	11,89735
	N válido (por lista)	6				

	3	porcentajeadultos	6	33,33	91,43	61,4310	20,51507
		N válido (por lista)	6				
	4	porcentajeadultos	6	4,29	81,58	33,3110	28,60827
		N válido (por lista)	6				
expuesto	1	porcentajeadultos	6	74,36	86,67	78,7504	4,22810
		N válido (por lista)	6				
	2	porcentajeadultos	6	70,00	85,71	78,5443	5,29697
		N válido (por lista)	6				
	3	porcentajeadultos	6	44,34	94,12	68,1959	17,17776
		N válido (por lista)	6				
	4	porcentajeadultos	6	,00	77,27	49,6743	28,49966
		N válido (por lista)	6				

Al abordar el largo de los especímenes adultos de forma descriptiva se observa que en los controles las medias tienden a ir bajando conforme avanzan las generaciones, mientras que en los expuestos no se observa una tendencia clara (Ver tabla 29 en Anexo B). Cuando se evaluó el ancho del pronoto en imagos de *L. serciata* se observó que la media de los controles de los adultos B va disminuyendo con las generaciones. También se ve que las desviaciones estándar van disminuyendo en cada generación para los controles en ambas muestras (Ver tabla 30 en Anexo B). Cuando se analizó descriptivamente el largo del pronoto se observó una reducción de la media entre las generaciones en los controles de las muestras B (Ver tabla 31 en Anexo B). Por último, en las figuras 18 y 19 se contrastan el número de especímenes por estado de desarrollo y generación, con el fin de graficar la tendencia a la reducción de especímenes conforme avanzaban en los estadios de desarrollo.

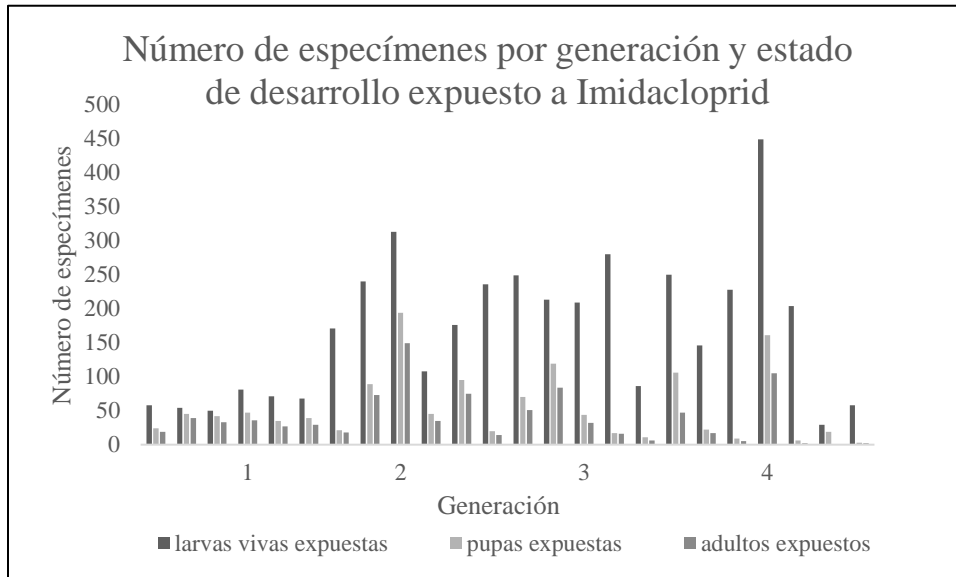


Figura 18: Número de especímenes por generación y estado de desarrollo en expuestos a Imidacloprid

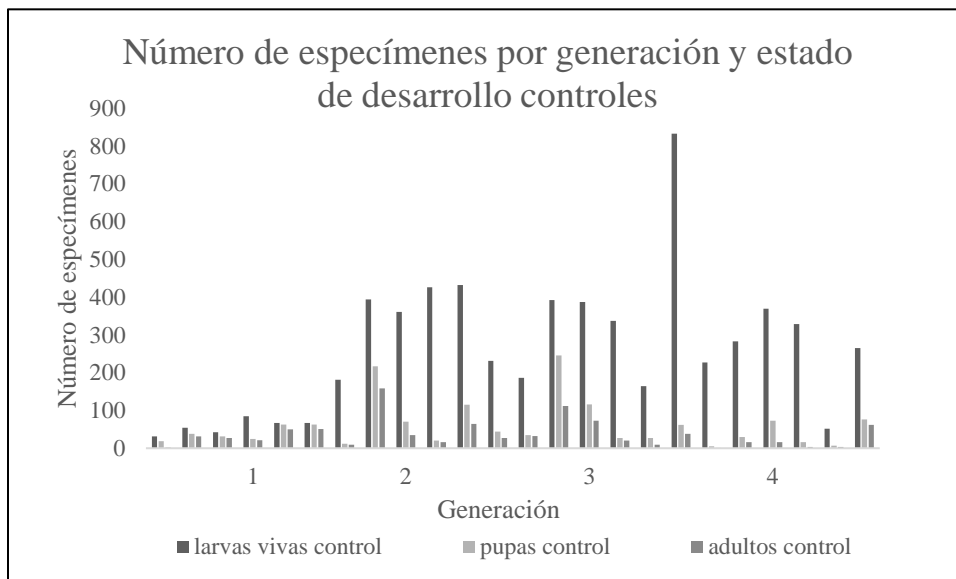


Figura 19: Número de especímenes por generación y estado de desarrollo en controles

6.2.2 Análisis estadístico inferencial

A continuación, presento los análisis estadísticos inferenciales realizados para evaluar los datos obtenidos. Estos los dividí entre hipótesis centrales y confirmación de supuestos, y separados por estadio de desarrollo.

Análisis estadístico inferencial de hipótesis centrales

En esta sección se abordan las preguntas de investigación por medio del análisis estadístico inferencial, revisando en los distintos estadios de desarrollo la existencia de diferencias relevantes entre los controles y los grupos expuestos. Evaluamos tanto los números de individuos como las mediciones de tamaño, contrastando por medio de pruebas T de muestras independientes. Los resultados obtenidos fueron los siguientes.

Larvas

Se hizo una prueba T de Student de para muestras independientes contrastando los controles con los expuestos en el número de larvas vivas. Se observa una importante diferencia en las medias.

Tabla 7: Estadísticas de grupo de prueba T de muestras independientes para larvas vivas de *L. sericata*

				Desviación	Media de error
expuesto o control		N	Media	estándar	estándar
larvas vivas	control	24	258,13	184,611	37,684

expuesto 24 167,79 104,782 21,389

Tabla 8: Prueba de T de muestras independientes para larvas vivas de *L. sericata*

		Prueba de Levene		prueba t para la igualdad de medias						
		de calidad de								
		varianzas								
				95% de intervalo						
				de confianza de la						
				diferencia						
				Sig.	Diferencia	Diferencia de				
				(bilateral)	de medias	error estándar	Inferior	Superior		
		F	Sig.	t	gl					
larvas	Se asumen									
vivas	varianzas	4,708	,035	2,085	46	,043	90,333	43,330	3,114	177,553
	iguales									
	No se asumen									
	varianzas			2,085	36,426	,044	90,333	43,330	2,491	178,176
	iguales									

En la prueba T (Tabla 8) se observa que las diferencias entre las medias de los grupos larvas expuestas versus larvas control son significativas, con intervalos de confianza que superan el valor cero y significancia bilateral. Cuando se realizó el mismo análisis, pero separando por generación, sigue habiendo diferencias, y desde la segunda generación en adelante las medias son más grandes en los controles que en los expuestos.

Tabla 9: Estadísticas grupales de T de muestras independientes para larvas *L. sericata* vivas separado por generación

Generación		expuesto o control		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
1	larvas vivas	control		6	57,67	19,449	7,940
		expuesto		6	63,67	11,708	4,780

Anexo B). Al contrastar el largo en las larvas pequeñas (B) se observan diferencias en las medias, siendo las expuestas más altas, y no se observan resultados significativos. Aplicando la misma prueba, esta vez para evaluar el ancho también tenemos diferencias en las medias, pero no valores significativos (Ver tablas 16 a 19 en Anexo B).

Pupas

Al contrastar el número de pupas con una prueba T de muestras independientes, separando entre control y expuesto no se observan diferencias estadísticamente significativas, y los intervalos de confianza cruzan el cero.

Tabla 11: Estadísticas grupales de prueba T de muestras independientes para pupas de *L. sericata*

	expuesto o control	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
pupas total	control	24	62,50	60,057	12,259
	expuesto	24	53,46	50,094	10,225

Tabla 12: Prueba de T de muestras independientes para pupas

Prueba de Levene de calidad de varianzas				prueba t para la igualdad de medias				
						95% de intervalo de confianza de la diferencia		
				Sig.	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
F	Sig.	t	gl	(bilateral)				

pupas	Se asumen									
total	varianzas	,034	,855	,566	46	,574	9,042	15,964	-23,092	41,175
	iguales									
	No se asumen									
	varianzas			,566	44,565	,574	9,042	15,964	-23,120	41,203
	iguales									

Cuando se realizó el mismo análisis, pero segregando por generación tampoco se observan diferencias significativas y los intervalos de confianza cruzan el cero, lo que contrasta con lo observado en el estadio larval (Ver tablas 22 y 23 en Anexo B). Realizando un conjunto de pruebas T para muestras pareadas para contrastar entre generaciones se observó un valor significativo al contrastar la segunda con la cuarta generación de expuestos. El resto de comparaciones no arrojó valores estadísticamente significativos.

Tabla 13: Significancia bilateral prueba T muestra pareadas pupas por generación

Generación		1		2		3		4
1	x			,195		,283		,939
2		,243	x			,674		,027
3		,264		,777	x			,507
4		,703		,246		,193	x	
		Verde: expuesto		Morado: control				

Cuando revisamos las medidas con pruebas T de muestras independientes, obtenemos que para el largo vemos una leve diferencia entre las medias, y valores no significativos, y para el ancho valores no significativos una leve diferencia en las medias (Ver tablas 24 a 27 en Anexo B).

Adultos

Cuando se analizaron con una prueba T de muestras independientes a los adultos comparando entre controles y expuestos no se observó resultados estadísticamente significativos, las medias tampoco son relevantemente disímiles.

Tabla 14: Estadísticas grupales de T de muestras independientes para adulto

	expuesto o control	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
adultos recuperados	control	24	36,50	37,189	7,591
	expuesto	24	38,08	36,390	7,428

Tabla 15: Prueba de T de muestras independientes para adultos

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
adultos recuperados	Se asumen varianzas iguales	,001	,979	-,149	46	,882	-1,583	10,621	-22,962	19,795
	No se asumen varianzas iguales			-,149	45,978	,882	-1,583	10,621	-22,962	19,796

Al realizar el mismo análisis, pero separando por generación, tampoco se observan resultados significativos, ni tendencias claras (Ver tablas 32 y 33 en Anexo B). Cuando se contrastó entre generaciones con una serie de pruebas T de muestras pareadas se obtuvo significancia sólo al comparar la segunda con la cuarta generación en las colonias expuestas.

Tabla 16: Significancia bilateral prueba T muestra pareadas de adultos por generación

Generación	1	2	3	4
1	x	,187	,465	,629
2	,378	x	,428	,024
3	,388	,798	x	,441
4	,151	,221	,134	x
	Verde: expuesto	Morado: control		

Al comparar las medidas de tamaños que tomamos, contrastando entre control y expuesto con T de muestra independientes, no observo resultados estadísticamente significativos para los largos de los adultos de *L. sercicata* en ninguno de los grupos (A y B), tampoco se observan diferencias relevantes en las medias (Ver tablas 34 a 37 en Anexo B). Adicionalmente, al evaluar el ancho de pronoto se observan diferencias en las medias, pero no valores significativos, en ninguno de los grupos evaluados (A y B). Las diferencias en las medias son más pronunciadas en el grupo A que en el B (Ver tablas 38 a 41 en Anexo B). Al contrastar los valores del largo del pronoto se obtienen medias similares y no se observan valores significativos en ninguno de los grupos (A y B). En esta fase hubo casos en los que no alcanzamos a tener dos especímenes para analizar, pero eso las muestras del grupo B es 23 y no 24 como en el resto de estos análisis (Ver tablas 42 a 45 en Anexo B).

6.2.2.2 Confirmación de supuestos

A fin de evaluar las posibles tendencias que observamos en los estadísticos descriptivos, y ver si encontrábamos otras relaciones entre variables realizamos una serie de análisis estadísticos inferenciales, en base a distintas preguntas. Se evaluó la relación entre los números de especímenes en los distintos estadios de desarrollo, y la posibilidad de que existieran anomalías morfológicas a nivel de proporciones utilizando las medidas de tamaño. Esto se realizó por medio de pruebas T de Student para muestras pareadas y correlaciones de Pearson, conforme fue pertinente.

Pupas y larvas

Al explorar la relación entre el número de larvas y el número de pupas por medio de una prueba T de muestras pareadas. Los resultados son los siguientes: Cuando se realizó una prueba de T de muestras pareadas evaluando entre larvas vivas y número de pupas, bajo la pregunta de si existe o no una relación de dependencia entre las variables, se obtiene que hay diferencias significativas en cinco de las muestras comparadas (Tabla 17). Con unas desviaciones estándar que se incrementan conforme avanzan las generaciones, y que son más altas en los controles que en los expuestos. Las medias de error estándar también se incrementan en cada generación en los expuestos.

Tabla 17: Prueba T de muestras pareadas entre larvas vivas y número de pupas de *L. sericata*

			Diferencias emparejadas								
Exposición	Control	generación	Media	Desviación estándar	Media de	95% de intervalo de		t	gl	Sig (bilateral)	
					error estándar	confianza de la diferencia					
					Inferior	Superior					
control	1	Par	larvas vivas	17,833	21,189	8,650	-4,403	40,070	2,062	5	,094
		1	- pupas total								
	2	Par	larvas vivas	257,833	95,913	39,156	157,178	358,488	6,585	5	,001
		1	- pupas total								
	3	Par	larvas vivas	297,667	242,996	99,203	42,658	552,675	3,001	5	,030
		1	- pupas total								
	4	Par	larvas vivas	209,167	120,349	49,132	82,869	335,465	4,257	5	,008
		1	- pupas total								
expuesto	1	Par	larvas vivas	25,000	12,992	5,304	11,365	38,635	4,713	5	,005
		1	- pupas total								
	2	Par	larvas vivas	130,000	55,223	22,545	72,047	187,953	5,766	5	,002
		1	- pupas total								
	3	Par	larvas vivas	153,333	67,179	27,426	82,833	223,834	5,591	5	,003
		1	- pupas total								
	4	Par	larvas vivas	149,000	105,265	42,974	38,531	259,469	3,467	5	,018
		1	- pupas total								

Adultos y larvas vivas.

Respecto a este nivel de análisis, cuando se comparó con T de muestras pareadas el número de larvas vivas, por el de número de adultos de *L. sericata* recuperados se obtuvo valores

estadísticamente significativos en todos los contrastes (Tabla 18). Además, se observa que en los expuestos la desviación estándar se va incrementando en cada generación, al igual que la media de error estándar.

Tabla 18: Prueba T de muestras pareadas para número de larvas vivas versus adultos recuperados

		Diferencias emparejadas								
				95% de intervalo de						
		Desviación		Media de	confianza de la				Sig.	
expuesto o	generación	Media	estándar	error	diferencia		t	gl	(bilateral)	
control				estándar	Inferior	Superior				
control	1 Par 1	larvas vivas -								
		adultos	27,333	18,726	7,645	7,682	46,985	3,575	5	,016
		recuperados								
	2 Par 1	larvas vivas -								
		adultos	286,000	95,833	39,124	185,429	386,571	7,310	5	,001
		recuperados								
	3 Par 1	larvas vivas -								
		adultos	335,833	236,874	96,703	87,249	584,418	3,473	5	,018
		recuperados								
	4 Par 1	larvas vivas -								
		adultos	237,333	108,533	44,309	123,435	351,232	5,356	5	,003
		recuperados								
expuesto	1 Par 1	larvas vivas -								
		adultos	33,167	13,541	5,528	18,956	47,377	6,000	5	,002
		recuperados								
	2 Par 1	larvas vivas -								
		adultos	146,667	52,804	21,557	91,252	202,081	6,804	5	,001
		recuperados								

3 Par 1	larvas vivas -								
	adultos	175,167	63,842	26,063	108,169	242,164	6,721	5	,001
	recuperados								
4 Par 1	larvas vivas -								
	adultos	190,800	107,962	48,282	56,748	324,852	3,952	4	,017
	recuperados								

Estos resultados sugieren que la relación entre las variables sería una correlación positiva y que habría diferencia en las medias. Se observó, además, tendencias sugerentes de la relación esperable entre ambas, de nuevo, sin larvas vivas no puede haber adultos.

Adultos y pupas

Al evaluar con una prueba t de muestras pareadas contrastando el número de pupas con el de adultos, se observó algunos resultados estadísticamente significativos, en las generaciones uno y cuatro de los controles, y uno, dos y tres de los expuestos. Se encontró, además, un incremento en la desviación estándar entre generaciones para los expuestos, y el mismo comportamiento se observa en las medias de error estándar (Tabla 19).

Tabla 19: Prueba T de muestras pareadas entre número de pupas y de adultos

		Diferencias emparejadas						
		95% de intervalo de						
		Media de		confianza de la				
Expuesto		Desviación	error	diferencia			Sig.	
o control	generación	Media	estándar	estándar	Inferior	Superior	t	gl (bilateral)

control	1	Par 1	pupas total -									
			adultos	9,500	5,320	2,172	3,917	15,083	4,374	5	,007	
			recuperados									
	2	Par 1	pupas total -									
			adultos	28,167	23,920	9,765	3,064	53,269	2,884	5	,034	
			recuperados									
	3	Par 1	pupas total -									
			adultos	38,167	49,036	20,019	-13,294	89,627	1,907	5	,115	
			recuperados									
	4	Par 1	pupas total -									
			adultos	28,167	26,664	10,886	,185	56,149	2,588	5	,049	
			recuperados									
expuesto	1	Par 1	pupas total -									
			adultos	8,167	2,317	,946	5,736	10,598	8,635	5	,000	
			recuperados									
	2	Par 1	pupas total -									
			adultos	16,667	15,227	6,216	,687	32,647	2,681	5	,044	
			recuperados									
	3	Par 1	pupas total -									
			adultos	21,833	21,803	8,901	-1,047	44,714	2,453	5	,058	
			recuperados									
	4	Par 1	pupas total -									
			adultos	14,000	23,527	10,521	-15,212	43,212	1,331	4	,254	
			recuperados									

Tamaño de especímenes

Por la naturaleza de los datos asociados a tamaño los abordamos por medio de correlaciones de Pearson. Esta exploración es más una forma de confirmar las relaciones esperadas entre variables, que la búsqueda de patrones inesperados. Los resultados fueron los siguientes.

Tamaño de larvas

En larvas se tomaron dos medidas: largo y ancho máximo, y tuvimos dos muestras A (más grande) y B (más pequeña). Evaluamos el tamaño de los especímenes disponibles por medio de correlaciones de Pearson, para ver si existía una correlación entre estos, la cual es esperable. Cuando se comparó el largo y el ancho de la larva A, la más grande, se obtienen resultados significativos para ambas muestras (control y expuesto). Confirmando que existe una correlación positiva entre estas variables (Ver tabla 21 en Anexo B). Al contrastar el largo y el ancho de la larva B, la más pequeña, también se encuentra una correlación positiva y significativa entre ambas variables, lo que coincide con los resultados esperados (Ver tabla 22 en Anexo B). Se observaron resultados acordes a lo esperado en mi propuesta, evidenciándose la relación entre las variables de tamaño corporal ancho y largo en larvas de *L. sericata*.

Tamaño pupas

Para las pupas se tomaron las medidas de ancho y largo máximo, y sólo se tenía una muestra por colonia por generación.

Cuando se compararon los datos con una correlación de Pearson, se observó una correlación positiva y significativa entre las variables, demostrando que están relacionadas (Ver tabla 28 en Anexo B). Los resultados son coherentes con lo esperado, descartándose circunstancias como que a mayor longitud menor fuese el ancho de la pupa, u otras aberraciones de ese tipo para esta fase.

Tamaño de los adultos

En adultos de *L. sericata* se evaluaron tres elementos: largo total, ancho del pronoto y largo del pronoto. Además, se tomó dos muestras de adulto por colonia por generación, en la medida en que fue posible, porque hubo casos en donde había sólo un espécimen, o los otros se encontraban demasiado dañados para hacer análisis. En los casos en que los especímenes disponibles se encontraban en mal estado se tomaron las medidas que era posible y el resto se registraron como perdidas. Estos datos fueron analizados con correlaciones de Pearson, y los resultados fueron los siguientes. Cuando se evaluó con una correlación de Pearson para el largo máximo de la mosca, contrastando con el ancho del pronoto, observó una correlación positiva y significativa, para ambas muestras (Ver tablas 46 y 47 en Anexo B). Por otra parte, cuando se comparó el largo máximo del cuerpo y se contrastó con el largo del pronoto de los imagos, esto arroja una correlación positiva y significativo para ambas muestras (Ver tablas 48 y 49 en Anexo B). Al contrastar el ancho y el largo del pronoto volvimos a obtener resultados significativos y con una correlación positiva en ambas muestras (Ver Tablas 50 y 51 en Anexo B). Los resultados obtenidos, son consistentes con lo que uno esperaría encontrar si los especímenes analizados fuesen proporcionados, lo que nos permite descartar hasta cierto punto anomalías morfológicas en las muestras analizadas. Esto no implica que no pudiesen existir tales anomalías entre la totalidad de larvas, pupas y adultos que hubo en el experimento, pero sí que en los que analizamos no se observan anomalías en los parámetros analizados.

VII. DISCUSIÓN.

A través del diseño experimental aplicado se logró visualizar los efectos de la contaminación del sustrato de alimentación larval en las medidas de tamaño corporal empleadas en los estados de desarrollo de *L. sericata* estudiados. Así mismo luego de la exposición a este tóxico en la generación F₁, los efectos registrados perduraron en las siguientes generaciones en particular en la reducción del número de larvas en los expuestos en contraste con los controles. Este patrón revela primeramente una alteración plástica de los patrones de desarrollo de *L. sericata* bajo estrés por IMI y en segundo lugar que esta respuesta podría tener un componente transgeneracional.

7.1 Discusión de los resultados

Los análisis arrojaron varios resultados relevantes. Se observó una diferencia en el número de larvas y pupas entre controles y expuestos, lo que sugiere un efecto negativo del compuesto en *L. sericata*. Algo similar ocurrió con las pupas, pero fue menos marcado. En cuanto a los adultos las diferencias fueron menos evidentes, pero se destaca que invirtieron la tendencia anterior y fueron más en los expuestos que en los controles. Al evaluar los tamaños se observó que los especímenes eran proporcionados en cuanto a mediciones de tamaño, lo que sugiere que no se generaron aberraciones producto del compuesto en la dosis utilizada. No se observó respuesta hormética, y los cambios que se vieron posiblemente pueden adjudicarse a plasticidad fenotípica de *L. sericata* (Hunt *et al.*, 2013).

El primer desafío que se debió enfrentar y que tuvo consecuencias a nivel de análisis de datos fueron las limitantes de muestreo. Habían restricciones en el número de individuos que se podía remover, porque se ponía en riesgo la supervivencia y perpetuación de las colonias. Hubo circunstancias en las que remover una pupa, que fue tamaño muestral definido para este estadio de desarrollo, realmente podía implicar que el replicado colapsara al no haber suficientes adultos como para poder garantizar que habría postura de huevos para iniciar la siguiente generación. Al momento de hacer los análisis estadísticos fue un problema el bajo número de muestras que tenía disposición, más aún porque inicialmente esperábamos contar con ocho replicados, pero por los problemas antes descritos dos colapsaron, perdiendo esos datos, pues ya no eran contrastables con sus contrapartes. A pesar de las limitantes la forma en que organicé los datos nos permitió hacer varios análisis, los cuales entregaron valores significativos, lo que sugiere que hubo diferencias importantes como para que se expresaran a pesar de lo reducido del conjunto de datos.

Farahat *et al.* (2018) encontró respuestas adversas en *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Culicidae) ante la exposición a Imidacloprid, en contraste Yusmalinar *et al.* (2017) encontró respuestas positivas al exponer a especímenes de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) ante la exposición al mismo pesticida. Las concentraciones utilizadas en este estudio daban espacio a ambas posibilidades, por lo que es ventajoso haber usado análisis de dos colas. A partir de los análisis realizados se pudo identificar que la exposición al pesticida tuvo consecuencias en la especie de estudio y que estas fueron diferentes según estado de desarrollo.

7.1.1 Larvas

Al contrastar el porcentaje de larvas que sobrevivieron se observa una reducción en las desviaciones estándar, mientras que las medias tienden a ser mayores en los especímenes expuestos que en los controles (Tabla 1)., excepto en la segunda generación, donde la media es más alta en el control. También se observa una excepción en las desviaciones estándar de la segunda generación, que es más baja en el control que en los expuestos. Pero en las otras generaciones las medias son más altas en los expuestos. Siendo estos valores porcentuales se invisibiliza la cantidad de larvas que fueron en total, por la estandarización de los valores, lo que es menos preciso que la observación de las larvas en sus números totales.

En base a los resultados obtenidos contrastando números totales de larvas pude observar que existen diferencias entre los controles versus los especímenes expuestos a dietas contaminadas con Imidacloprid. Un análisis descriptivo del número de larvas vivas nos arroja que los valores máximos son más altos en los controles, y que los valores mínimos también tienden a ser más altos en los controles que en los grupos expuestos. La desviación estándar se va incrementando entre generaciones, tanto en el control como en el expuesto a Imidacloprid y esto sugiere que en la medida en que ya no controlamos el número de larvas se incrementa la dispersión de datos. También se observa que las medias son más altas en los controles que en los expuestos, lo que puede sugerir que el Imidacloprid tuvo efecto sobre los especímenes que fueron expuestos a él, y que estos efectos se mantuvieron a lo largo de las generaciones.

Por otra parte, cuando comparamos controles con expuestos de las larvas vivas por medio de una prueba T de Student de muestras independientes se observan resultados significativos reflejando una diferencia entre las poblaciones (ver Tabla 7). Si lo segregamos por generación, se observan valores significativos en la segunda generación solamente. Esto es destacable,

porque contrastando entre seis muestras aun así se observaron diferencias significativas, lo que nos indica que tienen que ser radicalmente distintos como para dar resultados significativos con un tamaño de muestra relativamente reducido. En cuanto a las cifras de larvas muertas no se encontraron patrones claros observables. Esto puede haberse visto influenciado porque en varias colonias el número de larvas muertas fue cero. No obstante, al evaluar el porcentaje de mortalidad este fue más alto en los controles que en los expuestos, lo que debe ser considerado con cautela, pues al ser un porcentaje homologa las muestras e invisibiliza el comportamiento de los datos brutos, como pudimos observar en el análisis de larvas vivas.

Al comparar las medidas de largo y ancho de las larvas observé que los rangos de tamaño fueron más amplios en las larvas pequeñas (B) que en las grandes (A). Al evaluar con pruebas de Pearson contrastando el ancho y largo de las larvas se obtuvieron resultados significativos con correlaciones positivas. Esta relación resulta lógica y demuestra que las larvas que muestreamos son proporcionadas, descartando anomalías al menos en esa dimensión. Cuando se tomaron las muestras de larvas se procuró buscar diversidad en los tamaños, y se revisó si había especímenes anormales. Como el traspaso de larvas se hacía una por una, contándolas, es posible decir que no se observaron larvas con deformidades evidentes a simple vista, tanto en las vivas como en las muertas. Esto es relevante porque en otros estudios sí se han observado anomalías morfológicas en estadios larvarios ante la exposición a sustancias químicas nocivas (Fathy et al., 2018).

Al contrastar el número de larvas vivas por generación con pruebas de T pareadas, separando entre controles y expuestos, se obtuvieron valores significativos en cinco casos, dos en los expuestos y tres en los controles. De estos, cuatro estuvieron pareados, es decir, se observó significancia tanto en el expuesto como en el control correspondiente, esto para el contraste generación 2 versus 1 y 3 versus 1, lo que hace que estos resultados sean poco llamativos, al

encontrarse en ambas partes, pues descarta la posibilidad de que las diferencias se deban al compuesto. Pero al contrastar las generaciones 1 y 4 del control dio significativo. Es difícil atribuir esta diferencia a algún factor en particular, pues se trata del control, así que puede deberse a variables estocásticas.

En síntesis, en las larvas observamos diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los expuestos (Tabla 1). Estas diferencias se expresaron en el número de larvas vivas a nivel de números brutos, y también al evaluar con una las diferencias entre controles y expuestos por generación con una prueba de T. Es interesante que se observasen diferencias en la segunda generación, puesta esta estuvo expuesta “indirectamente” al compuesto. Esto puede ser de dos formas, por una parte, puede tratarse de efectos parentales, que durante la exposición de la madre al compuesto se hayan gatillado respuestas fisiológicas (e.g. en sus gonadas) o de aprovisionamiento de los huevos que afectara a su descendencia (Tachibana & Numata, 2004). Respecto a este tipo de efecto con relación a pesticidas en insectos, esto sólo ha sido reportado hasta la fecha en Lepidoptera (Rabelo et al., 2020). La otra alternativa para explicar este tipo de efectos es que se deba a efectos epigenéticos, que están siendo revelados como reguladores y gatillantes de cambios en el nicho ontogénico de insectos expuestos a estrés en el desarrollo por cause de pesticidas (Anexo A). La evaluación de los mecanismos epigenéticos moleculares que subyacen al efecto transgeneracional encontrado quedará como materia de estudio para un futuro próximo. Por último, se comprobó que a nivel de medidas no hay anomalías significativas que puedan sugerir malformaciones en ninguno de los grupos.

7.1.2 Pupas

Al realizar una prueba de T de muestras pareadas entre el número de larvas vivas y el número de pupas se obtienen diferencias significativas, lo que es coherente con que se traten de dos

estadios desarrollo distintos. Estas diferencias poblacionales coinciden con las marcadas diferencias que se observaron entre número de larvas vivas y pupas por colonia, con porcentajes inferiores de pupación que incluso llegaron a menos del 3%.

Al abordar el número de pupas con estadísticos descriptivos, se observa que las medias son mayores en los controles que en los expuestos, otra vez sugiriendo un efecto de la exposición al compuesto. Al evaluar el porcentaje de pupación, es decir el número de pupas que salieron del total de larvas vivas, no se observan tendencias marcadas. Al contrastar el número pupas de distintas generaciones entre sí con pruebas T de muestras pareadas, solo se obtuvo resultados significativos en el par de la segunda y cuarta generación en los expuestos. Este resultado es interesante, pues la segunda generación estuvo expuesta indirectamente al compuesto, mientras que la cuarta no estuvo en contacto de ninguna manera con el pesticida.

Cuando se evaluó las medidas de largo y ancho en pupas con una correlación de Pearson se obtienen resultados estadísticamente significativos, con una correlación positiva, lo que es de esperar, porque al igual que en las larvas estas medidas están relacionadas. Del mismo modo que en las larvas cuando se tomaron las muestras se procuró tener en cuenta la presencia de individuos anormales, pero no se observaron individuos con anomalías evidentes.

Entonces, se puede decir sobre lo observado en las pupas que hay diferencias entre los controles y los expuestos, las que sugieren un efecto negativo del compuesto. De nuevo se observan diferencias al contrastar entre la segunda y la cuarta generación en las larvas expuestas, lo que sugiere que el compuesto puede haber afectado a los individuos incluso siendo una exposición indirecta. En cuanto a las mediciones no se observaron anomalías en proporciones, lo que sugiere formas normales.

7.1.3 Adultos

Las pupas de la cuarta generación del grupo expuesto del octavo replicado que no eclosionaron durante el experimento pueden tanto haber muerto, como entrado en diapausa, pero debido a las limitantes temporales del experimento, no fue posible esperar a descubrirlo, por lo que se las consideró como muertas para los análisis y se consignó un número de cero adultos para esa colonia.

Los análisis descriptivos de los adultos recuperados muestran que hay una tendencia a que las medias sean mayores en los adultos expuestos y, las desviaciones estándar tienden a ser más altas en los controles. Esto es inesperado, pues tanto en larvas como en pupas se observó la tendencia opuesta, con valores más altos en los controles. Esto da espacio a preguntarnos si es posible que haya efectos diferenciales según el estadio de desarrollo. Por ejemplo, es muy posible que el tipo de efectos varíe según la etapa de desarrollo en la que los organismos sean expuestos. Pero, a partir de los resultados obtenidos, se plantea la posibilidad de que los efectos de la exposición al compuesto en etapas tempranas se expresen de forma diferente en las distintas fases de desarrollo.

Al analizar el porcentaje de especímenes que llegaron a la adultez, se observó que las medias fueron más altas en los expuestos que en los controles, al igual que se vio con los estadísticos para número total de adultos. Esto puede sugerir un efecto ventajoso del pesticida en los especímenes expuestos, como un incremento en la supervivencia de las pupas la que conlleva a un mayor número de adultos que emergen. Además, está el factor de los adultos que se escaparon durante la manipulación de las colonias, lo que puede haber afectado de forma dispar a las distintas colonias, pero no hubo cómo medirlo, así que es sólo una conjetura. En varias de las colonias (seis en total), el número de adultos en la cuarta generación fue menor a cinco, lo que hubiese hecho improbable que se sostuviesen a una siguiente generación y habría colapsado el

experimento haber requerido una quinta generación. Esta reducción del número de adultos se observó tanto en controles como en expuestos, lo que da para preguntarse a qué se debe, quizás podría ser depresión poblacional por endogamia (Gagliardi *et al.*, 2015), pero no hubo cómo confirmarlo.

Se realizó una serie de pruebas T de muestras pareadas contrastando los adultos de las distintas generaciones, y una vez más se volvió a encontrar que la única que dio positiva fue la segunda con la cuarta generación en los expuestos, al igual que en las pupas, lo que es curioso porque no se observó esa relación en las larvas. Como se mencionó antes, es posible que esta diferencia se deba a la exposición indirecta al compuesto que tuvo la segunda generación, cuyos efectos pueden haberse perdido por completo tras dos generaciones sin exposición alguna al compuesto. Al realizar una prueba de T pareadas contrastando el número de larvas vivas con el de adultos, se obtuvo valores significativos tanto en los controles como en los expuestos, como es de esperar siendo etapas de desarrollo distintas y con la tendencia generalizada que hubo de ir reduciéndose el número de individuos conforme avanzaban por los estadios de desarrollo (Figuras 18 y 19). En el contraste entre pupas y adultos con T pareada, se observan algunos valores significativos, pero las diferencias son menos claras, esto puede deberse a que son estadios más cercanos entre sí, o, más probablemente, al bajo número de casos del que disponemos.

Al comparar el ancho del pronoto con el largo máximo con una correlación de Pearson se observan resultados significativos y una correlación positiva, lo que se repite con el largo de pronoto contrastado al largo total. Estos resultados son coherentes, pues el tamaño del pronoto depende en cierta medida del tamaño general de la mosca, no obstante, las variables que determinan la alometría en dípteros son diversas así que hay que considerar esta relación con cuidado (Horstein & Peretti, 2011; Smith *et al.*, 2015). Cuando se contrastó el largo de los especímenes

adultos se observó que en los controles hubo una tendencia a ir reduciéndose el tamaño conforme se avanzaba en las generaciones, pero no hubo tendencias claras en los expuestos, el problema con esta tendencia es que puede ser espuria, porque al contar los adultos se observó una gran diversidad de tamaños entre estos, la que no necesariamente se vio reflejada en el muestreo de este estadio, el cual realicé aleatoriamente y consideré sólo dos especímenes.

De estos resultados se puede inferir que sí hubo un efecto por la exposición a Imidacloprid, el que se observó con mayor intensidad en la segunda generación, lo que puede sugerir que el efecto del pesticida es más fuerte en la descendencia que fue expuesta indirectamente al compuesto, ya fuese por efectos parentales en reacción al compuesto (e.g. Rabelo et al., 2020), o por efectos relacionados con herencia epigenética de estas alteraciones (Anexo A). Este patrón podría sugerir un desfase en el efecto del químico en dosis subletales entre generaciones. Además, se observaron tendencias que se perpetuaron en todas las generaciones, como las medias más bajas de larvas en los expuestos que en los controles, lo que podría estar reflejando un grado de efecto transgeneracional, al perpetuarse hasta la cuarta generación sin exposición al compuesto tóxico.

7.2 Respuestas a la exposición a toxinas en dípteros

Los resultados obtenidos contrastan con los de Yusmalinar et al. (2017), quienes observaron un incremento en la fertilidad de *M. domestica* a nivel transgeneracional al exponerlas a Imidacloprid. Una diferencia clave es el momento del ciclo biológico en que las expusieron al compuesto. Los autores expusieron a adultos mientras que en este experimento se expusieron larvas de los primeros estadios de desarrollo. Otro elemento a considerar es el número de generaciones estudiadas, mientras Yusmalinar et al. (2017) evaluaron hasta la décima, este

trabajo evaluó hasta la cuarta. Por último, las diferencias de organismo modelo pues siendo ambas moscas cosmopolitas, *M. domestica* es conocida por generar resistencia a pesticidas (Scott, 2017; Ma et al, 2017; Kavi, Kauffman & Scott, 2014; Kristensen, Spencer & Jespersen, 2001). Las respuestas adaptativas de *L. cuprina* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) a distintos pesticidas, en particular a compuestos organofosforados (Campbell et al., 1998), piretroides, carbamatos y benzoilureas (Kotze & Sales, 1994), estudios que han evidenciado la gran capacidad de adaptación de esta mosca. Al evaluarse el potencial de letalidad del Imidacloprid en *L. cuprina*, en contraste con dos compuestos de origen vegetal, el neonicotinoide fue el compuesto más letal para larvas del tercer estadio de desarrollo (Khater, 2021). Lo que se observó en los resultados fue más una reducción el número de larvas en los expuestos, que un incremento en la mortandad de estas, lo que es esperable pues utilizamos dosis subletales, pero no deja de ser interesante, sobre todo porque esta reducción se perpetúa en las distintas generaciones.

Kavi *et al.* (2014), evaluaron el desarrollo de tolerancia a Imidacloprid en *M. domestica*, y observaron diferencias de sexo en el desarrollo de tolerancia, el estudio trabajó directamente con adultos, por lo que era posible determinar el sexo. En este trabajo no se pudo evaluar la mortandad en adultos, por las limitantes temporales y materiales. Por un lado, las moscas pueden vivir hasta más de 30 días (Rueda et al., 2010), mientras que en términos materiales no estaba disponible el espacio para mantener distintas generaciones de las colonias de forma simultánea. Además, los autores trabajaron contrastando cepas con resistencia con cepas sin resistencia, las que habían sido criadas en laboratorio por múltiples generaciones y con estudios de sus genomas. Mientras que se obtuvieron las muestras con cebo y no se pudo hacer análisis moleculares, por lo que no se sabe si tenían alguna adaptación subyacente. De todas formas, se procuró tomar muestras de forma espaciada, a fin de reducir el riesgo de que mis colonias

fundadoras estuviesen emparentadas, y suponemos que en los replicados habría suficiente diversidad genética como para evitar efectos de selección para el pesticida estudiado. De todas formas, mis resultados no sugieren tolerancia, si no que el pesticida tuvo un efecto negativo a nivel de larvas y pupas.

Li et al. (2012), en China, exploraron la resistencia al Imidacloprid contrastando en *M. domestica* entre una cepa susceptible, una cepa colectada y otra con resistencia creada por los autores. Evaluaron además si existía resistencia cruzada con Azamethiphos (organotiofosfato), Beta-cipermetrina (piretroide), Chlorphyrifos (organofosforado) y Acetapirimid (neonicotinoide). Los autores se tardaron 21 generaciones en crear la cepa resistente a Imidacloprid, la que presentó cierto nivel de resistencia cruzada, en particular con la Beta-cipermetrina. Otro resultado relevante fue que determinaron que la susceptibilidad a los compuestos era más alta en larvas de segundo instar, en contraste con adultos de cuatro de edad. En este estudio expuse a los especímenes durante su estadio larvario temprano, y si en este estadio de desarrollo son más susceptible entonces las respuestas negativas que observamos en número de individuos en larvas y pupas, podrían tener relación con esta mayor sensibilidad.

Farahat et al. (2018) investigaron el efecto del Imidacloprid en *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Culicidae), observando letalidad desde 0,01pm en larvas de tercer estadio del mosquito. Este estudio contrastó ácido tánico con Imidacloprid determinando que el segundo era más tóxico, pero ambos compuestos eran buenos larvicidas. En este trabajo el porcentaje de mortalidad de larvas fue más alto en los controles que en los expuestos, no obstante, el número de muestras del estudio de Farahat et al. es mucho mayor al nuestro, por lo que sus resultados en este aspecto son más significativos. Además, nosotros trabajamos directamente con dosis que sabíamos eran subletales para la *L. sericata*, pues las habíamos testeados previamente en el

ensayo de tolerancia a compuesto, en donde se obtuvieron resultados que mostraban la considerable diferencia de efectos en cuanto a mortandad entre distintas concentraciones.

En cuanto a efectos subletales, como se describió en los resultados, se encontró con una reducción en las poblaciones de especímenes a nivel de medias que fueron expuestos al Imidacloprid, lo que perduró durante las generaciones, al menos a nivel de larvas y pupas, pero que en adultos pareció tener un efecto positivo. Un estudio similar al presente fue el realizado por Fathy et al. (2008), quienes investigaron el efecto de la codeína en *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae), identificando diversas malformaciones en las larvas, pupas y adultos de moscas expuestas a carne contaminada con codeína, y una generación después de esta exposición. Debido a las circunstancias no fue posible revisar en más detalle la morfología de las moscas, larvas y pupas, pero no observé malformaciones a simple vista, y varias de las descritas en el trabajo de Fathy et al. (2008), presentaban desproporciones en el cuerpo y colapso de los segmentos corporales en larvas, en adultos se observaban cambios de coloración, anomalías en la morfología de las alas y del cuerpo completo de los adultos las que eran evidentes incluso sin lupa.

Esta investigación estuvo enfocada en evaluar los efectos subletales del Imidacloprid en *L. sericata*, sin evaluar la existencia de una potencial resistencia al compuesto, porque sólo se expuso a los especímenes de la primera generación al químico. Para evaluar el desarrollo de resistencia tendría que haber expuesto a alguna de las generaciones posteriores al compuesto, y evaluar sus respuestas, pero ese no era el foco del estudio. De todas formas, se obtuvo resultados significativos y relevantes, para un insecto no tan estudiado que tiene la particularidad de ser a la vez detritívoro en su estado larvario, y polinizador en su adultez (Herrmann et al., 2018), lo que incrementa las oportunidades de verse expuesto a pesticidas en dosis subletales.

7.3 Respuestas ante pesticidas por exposición a dosis subletales.

El uso extendido de pesticidas en contextos urbanos y agrícolas da espacio para que otros insectos que no eran el blanco original de la aplicación de pesticida se vean expuestos a estos, en diversas concentraciones, lo que tiene toda clase de consecuencias. Este fenómeno se ha estudiado sobre todo en polinizadores, que sufren daño colateral por el uso de pesticidas en los contextos agrícolas, lo que ha tenido como consecuencia una reducción en el número de insectos, como las abejas (Hu et al., 2018). Las moscas cadavéricas son otro grupo que potencialmente podría verse afectado por la exposición no intencional a pesticidas. La exposición accidental puede ser a altas o bajas concentraciones de los compuestos, todo depende del tiempo transcurrido desde la aplicación y las circunstancias ambientales.

Parkinson *et al.* (2019) evaluaron los efectos de Imidacloprid y Sulfoxaflor en *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera: Oedipodinae), utilizando dosis subletales, para ver las consecuencias del contacto con estos pesticidas. Los investigadores observaron que el Imidacloprid tenía efectos en las respuestas motoras de las langostas, reduciendo la respuesta de salto para escape, y la respuesta de evasión de colisiones, cosa que no observaron con el Sulfoxaflor. Un detalle importante a tomar en cuenta es que ambos pesticidas tuvieron curvas de mortalidad similares, por lo que es destacable que sólo uno de ellos genere estos efectos subletales. Si bien no se consideró análisis de conductas, se observaron los números de larvas, lo que permitió aproximarse a los resultados de las conductas reproductivas en función de la cantidad de descendencia. Y lo que se observó fue una reducción de números de especímenes en los organismos expuestos en contraste con los controles, lo que nos habla de un efecto del Imidacloprid en dosis subletales, en insectos de otra orden. De todas formas, en vista de los resultados de este estudio, se sugiere evaluar cambios de conducta en futuros estudios.

En un estudio con *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae), Cook *et al.* (2015) determinaron que la exposición a dosis subletales de Imidacloprid tenía efectos en la asignación de sexo de la descendencia en contextos de presencia co-fundatrices. No obstante, en otro estudio con el mismo modelo (Cook *et al.*, 2016) se observó que las hembras fueron capaces de ajustar el tamaño de camada en hospederos que ya estaban ocupados con huevos de otras hembras, a pesar de haber sido expuestas al Imidacloprid. Estos resultados son interesantes en tanto reflejan que dos procesos conductuales que se espera estén estrechamente relacionados, pues están vinculados al mismo comportamiento (poner huevos), se observan diferencias en las respuestas al pesticida entre uno y otro. Este estudio resulta relevante, porque se observan cambios en las conductas reproductivas, lo que podría explicar las diferencias que se observaron a nivel de larvas vivas entre control y expuesto, lo que, si bien no fue el foco de estudio, es una posibilidad a considerar.

Los quironómidos también han sido estudiados para evaluar su relación con dosis subletales de neonicotinoides en el ambiente. Maloney *et al.* (2018) evaluaron los efectos de la exposición a Imidacloprid, Clothianidin y Thiamethoxam en insectos de agua fresca, con foco particular en los quironómidos. Sus resultados mostraron una reducción en la abundancia de las poblaciones frente a todos los pesticidas estudiados. Los estudios de organismos con fases acuáticas son altamente relevantes en términos ecológicos, porque nos ayudan a identificar rutas de distribución de los pesticidas que llegan a lugares no contemplados originalmente, como cursos de agua, siendo una amenaza para los organismos que ahí habitan. Observamos aquí una similitud con este estudio, pues en ambos casos se expuso a los organismos en su estado juvenil y se observó una disminución en las poblaciones tras esta exposición. El estudio de este equipo no evaluó el componente transgeneracional, pero sería interesante ver si se obtienen resultados similares a los nuestros.

Los organismos en los que más se han estudiado los efectos subletales de los neonicotinoides son las abejas de miel, *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Apidae). La exposición a dosis sub letales de Imidacloprid en abejas mieleras africanizadas dio como resultado modificaciones en los tubos de Malpighi que juegan un rol clave en la desintoxicación (de Almeida Rossi et al., 2013). Hatjina *et al.* (2013) estudiaron el efecto de Imidacloprid en el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas de las abejas y su ritmo respiratorio, determinando que el pesticida tuvo efectos en estos aspectos al ser aplicados en concentraciones equivalentes al campo abierto, generando una disminución de tamaño de las glándulas y respiración irregular. Al evaluar el efecto del Imidacloprid en el sistema nervioso de las abejas, en particular los micro-glomerulos de los cálices de los cuerpos fungiformes, Peng & Yang (2016) observaron una disminución en la densidad de estos tras la exposición al pesticida. Chensheng *et al.* (2012) estudiaron experimentalmente el problema del colapso de colonias, e identificaron que el consumo de jarabe de maíz alta fructosa contaminado con Imidacloprid, en concentraciones que se han observado al testear el producto, resultaba en la muerte de la mayoría de las colonias tratadas, es importante destacar que estas muertes tardaron en ocurrir, no fueron instantáneas ante la primera exposición a Imidacloprid. Paleolog *et al.* (2020) evaluaron el efecto de la exposición a Imidacloprid en abejas por medio de alimento contaminado con el compuesto, e identificaron cambios a nivel de metabólico y epigenético, los que fueron dependientes de casta y edad. El objeto de estudio *L. sericata* es polinizador durante su fase adulta (Howlett, 2012; Saeed *et al.*, 2016; Herrmann *et al.*, 2019), por lo que corre un riesgo similar al de las abejas de encontrarse con pesticidas en distintas dosis, lo que hace fundamental seguir estudiando sus respuestas a dosis subletales de pesticidas.

Como se exploró en esta sección la exposición a dosis subletales pueden tener efectos a largo plazo tanto o más relevantes que las dosis letales, pues se ven afectados distintos niveles de la

biología de los organismos y también de las poblaciones. Por esto es importante evaluar los efectos de las dosis subletales de los compuestos en la mayor cantidad de organismos que podamos, a fin de evitar crear más catástrofes ecológicas de las que ya tenemos.

7.4 Costo ambiental del uso de pesticidas

Los pesticidas son toxinas utilizados para lidiar con distintos tipos de antagonistas en el contexto agrícola y doméstico, estos antagonistas pueden ser plantas, hongos, artrópodos u otros animales, como ratones (Ware, 1980). Al ser en esencia venenos y en general buscar tener un amplio espectro de acción, es inevitable que afecten a organismos que no son su objetivo (Ware, 1980). El uso de pesticidas es una práctica extendida en los contextos agrícolas que, si bien está regulada en muchos países (Boyd, 2018), su uso se mantiene. Se han observado efectos especialmente nocivos en insectos voladores, entre los que se encuentran los polinizadores (Eggleton, 2020). Desde siglo pasado la comunidad científica ha estado poniendo la alarma de las consecuencias involuntarias del uso de pesticidas (Ware, 1980), lo que ha llevado a la prohibición de utilizar algunos compuestos (Donley, 2019), pero la industria de los pesticidas continúa creando nuevas fórmulas, cuyos costos ecológicos es necesario evaluar (Boyd, 2018).

De las consecuencias no deseadas que tienen los pesticidas, están los efectos negativos en depredadores, parasitoides y polinizadores. La pérdida de los primeros dos le dan una ventaja a las plagas al reducir los controles naturales que mantiene sus poblaciones bajo control (Ware, 1980). Mientras tanto la pérdida de polinizadores afecta a las plantas al reducir la fertilización, lo que tiene como resultado efectos negativos en la reproducción de las plantas y una reducción de la producción (Klein *et al.*, 2014).

Estudiando un campo de girasoles con 23 años de registros para comparar los cambios en los polinizadores ante la aplicación de pesticidas, Chaudhary & Poonia (2018) observaron un descenso tanto en el número como en la diversidad de polinizadores. Además, paralelamente vieron un incremento poblacional en cuatro insectos considerados plagas, quienes parecieron verse beneficiados con la aplicación de los pesticidas. Este ejemplo en particular es muy relevante, pues nos muestra las consecuencias inesperadas que el uso de pesticidas puede tener en el contexto agrícola.

Los pesticidas, como los neonicotinoides, por ejemplo, pueden acumularse en el suelo o contaminar cursos de agua, poniendo en peligro a un rango más amplio de organismos que solo los habitantes del espacio en que fueron aplicados y en el momento en que fue la aplicación (Pisa *et al.*, 2015). Esto tiene costos ecológicos que son difíciles de dimensionar y que pueden extenderse entre generaciones, con efectos que van desde los individuos a la población como un todo (Saaristo *et al.*, 2018)

Mientras la diversidad y riqueza de insectos se va reduciendo, nuestras herramientas para evaluar ese cambio son limitadas, porque tenemos pocos y acotados registros de entomofauna silvestre en tiempos pasados. Más allá de algunas especies más carismáticas como las mariposas en Europa, los registros históricos de la diversidad de especies que existen son limitados, tanto en diversidad como en abundancia local (Eggleton, 2020; Eisenhauer *et al.*, 2019). De hecho, aún nos falta por describir mucho del mundo de los invertebrados, pero a la velocidad que están ocurriendo los cambios y los hábitats están siendo destruidos, es probable que nunca sepamos la verdadera magnitud de la pérdida que estamos experimentando (Cardoso *et al.*, 2011).

Es por esto que es necesario hacer estudios con foco en la preservación de animales modelo no carismáticos, que están siendo pasados por alto por el común de la gente y por la misma comunidad científica, en donde el impacto mediático y la necesidad de conseguir financiamiento

hacen que se privilegie a animales como las mariposas por sobre otros con igual relevancia, pero menos valoración, como las moscas cadavéricas que entregan distintos servicios ecosistémicos a lo largo de su ciclo vital. Estas moscas han sido estudiadas en calidad de indicadores forense, pero se da por sentado que al ser cosmopolitas no están en peligro de extinguirse, un supuesto que es coherente, pero que debiese ser puesto a prueba. Se observaron efectos negativos en exposición a dosis subletales de pesticida, los que se pueden extrapolar a situaciones de exposición en ambientes que estas moscas frecuenten en su fase adulta o larvaria. De hecho, por la forma en que los pesticidas pueden acumularse en el suelo, incluso queda espacio para preguntarnos sobre su exposición durante el periodo de pupa que normalmente es en la tierra.

VIII. CONCLUSIONES.

Los efectos no deseados del uso de pesticidas, como el daño a los polinizadores o depredadores de insectos plaga, son esencialmente inevitables y tiene que ser considerados a cabalidad cuando se tome la decisión de utilizar uno de estos compuestos. La agricultura intensiva moderna tiene una marcada dependencia a los pesticidas, por lo que necesitamos identificar el tipo y grado de daño que cada compuesto pueda causar, para utilizar las opciones menos nocivas o definitivamente optar por alternativas de producción más amigables con el medio ambiente como la agroecología (Henriquez-Piskulich *et al.*, 2021). Tradicionalmente se evaluaban las dosis letales para los insectos objetivo, y en ocasiones en insectos no-blanco para definir las concentraciones a usar. Pero en las últimas décadas ha quedado claro que esa aproximación era insuficiente al no considerar efectos subletales, que pueden ser críticos para poblaciones completas de insectos y otros organismos beneficiosos. También, en ocasiones, las dosis subletales pueden tener efectos positivos en los organismos expuestos y dar espacio a respuestas adaptativas favorables, como un incremento de número de individuos o de tamaño, o generar resistencia al pesticida.

En este trabajo se evaluó los efectos de la exposición a dosis subletales de Imidacloprid, un pesticida extremadamente popular, pero que está cayendo en desuso debido a sus efectos en especies polinizadoras, las que se ven afectadas incluso en dosis subletales, con consecuencias que ponen en riesgo su sobrevivencia. El modelo de estudio fue *L. sericata*, un díptero cadavérico, que es de los primeros en llegar a los restos en descomposición y además es polinizador.

Los resultados arrojaron que en dosis subletales la exposición a Imidacloprid tuvo efectos negativos en el número tanto de larvas vivas como de pupas en los individuos expuestos versus

los controles en donde no se observaron efectos de este tipo. Se identificaron diferencias entre generaciones destacándose el contraste entre la segunda y la cuarta que se observó tanto en pupas como en adultos. Esto confirma nuestra primera hipótesis de que la presencia de Imidacloprid en la dieta de desarrollo tiene efectos en la fenología de *L. sericata*, y al observarse a lo largo de distintas generaciones se confirma nuestra segunda hipótesis de que estos cambios son heredables. Si bien la muestra fue limitada, se pudo observar patrones relevantes, que deberían ser explorados con mayor profundidad en estudios futuros. También queda pendiente para futuros estudios el análisis epigenético para ver si hubo cambios a ese nivel biológico, lo que finalmente no pude evaluar por la coyuntura.

Por último, nos sumamos a la actual recomendación de reducir o incluso eliminar el uso de Imidacloprid, pues hasta en dosis subletales puede producir efectos nocivos en organismos no-blanco. Lo que ya ha sido descrito para abejas y abejorros a lo largo del mundo, y ahora sumamos una mosca cadavérica al creciente grupo de organismos que pueden verse afectados indirectamente por este pesticida.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Haleem, D. R., Genidy, N. A., Fahmy, A. R., Azm, A. E., Fatma, S. M., & Ismail, N. S. (2018). Comparative Modelling, Toxicological and Biochemical Studies of Imidacloprid and Thiamethoxam Insecticides on the House Fly, *Musca domestica* L.(Diptera: Muscidae). *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. A, Entomology*, 11(1), 33-42.
- Andersen, A. A., & Panning, B. (2003). Epigenetic gene regulation by noncoding RNAs. *Current opinion in cell biology*, 15(3), 281-289.
- Badenhorst, R., & Villet, M. H. (2018). The uses of *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) in forensic entomology. *Forensic Sciences Research*, 3(1), 2-15.
- Bagnall, N. H., Hines, B. M., Lucke, A. J., Gupta, P. K., Reid, R. C., Fairlie, D. P., & Kotze, A. C. (2017). Insecticidal activities of histone deacetylase inhibitors against a dipteran parasite of sheep, *Lucilia cuprina*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 7(1), 51-60.
- Bala, M., & Sharma, A. (2016). Review of some recent techniques of age determination of blow flies having forensic implications. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 6(3), 203-208.
- Bansode, S. A., More, V. R., & Zambare, S. P. (2016). Effect of different constant temperature on the life cycle of a fly of forensic importance *Lucilia cuprina*. *Entomology, Ornithology & Herpetology: Current research* 5(3), 2161-0983.
- Bansode, S. A., More, V. R., & Zambare, S. P. (2017). Effect of seasonal variations on the life cycle of *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830)(Diptera: Calliphoridae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3), 1518-1522.

- Basley, K., Davenport, B., Vogiatzis, K., & Goulson, D. (2018). Effects of chronic exposure to thiamethoxam on larvae of the hoverfly *Eristalis tenax* (Diptera, Syrphidae). *PeerJ Life and environment*, 6, e4258.
- Bauer, A., Bauer, A.M. & Tomberlin, J.K. (2020) Impact of diet moisture on the development of the forensically important blow fly *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International* 312, 110333.
- Bebane, P. S., Hunt, B. J., Pegoraro, M., Jones, A. C., Marshall, H., Rosato, E., & Mallon, E. B. (2019). The effects of the neonicotinoid imidacloprid on gene expression and DNA methylation in the buff-tailed bumblebee *Bombus terrestris*. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1905), 20190718.
- Benedetti, D., Lopes Alderete, B., de Souza, C. T., Ferraz Dias, J., Niekraszewicz, L., Cappetta, M., ... & Da Silva, J. (2018). DNA damage and epigenetic alteration in soybean farmers exposed to complex mixture of pesticides. *Mutagenesis*, 33(1), 87-95.
- Béranger, R., Billoir, E., Nuckols, J. R., Blain, J., Millet, M., Bayle, M. L., ... & Fervers, B. (2019). Agricultural and domestic pesticides in house dust from different agricultural areas in France. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(19), 19632-19645.
- Bergesen, H. O., Parmann, G., & Thommessen, Ø. B. (2018). FAO International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. In *Yearbook of International Cooperation on Environment and Development 1998–99* (pp. 96-97). Routledge.
- Bingsohn, L., Knorr, E., & Vilcinskas, A. (2016). The model beetle *Tribolium castaneum* can be used as an early warning system for transgenerational epigenetic side effects caused by pharmaceuticals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 185, 57-64.
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447(7143), 396.

- Bordoni, L., & Gabbianelli, R. (2020). Nutrigenomics of Food Pesticides. In *Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics* (pp. 513-518). Academic Press.
- Botías, C., David, A., Horwood, J., Abdul-Sada, A., Nicholls, E., Hill, E., & Goulson, D. (2015). Neonicotinoid residues in wildflowers, a potential route of chronic exposure for bees. *Environmental science & technology*, 49(21), 12731-12740.
- Boyd, I. L. (2018). An inside view on pesticide policy. *Nature ecology & evolution*, 2(6), 920-921.
- Brevik, K., Lindström, L., McKay, S. D., & Chen, Y. H. (2018). Transgenerational effects of insecticides—implications for rapid pest evolution in agroecosystems. *Current opinion in insect science*, 26, 34-40.
- Bushati, N., & Cohen, S. M. (2007). microRNA functions. *Annual Review Of Cell Developmental Biology*. *Biol.*, 23, 175-205.
- Burdge, G. C., & Lillycrop, K. A. (2010). Nutrition, epigenetics, and developmental plasticity: implications for understanding human disease. *Annual review of nutrition*, 30, 315-339.
- Burggren, W. (2016). Epigenetic inheritance and its role in evolutionary biology: re-evaluation and new perspectives. *Biology*, 5(2), 24.
- Burggren, W. (2017). Epigenetics in insects: mechanisms, phenotypes and ecological and evolutionary implications. In: Verlinden, H. (Ed) *Advances in Insect Physiology* (Vol. 53, pp. 1-30). Academic Press.
- Byrd, J. H. & Castner, J. L. (2009). Insects of Forensic Importance. In: Byrd, J. H., y Castner, J. L. (Eds.). *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. CRC press.

- Campbell, P. M., Yen, J. L., Masoumi, A., Russell, R. J., Batterham, P., McKenzie, J. A., & Oakeshott, J. G. (1998). Cross-resistance patterns among *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) resistant to organophosphorus insecticides. *Journal of economic entomology*, *91*(2), 367-375.
- Cardoso, P., Erwin, T. L., Borges, P. A., & New, T. R. (2011). The seven impediments in invertebrate conservation and how to overcome them. *Biological Conservation*, *144*(11), 2647-2655.
- Carvalho, L. M. L., Linhares, A. X., & Palhares, F. A. B. (2012). The effect of cocaine on the development rate of immatures and adults of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) and its importance to postmortem interval estimate. *Forensic science international*, *220*(1-3), 27-32.
- Carvalho, L. M. L. (2010). Chapter 9: Toxicology and Forensic Entomology. In: Amendt, J., Campobasso, C. P., Goff, M. L., & Grassberger, M. (Eds.). *Current concepts in forensic entomology* (Vol. 376). Springer Science+ Business Media BV
- Carvalho, L. M., Linhares, A. X., & Trigo, J. R. (2001). Determination of drug levels and the effect of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. *Forensic Science International*, *120*(1-2), 140-144.
- Chensheng, L. U., Warchol, K. M., & Callahan, R. A. (2012). In situ replication of honey bee colony collapse disorder. *Bulletin of insectology*, *65*(1), 99-106.
- Chopra, A. K., Sharma, M. K., & Chamoli, S. (2011). Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system—an overview. *Environmental monitoring and assessment*, *173*(1), 905-916.

- Clark, K., Evans, L., & Wall, R. (2006). Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. *Forensic Science International*, 156(2-3), 145-149.
- Couret, J., Dotson, E., & Benedict, M. Q. (2014). Temperature, larval diet, and density effects on development rate and survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *PLoS One*, 9(2), e87468.
- Collotta, M., Bertazzi, P. A., & Bollati, V. (2013). Epigenetics and pesticides. *Toxicology*, 307, 35-41.
- Cook, N., Green, J., Shuker, D. M., & Whitehorn, P. R. (2016). Exposure to the neonicotinoid imidacloprid disrupts sex allocation cue use during superparasitism in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. *Ecological Entomology*, 41(6), 693-697.
- Cook, N., Pannebakker, B. A., Tauber, E., & Shuker, D. M. (2015). DNA methylation and sex allocation in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. *The American Naturalist*, 186(4), 513-518.
- Cook, D. F., Deyl, R. A., Mickan, B. S., & Howse, E. T. (2020). Yield of southern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) using the fly *Calliphora albifrontalis* (Diptera: Calliphoridae) as a pollinator. *Austral Entomology*, 59(2), 345-352.
- Correia, T. R., Scott, F. B., Verocai, G. G., Souza, C. P., Fernandes, J. I., Melo, R. M., ... & Ribeiro, F. A. (2010). Larvicidal efficacy of nitenpyram on the treatment of myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) in dogs. *Veterinary parasitology*, 173(1-2), 169-172.
- Cridge, A., Harrop, T., Lovegrove, M., Remnant, E., & Dearden, P. (2017). Nutrition and Epigenetic Change in Insects: Evidence and Implications. In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 53, pp. 31-54). Academic Press.

- Crossthwaite, A. J., Bigot, A., Camblin, P., Goodchild, J., Lind, R. J., Slater, R., & Maienfisch, P. (2017). The invertebrate pharmacology of insecticides acting at nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of pesticide science*, D17-019.
- de Almeida Rossi, C., Roat, T. C., Tavares, D. A., Cintra-Socolowski, P., & Malaspina, O. (2013). Effects of sublethal doses of imidacloprid in malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Microscopy research and technique*, 76(5), 552-558.
- Donley, N. (2019). The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. *Environmental Health*, 18(1), 1-12.
- Drmanac, R., Sparks, A. B., Callow, M. J., Halpern, A. L., Burns, N. L., Kermani, B. G., ... & Dahl, F. (2009). Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. *Science*.
- Dunford, J. C., Hoel, D. F., Hertz, J. C., England, D. B., Dunford, K. R., Stoops, C. A., ... & Hogsette, J. A. (2013). Evaluation of Imidacloprid-treated traps as an Attract and kill system for filth flies during contingency settings. Navy Entomology Center of Excellence Jacksonville, NAS FL.
- Eisenhauer, N., Bonn, A., & Guerra, C. A. (2019). Recognizing the quiet extinction of invertebrates. *Nature communications*, 10(1), 1-3.
- Eggleton, P. (2020). The State of the World's Insects. *Annual Review of Environment and Resources*, 45, 61-82.
- Ekraekene, T., & Odo, P. E. (2017). Comparative developmental effects of tramadol hydrochloride and cypermethrin on *Chrysomya albiceps* (Weid.)(Diptera: Calliphoridae) reared on rabbit carrions. *Science World Journal*, 12(1), 28-32

- Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W., & Nauen, R. (2008). Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(11), 1099-1105.
- Elora, S. & Sarkar, M. (2018) Larval diet influences development, growth, and survival of mosquitoes in artificial rearing condition. *International Journal of Mosquito Research* 5, 07–11.
- Essarras, A., Pazzi, M., Dadour, I. R., & Magni, P. A. (2018). The effect of antifreeze (ethylene glycol) on the survival and the life cycle of two species of necrophagous blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Science & Justice*, 58(2), 85-89.
- Fathy, H. M., Attia, R. A., Yones, D. A., Eldeek, H. E., Tolba, M. E., & Shaheen, M. S. (2008). Effect of Codeine Phosphate on developmental Stages of Forensically Important Calliphoride Fly: *Chrysomya albiceps*. *Mansoura Journal of Forensic Medicine and Clinical Toxicology*, 16(1), 41-59.
- Faulk, C., & Dolinoy, D. C. (2011). Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. *Epigenetics*, 6(7), 791-797.
- Feil, R., & Fraga, M. F. (2012). Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature Reviews Genetics*, 13(2), 97.
- Figueroa-Roa, L., & Linhares, A. X. (2002). Sinantropia de los Calliphoridae (Diptera) de Valdivia, Chile. *Neotropical Entomology*, 31(2), 233-239.
- Florez, E., & Wolff, M. (2009). Descripción y clave de los estadios inmaduros de las principales especies de Calliphoridae (Diptera) de importancia forense en Colombia. *Neotropical entomology*, 38(3), 418-429.

- Franklin, T. B., & Mansuy, I. M. (2010). The prevalence of epigenetic mechanisms in the regulation of cognitive functions and behaviour. *Current opinion in neurobiology*, 20(4), 441-449.
- Franklin, T. B., Russig, H., Weiss, I. C., Gräff, J., Linder, N., Michalon, A., ... & Mansuy, I. M. (2010). Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biological psychiatry*, 68(5), 408-415.
- Frederickx, C., Dekeirsschieter, J., Verheggen, F. J., & Haubruge, E. (2012). Responses of *Lucilia sericata* Meigen (Diptera: Calliphoridae) to cadaveric volatile organic compounds. *Journal of Forensic Sciences*, 57(2), 386-390.
- Frías, D. (2008). *Principios de genética de poblaciones y evolución: Modelos de Especiación*. Comunicarte, Chile.
- Frías-Lasserre D. & Villagra CA (2017). The importance of ncRNAs as epigenetic mechanisms in phenotypic variation and organic evolution. *Frontiers in Microbiology*, 8: December.
- Frías-Lasserre, D., Villagra, C.A. & Guerrero-Bosagna C. (2018). Stress in the Educational System as a Potential Source of Epigenetic Influences on Children's Development and Behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, July.
- Gagliardi, B. S., Long, S. M., Pettigrove, V. J., & Hoffmann, A. A. (2015). The parthenogenetic cosmopolitan chironomid, *Paratanytarsus grimmii*, as a new standard test species for ecotoxicology: Culturing methodology and sensitivity to aqueous pollutants. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 95(3), 350-356.

- Geiger, F., Bengtsson, J., Berendse, F., Weisser, W. W., Emmerson, M., Morales, M. B., ... & Inchausti, P. (2010). Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic and Applied Ecology*, *11*(2), 97-105.
- Gennard, D. (2012). *Forensic entomology: an introduction*. John Wiley & Sons.
- George, K. A., Archer, M. S., Green, L. M., Conlan, X. A., & Toop, T. (2009). Effect of morphine on the growth rate of *Calliphora stygia* (Fabricius)(Diptera: Calliphoridae) and possible implications for forensic entomology. *Forensic science international*, *193*(1-3), 21-25.
- Georgieva, M., Bonchev, G., Zehirov, G., Vasileva, V. & Vassileva, V. (2021) Neonicotinoid insecticides exert diverse cytotoxic and genotoxic effects on cultivated sunflower. *Environmental Science and Pollution Research*. 60.
- Ghosh, K., Chatterjee, B., Jayaprasad, A. G., & Kanade, S. R. (2018). The persistent organochlorine pesticide endosulfan modulates multiple epigenetic regulators with oncogenic potential in MCF-7 cells. *Science of the Total Environment*, *624*, 1612-1622.
- Gião, J. Z., Reigada, C., Moretti, T. C., & Godoy, W. A. C. (2017). Effect of Psychoactive Drugs on Demographic Parameters of the Blow Fly *Chrysomya albiceps* (Wiedemann)(Diptera: Calliphoridae). *J Forensic Res*, *8*(400), 2.
- Glendinning, J. I., Ensslen, S. O. N. Y. A., Eisenberg, M. E., & Weiskopf, P. H. O. E. B. E. (1999). Diet-induced plasticity in the taste system of an insect: localization to a single transduction pathway in an identified taste cell. *Journal of Experimental Biology*, *202*(15), 2091-2102.
- Goff, M. L., Brown, W. A., & Omori, A. I. (1992). Preliminary observations of the effect of methamphetamine in decomposing tissues on the development rate of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on the estimations of postmortem intervals. *Journal of Forensic Science*, *37*(3), 867-872.

- Goff, M. L., & Lord, W. D. (2010). Insect as toxicological indicator and the impact of drugs and toxin on insect development. In: Byrd, J.H. & Castner, J.L. (Eds) *Forensic Entomology: The Utility of Using Arthropods in Legal Investigations*, 427-434.
- Gobbi, P., Martínez-Sánchez, A. & Rojo, S. (2013) The effects of larval diet on adult life-history traits of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *European Journal of Entomology* 110, 461–468.
- Grassberger, M., & Reiter, C. (2002). Effect of temperature on development of *Liopygia* (= *Sarcophaga*) *argyrostoma* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Sarcophagidae) and its forensic implications. *Journal of Forensic Science*, 47(6), 1332-1336.
- Greenberg, B. (1991). Flies as forensic indicators. *Journal of Medical Entomology*, 28(5), 565-577.
- Greenberg, B. (1988). *Chrysomya megacephala* (F.)(Diptera: Calliphoridae) collected in North America and notes on *Chrysomya* species present in the New World. *Journal of Medical Entomology*, 25(3), 199-200.
- Hallmann, C. A., Foppen, R. P., van Turnhout, C. A., de Kroon, H., & Jongejans, E. (2014). Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature*, 511(7509), 341-343.
- Hatjina, F., Papaefthimiou, C., Charistos, L., Dogaroglu, T., Bouga, M., Emmanouil, C., & Arnold, G. (2013). Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie*, 44(4), 467-480.
- Henriquez-Piskulich, P.A., Schapheer, C., Vereecken, N.J., Villagra, C., 2021. Agroecological Strategies to Safeguard Insect Pollinators in Biodiversity Hotspots : Chile as a Case Study. *Sustainability* 13, 6728.

- Herrmann, J. D., Beye, H., de la Broise, C., Hartlep, H., & Diekötter, T. (2019). Positive effects of the pollinators *Osmia cornuta* (Megachilidae) and *Lucilia sericata* (Calliphoridae) on strawberry quality. *Arthropod-Plant Interactions*, 13(1), 71-77.
- Heyn, H., & Esteller, M. (2012). DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nature Reviews Genetics*, 13(10), 679.
- Holloway, B. A. (1991). Morphological characters to identify adult *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) and *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830)(Diptera: Calliphoridae). *New Zealand Journal of Zoology*, 18(4), 413-420.
- Holt, W. V. (2017). Exploitation of Non-mammalian Model Organisms in Epigenetic Research. In Fazeli, A., Folt, W. (Eds) *Periconception in Physiology and Medicine* (pp. 155-173). Springer, Cham.
- Horenstein, M. B., & Peretti, A. V. (2011). Environmental conditions influence allometric patterns in the blow fly, *Chrysomya albiceps*. *Journal of Insect Science*, 11(1), 131.
- Howlett, B. G. (2012). Hybrid carrot seed crop pollination by the fly *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Applied Entomology*, 136(6), 421-430.
- Hu, Y. T., Tang, C. K., Wu, C. P., Wu, P. C., Yang, E. C., Tai, C. C., & Wu, Y. L. (2018). Histone deacetylase inhibitor treatment restores memory-related gene expression and learning ability in neonicotinoid-treated *Apis mellifera*. *Insect molecular biology*, 27(4), 512-521.
- Hunt, B. G., Glastad, K. M., Yi, S. V., & Goodisman, M. A. (2013). The function of intragenic DNA methylation: insights from insect epigenomes.
- Hwang, C. C., & Turner, B. D. (2009). Small-scaled geographical variation in life-history traits of the blowfly *Calliphora vicina* between rural and urban populations. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 132(3), 218-224.

- Introna, F., Campobasso, C. P., & Goff, M. L. (2001). Entomotoxicology. *Forensic Science International*, 120(1-2), 42-47.
- Ireland, S., & Turner, B. (2006). The effects of larval crowding and food type on the size and development of the blowfly, *Calliphora vomitoria*. *Forensic Science International*, 159(2-3), 175-181.
- Ishak, N., Ahmad, A. H., Noor, S. A. M., & Ahmad, A. (2019). Detection of heroin metabolites at different developmental stages of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) reared in heroin-treated meat: a preliminary analysis. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 9(1), 1-9.
- Ishak, N., Ahmad, A. H., Nor, S. A. M., & Ahmad, A. (2018). Developmental cycle and growth of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) fed on heroin: Implications for post-mortem interval (pmi) estimation in forensic investigations. *ESTEEM Academic Journal*, 14, 63-71.
- Jablonka, E., & Raz, G. (2009). Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *The Quarterly review of biology*, 84(2), 131-176.
- Jablonka, E., & Lamb, M. J. (2005). Evolution in four dimensions: genetic, epigenetic, behavioral, and symbolic variation in the history of life. Vol. 5.
- Jacobs, M. N., Marczylo, E. L., Guerrero-Bosagna, C., & Rüegg, J. (2017). Marked for life: epigenetic effects of endocrine disrupting chemicals. *Annual Review of Environment and Resources*, 42, 105-160.
- Jadiya, P., & Nazir, A. (2012). Environmental toxicants as extrinsic epigenetic factors for parkinsonism: studies employing transgenic *C. elegans* model. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 11(8), 976-983.

- Jaenisch, R. & Bird, A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics* 33 Suppl, 245–254.
- Jales, J. T., de Moura Barbosa, T., Dos Santos, L. C., Rachetti, V. D. P. S., & Gama, R. A. (2020). Carrion decomposition and assemblage of necrophagous dipterans associated with Terbufos (Organophosphate) intoxicated rat carcasses. *Acta tropica*, 212, 105652.
- Jeschke, P., & Nauen, R. (2008). Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(11), 1084-1098.
- Johnson, A. P., & Wallman, J. F. (2014). Effect of massing on larval growth rate. *Forensic science international*, 241, 141-149.
- Kahl, V. F. S., Dhillon, V., Fenech, M., de Souza, M. R., da Silva, F. N., Marroni, N. A. P., ... & Cappetta, M. (2018). Occupational exposure to pesticides in tobacco fields: the integrated evaluation of nutritional intake and susceptibility on genomic and epigenetic instability. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.
- Kavi, L. A., Kaufman, P. E., & Scott, J. G. (2014). Genetics and mechanisms of imidacloprid resistance in house flies. *Pesticide biochemistry and physiology*, 109, 64-69.
- Kaspi, R., Mossinson, S., Drezner, T., Kamensky, B., & Yuval, B. (2002). Effects of larval diet on development rates and reproductive maturation of male and female Mediterranean fruit flies. *Physiological Entomology*, 27(1), 29-38.
- Keh, B. (1985). Scope and applications of forensic entomology. *Annual review of entomology*, 30(1), 137-154.
- Khater, K. (2021). Effect of two volatile oils extracted from *Syzygium aromaticum*, *Mentha longifolia*, and imidacloprid on *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *Parasitologists United Journal*, 14(1), 46-57.
- Khosla, S., Mendiratta, G., & Brahmachari, V. (2006). Genomic imprinting in the mealybugs. *Cytogenetic and Genome Research*, 113(1-4), 41-52.

- Kiliñç, Ö., Arkan, H., Akbaş, F., Polat, E., Tuncdemir, M., Onaran, I., & Özaydin, A. (2020). The Effects of *Lucilia sericata* Larval Secretions on The Expressions of MicroRNAs that are Suggested to be Related with Wound Healing in Experimental Diabetic Rat Wound Model. *Bezmialem Science*, 8(1), 8.
- Klein, A. M., Hendrix, S. D., Clough, Y., Scofield, A., & Kremen, C. (2015). Interacting effects of pollination, water and nutrients on fruit tree performance. *Plant biology*, 17(1), 201-208.
- Kotze, A. C., Hines, B. M., Bagnall, N. H., Anstead, C. A., Gupta, P., Reid, R. C., ... & Fairlie, D. P. (2015). Histone deacetylase enzymes as drug targets for the control of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(3), 201-208.
- Kotze, A. C., & Sales, N. (1994). Cross resistance spectra and effects of synergists in insecticide-resistant strains of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *Bulletin of Entomological Research*, 84(3), 355–360.
- Kozeretska, I. A., Serga, S. V., Koliada, A. K., & Vaiserman, A. M. (2017). Epigenetic Regulation of Longevity in Insects. In Verlinden, H. (Ed) *Advances in Insect Physiology* (Vol. 53, pp. 87-114). Academic Press.
- Košťál, V. (2006). Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of insect physiology*, 52(2), 113-127.
- Kristensen, M., Spencer, A. G., & Jespersen, J. B. (2001). The status and development of insecticide resistance in Danish populations of the housefly *Musca domestica* L. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 57(1), 82-89.
- Lacal, I., & Ventura, R. (2018). Epigenetic inheritance: concepts, mechanisms and perspectives. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 292.

- Laird, P. W. (2003). Early detection: the power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Reviews Cancer*, 3(4), 253.
- Laubach, Z. M., Perng, W., Dolinoy, D. C., Faulk, C. D., Holekamp, K. E., & Getty, T. (2018). Epigenetics and the maintenance of developmental plasticity: extending the signalling theory framework. *Biological Reviews*.
- Li, J., Wang, Q., Zhang, L., & Gao, X. (2012). Characterization of imidacloprid resistance in the housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pesticide biochemistry and physiology*, 102(2), 109-114.
- Liceboss Corporation. (2020). Sheep lice treatments - chemical group characteristics. Retrieved 1 March 2020, from <http://www.liceboss.com.au/sheep-goats/treating/sheep-lice-treatmentschemical-group-characteristics.php>
- Liu, D., & Greenberg, B. (1989). Immature stages of some flies of forensic importance. *Annals of the Entomological Society of America*, 82(1), 80-93.
- Liu, F., Guo, D., Yuan, Z., Chen, C., & Xiao, H. (2017). Genome-wide identification of long non-coding RNA genes and their association with insecticide resistance and metamorphosis in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Scientific reports*, 7(1), 1-11
- Liu, X., Shi, Y., Wang, H., & Zhang, R. (2009). Determination of Malathion levels and its effect on the development of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) in South China. *Forensic science international*, 192(1-3), 14-18.
- Lo, N., Simpson, S. J., & Sword, G. A. (2017). Epigenetics and developmental plasticity in orthopteroid insects. *Current opinion in insect science*.

- Lu, C., Chang, C. H., Palmer, C., Zhao, M., & Zhang, Q. (2018). Neonicotinoid residues in fruits and vegetables: an integrated dietary exposure assessment approach. *Environmental science & technology*, 52(5), 3175-3184.
- Ma, Z., Li, J., Zhang, Y., Shan, C., & Gao, X. (2017). Inheritance mode and mechanisms of resistance to imidacloprid in the house fly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) from China. *PLoS One*, 12(12), e0189343.
- Mađra, A., Konwerski, S., & Matuszewski, S. (2014). Necrophilous Staphylininae (Coleoptera: Staphylinidae) as indicators of season of death and corpse relocation. *Forensic science international*, 242, 32-37.
- Main, A. R., Webb, E. B., Goyne, K. W., & Mengel, D. (2020). Reduced species richness of native bees in field margins associated with neonicotinoid concentrations in non-target soils. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 287, 106693.
- Maloney, E. M., Liber, K., Headley, J. V., Peru, K. M., & Morrissey, C. A. (2018). Neonicotinoid insecticide mixtures: Evaluation of laboratory-based toxicity predictions under semi-controlled field conditions. *Environmental pollution*, 243, 1727-1739.
- Mandi, M., Khatun, S., Rajak, P., Mazumdar, A., & Roy, S. (2020). Potential risk of organophosphate exposure in male reproductive system of a non-target insect model *Drosophila melanogaster*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 74, 103308.
- Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., & Skinner, M. K. (2012). Pesticide and insect repellent mixture (permethrin and DEET) induces epigenetic transgenerational inheritance of disease and sperm epimutations. *Reproductive toxicology*, 34(4), 708-719.
- Maturana, H. R., & Varela, F. J. (1973). *De Máquinas y Seres Vivos: Una teoría sobre la organización biológica*. Editorial Universitaria.

- McKenzie, J. A. (1990). Selection at the dieldrin resistance locus in overwintering populations of *Lucilia cuprina* (Wiedemann). *Australian Journal of Zoology*, 38(5), 469–477
- Mégnin, P. (1894). *La faune des cadavres: Application de l'entomologie a la médecine légale* (Vol. 101). Masson & Gauthier-Villars.
- Meftaul, I. M., Venkateswarlu, K., Dharmarajan, R., Annamalai, P., & Megharaj, M. (2020). Pesticides in the urban environment: A potential threat that knocks at the door. *Science of The Total Environment*, 711, 134612.
- Meyers, R. A. (Ed.). (2012). *Epigenetic regulation and epigenomics* (Vol. 2). John Wiley & Sons.
- Mukherjee, K., Twyman, R. M., & Vilcinskis, A. (2015). Insects as models to study the epigenetic basis of disease. *Progress in biophysics and molecular biology*, 118(1-2), 69-78.
- Nash, W. J., & Chapman, T. (2014). Effect of dietary components on larval life history characteristics in the Medfly (*Ceratitidis capitata*: Diptera, Tephritidae). *PLoS One*, 9(1), e86029.
- Nurita, A. T., & Hassan, A. A. (2010). Comparative performance of two commercial neonicotinoid baits against filth flies under field conditions. *Tropical Biomedicine*, 27, 559-565.
- O'Brien, C., & Turner, B. (2004). Impact of paracetamol on *Calliphora vicina* larval development. *International Journal of Legal Medicine*, 118(4), 188-189.
- Oliveira, H. G., Gomes, G., Morlin Jr, J. J., Von Zuben, C. J., & Linhares, A. X. (2009). The effect of Buscopan® on the development of the blow fly *Chrysomya megacephala* (F.)(Diptera: Calliphoridae). *Journal of forensic sciences*, 54(1), 202-206.

- Oppold, A., Kress, A., Bussche, J. V., Diogo, J. B., Kuch, U., Oehlmann, J., ... & Müller, R. (2015). Epigenetic alterations and decreasing insecticide sensitivity of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 122, 45-53.
- Orr, S. E., Watanabe, T. T. N., & Buchwalter, D. B. (2021). Physiological plasticity and acclimatory responses to salinity stress are ion-specific in the mayfly, *Neocloeon triangulifer*. *Environmental Pollution*, 286, 117221.
- Ortloff, A., Peña, P., & Riquelme, M. (2012). Preliminary study of the succession pattern of necrobiont insects, colonising species and larvae on pig carcasses in Temuco (Chile) for forensic applications. *Forensic Science International*, 222(1-3), e36-e41.
- Oyama, S. (2000). *The ontogeny of information: Developmental systems and evolution*. Duke university press.
- Parkinson, R. H., & Gray, J. R. (2019). Neural conduction, visual motion detection, and insect flight behaviour are disrupted by low doses of imidacloprid and its metabolites. *Neurotoxicology*, 72, 107-113.
- Peng, Y. C., & Yang, E. C. (2016). Sublethal dosage of imidacloprid reduces the microglomerular density of honey bee mushroom bodies. *Scientific Reports*, 6(1), 1-13.
- Perlowagora-Szumlewicz, A., Cruz, H., & Araújo, J. A. (1973). Spontaneous morphogenetic juvenilization observed in laboratory populations of vector species of Chagas disease (Triatominae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 7(4), 243-260.
- Picard, C. J., & Wells, J. D. (2010). The population genetic structure of North American *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae), and the utility of genetic assignment methods for reconstruction of postmortem corpse relocation. *Forensic Science International*, 195(1-3), 63-67.

- Pincebourde, S., & Casas, J. (2015). Warming tolerance across insect ontogeny: influence of joint shifts in microclimates and thermal limits. *Ecology*, 96(4), 986-997.
- Quesada-Lobo, L., Troyo, A., & Calderón-Arguedas, Ó. (2012). Primer reporte de miasis hospitalaria por *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) en costa rica. *Biomedica*, 32(4), 485–489.
- Rabelo, M.M., Matos, J.M.L., Orozco-Restrepo, S.M., Paula-Moraes, S. V., Pereira, E.J.G., 2020. Like Parents, like Offspring? Susceptibility to Bt Toxins, Development on Dual-Gene Bt Cotton, and Parental Effect of Cry1Ac on a Nontarget Lepidopteran Pest. *Journal of Economic Entomology*. 113, 1234–1242.
- Rezende, F., Alonso, M. A., Souza, C. M., Thyssen, P. J., & Linhares, A. X. (2014). Developmental rates of immatures of three *Chrysomya* species (Diptera: Calliphoridae) under the effect of methylphenidate hydrochloride, phenobarbital, and methylphenidate hydrochloride associated with phenobarbital. *Parasitology research*, 113(5), 1897-1907.
- Reynolds, J. A. (2017). Epigenetic Influences on Diapause. In Verlinden, H.(Ed.) *Advances in Insect Physiology* (Vol. 53, pp. 115-144). Academic Press.
- Reynolds, J. A., Clark, J., Diakoff, S. J., & Denlinger, D. L. (2013). Transcriptional evidence for small RNA regulation of pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 43(10), 982-989.
- Reynolds, J. A., Bautista-Jimenez, R., & Denlinger, D. L. (2016). Changes in histone acetylation as potential mediators of pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 76, 29-37.
- Rueda, L. C., Ortega, L. G., Segura, N. A., Acero, V. M., & Bello, F. (2010). *Lucilia sericata* strain from Colombia: Experimental colonization, life tables and evaluation of two artificial diets

of the blowfly *Lucilia sericata* (Meigen)(Diptera: Calliphoridae), Bogotá, Colombia Strain. *Biological research*, 43(2), 197-203.

– Rugg, D., Sales, N., Kotze, A. C., & Levot, G. W. (1995). Susceptibility to Ivermectin of Pyrethroid-Resistant *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *Australian Journal of Entomology*, 34(1), 69–70.

-Saaristo, M., Brodin, T., Balshine, S., Bertram, M. G., Brooks, B. W., Ehlman, S. M., ... & Arnold, K. E. (2018). Direct and indirect effects of chemical contaminants on the behaviour, ecology and evolution of wildlife. *Proceedings of the Royal Society B*, 285(1885), 20181297.

- Saeed, S., Naqqash, M. N., Jaleel, W., Saeed, Q., & Ghouri, F. (2016). The effect of blow flies (Diptera: Calliphoridae) on the size and weight of mangos (*Mangifera indica* L.). *PeerJ*, 4, e2076.

– Salimi, M., Rassi, Y., Ahmadi, B., Chatrabgoun, O., Jamshidi, R., & Rafizadeh, S. (2018). Effects of morphine on the biomass and development rate of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae), a forensically important species. *Tropical Biomedicine*, 35(2), 560-570.

– Sánchez, L. (2010). *Sciara* as an experimental model for studies on the evolutionary relationships between the zygotic, maternal and environmental primary signals for sexual development. *Journal of Genetics*, 89(3), 325-331.

- Scott, J. G. (2017). Evolution of resistance to pyrethroid insecticides in *Musca domestica*. *Pest management science*, 73(4), 716-722.

– Shaheen, M. S., & Fathy, H. M. (2008). Surface ultrastructural changes on third instar larvae of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae) induced by codeine phosphate. *Manosura Journal of Forensic Medicine and Clinical Toxicology*. Vol CVI, No.1

- Shanahan, G. J., & Roxburgh, N. A. (1974). Effect of diazinon selection upon two organophosphorus-resistant field strains of *Lutitia cuprina* (Wied.) (Diptera, Calliphoridae). *Bulletin of Entomological Research*, 63(4), 567–572.
- Skinner, M. K., & Guerrero-Bosagna, C. (2009). Environmental signals and transgenerational epigenetics. *Epigenomics*, 1(1), 111-117.
- Smith, J. L., Palermo, N. A., Theobald, J. C., & Wells, J. D. (2015). Body size, rather than male eye allometry, explains *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) activity in low light. *Journal of Insect Science*, 15(1), 133.
- Song, C., Kanthasamy, A., Anantharam, V., Sun, F., & Kanthasamy, A. G. (2010). Environmental neurotoxic pesticide increases histone acetylation to promote apoptosis in dopaminergic neuronal cells: relevance to epigenetic mechanisms of neurodegeneration. *Molecular pharmacology*, 77(4), 621-632.
- Stanley, J. & Preetha G., (2016). Introduction. In Stanley, J & Preetha, G. (Ed) *Pesticide toxicity to non-target organisms* (pp. XXI-XXVIII). Berlin, Germany: Springer.
- Stark, J., Bonacum, J., Remsen, J., & DeSalle, R. (1999). The evolution and development of dipteran wing veins: a systematic approach. *Annual review of entomology*, 44(1), 97-129.
- Subrero, E., Sforzini, S., Viarengo, A., & Cucco, M. (2019). Exposure to anti-mosquito insecticides utilized in rice fields affects survival of two non-target species, *Ischnura elegans* and *Daphnia magna*. *Paddy and water environment*, 17(1), 1-11.
- Sud, M. (2020). Managing the biodiversity impacts of fertilizer and pesticide use: Overview and insights from trends and policies across selected OECD countries. *OCDE Environment Working Papers*.

- Sutton, R., Xie, Y., Moran, K. D., & Teerlink, J. (2019). Occurrence and Sources of Pesticides to Urban Wastewater and the Environment. In *Pesticides in Surface Water: Monitoring, Modeling, Risk Assessment, and Management* (pp. 63-88). American Chemical Society.
- Syromyatnikov, M. Y., Isuwa, M. M., Savinkova, O. V., Der Syromyatnikov, M. Y., Isuwa, M. M., Savinkova, O. V., Derevshchikova, M. I., & Popov, V. N. (2020). The effect of pesticides on the microbiome of animals. *Agriculture*, 10(3), 79.
- Tachibana, S.I., Numata, H., 2004. Parental and direct effects of photoperiod and temperature on the induction of larval diapause in the blow fly *Lucilia sericata*. *Physiological Entomology*. 29, 39–44.
- Tabor, K. L., Fell, R. D., Brewster, C. C., Pelzer, K., & Behonick, G. S. (2005). Effects of antemortem ingestion of ethanol on insect successional patterns and development of *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, 42(3), 481-489.
- Tarone, A. M., & Foran, D. R. (2006). Components of developmental plasticity in a Michigan population of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, 43(5), 1023-1033.
- Tarone, A. M., Picard, C. J., Spiegelman, C., & Foran, D. R. (2011). Population and temperature effects on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) body size and minimum development time. *Journal of Medical Entomology*, 48(5), 1062-1068.
- Traylor, M. J., Baek, J. M., Richards, K. E., Fusetto, R., Huang, W., Josh, P., ... & Gillam, E. M. (2017). Recombinant expression and characterization of *Lucilia cuprina* CYP6G3: Activity and binding properties toward multiple pesticides. *Insect biochemistry and molecular biology*, 90, 14-22

- Uragayala, S., Verma, V., Natarajan, E., Velamuri, P. S., & Kamaraju, R. (2015). Adulticidal & larvicidal efficacy of three neonicotinoids against insecticide susceptible & resistant mosquito strains. *The Indian journal of medical research*, 142(Suppl 1), S64.
- Vandegehuchte, M. B., & Janssen, C. R. (2014). Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 764, 36-45.
- Van Maele-Fabry, G., Gamet-Payrastre, L., & Lison, D. (2019). Household exposure to pesticides and risk of leukemia in children and adolescents: Updated systematic review and meta-analysis. *International journal of hygiene and environmental health*, 222(1), 49-67.
- Vargas, A. O., Botelho, J. F., & Mpodozis, J. (2020). The evolutionary consequences of epigenesis and neutral change: A conceptual approach at the organismal level. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 1-10
- Vidaki, A., & Kayser, M. (2017). From forensic epigenetics to forensic epigenomics: broadening DNA investigative intelligence. *Genome biology*, 18(1), 238.
- Vidaki, A., Daniel, B. & Syndercombe, D. (2013). Forensic DNA methylation profiling—potential opportunities and challenges. *Forensic Science International: Genetics*, 7(5), 499-507.
- Villagra, C., & Frías-Lasserre, D. (2020). Epigenetic molecular mechanisms in insects. *Neotropical Entomology*, 49, 615-642.
- Villet, M.H., Richards, C. S. & Midgley, J. M. (2010) Chapter 7: Contemporary Precision, Bias and Accuracy of Minimum Post-Mortem Intervals Estimated Using Development of Carrion-Feeding Insects. In Amendt, J., Campobasso, C. P., Goff, M. L., & Grassberger, M. (Eds.). (2010). *Current concepts in forensic entomology* (Vol. 376). Springer Science+ Business Media BV.
- Ware, G. W. (1980). Effects of pesticides on nontarget organisms. *Residue reviews*, 173-201.

- Weidner, L. M., Nigoghosian, G., Hanau, C. G., & Jennings, D. E. (2020). Analysis of Alternative Food Sources for Rearing Entomological Evidence. *Journal of Medical Entomology*, 57(5), 1407-1410.
- Werner, E. E., & Gilliam, J. F. (1984). The ontogenetic niche and species interactions in size-structured populations. *Annual review of ecology and systematics*, 15(1), 393-425.
- West-Eberhard, M. J. (2003). *Developmental plasticity and evolution*. Oxford University Press. New York.
- Williams, K. A., Richards, C. S., & Villet, M. H. (2014). Predicting the geographic distribution of *Lucilia sericata* and *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) in South Africa. *African Invertebrates*, 55(1), 157-170.

- Williams, J. B., Roberts, S. P., & Elekonich, M. M. (2009). Heat shock proteins and their role in generating, maintaining and even preventing alternative insect phenotypes. *Phenotypic plasticity of insects: mechanisms and consequences*, 741-766.
- Whitman, D. W., & Ananthakrishnan, T. N. (2009). Phenotypic plasticity of insects. *Enfield NH Sci Publ*.
- Whitman, D. (2009). *Phenotypic plasticity of insects: mechanisms and consequences*. CRC Press.
- Whitman, D. W., & Agrawal, A. A. (2009). What is phenotypic plasticity and why is it important? In Withman, D.W: & Ananthakrishnan, T.N. (Eds)*Phenotypic Plasticity of Insects* pp. 1–63.
- Williams, J. B., Roberts, S. P., & Elekonich, M. M. (2009). Heat shock proteins and their role in generating, maintaining and even preventing alternative insect phenotypes. In *Phenotypic Plasticity of Insects: Mechanisms and Consequences* (pp. 741-766). Science Publishers, Enfield.

- Williams, D. G., Hatch, D. J., & Howard, R. F. (2001). Codeine phosphate in pediatric medicine. *British Journal of Anaesthesia*, 86(3), 413-421.
- Whitworth, T. (2010). Keys to the genera and species of blow flies (Diptera: Calliphoridae) of the West Indies and description of a new species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy. *Zootaxa*, 2663(1), 1-35.
- Whitworth, T. (2014). A revision of the neotropical species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae). *Zootaxa*, 3810(1), 1-76.
- Yadav, S. S., Singh, M. K., & Yadav, R. S. (2016). Organophosphates induced Alzheimer's disease: an epigenetic aspect. *Journal of Clinical Epigenetics*, 2(1), 2472-1158.
- Young HK, Denecke SM, Robin C, Fournier-Level A (2019) Sublethal larval exposure to imidacloprid impacts adult behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* 33:151–164.
- Yusmalinar, S., Anggraeni, T., Kustiati, K., Wibowo, I., Eka Putra, R., & Ahmad, I. (2017). Reproductive ability enhancement of housefly (*Musca domestica* Linn)(Diptera: Muscidae) through hormesis by application of sublethal doses of imidacloprid and permethrin. *Journal of Entomology*, 14, 199-207.
- Zhang, T. Y., & Meaney, M. J. (2010). Epigenetics and the environmental regulation of the genome and its function. *Annual review of psychology*, 61, 439-466.
- Zhao, D., Ishikawa, T., Quan, L., Michiue, T., Zhu, B. L., & Maeda, H. (2009). Postmortem quantitative mRNA analyses of death investigation in forensic pathology: an overview and prospects. *Legal Medicine*, 11, S43-S45.
- Zied, E. M. A., Gabre, R. M., & Chi, H. (2003). Life Table of the Australian Sheep Blow Fly *Lucilia cuprina* (Wiedmann) (Diptera: Calliphoridae). *Egyptian Journal of Zoology*, 41, 29–45.

X ANEXOS

Anexo A: Insect Epigenetic Mechanisms Facing Anthropogenic- Derived Contamination, an Overview

Gabriela Olivares-Castro ^{1,*}, Lizethly Cáceres-Jensen ², Carlos Guerrero-Bosagna^{3,4} and Cristian Villagra ¹

Instituto de Entomología, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, Avenida José Pedro Alessandri 774, Santiago, 7760197, Chile; cristian.villagra@umce.cl

² [Laboratorio de Físicoquímica Analítica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, Santiago, 7760197, Chile; lyzethly.caceres@umce.cl](#)

³ [Department of Physics, Chemistry and Biology \(IFM\), Linköping University, 581 83 Linköping, Sweden; carlos.guerrero.bosagna@liu.se](#)

⁴ Environmental Toxicology Program, Department of Integrative Biology, Uppsala University, Uppsala, 752 36, Sweden IFM Biology, Linköping University, Linköping, 58 183, Sweden.

* Correspondence: gp.olivares.castro@gmail.com

Simple Summary: Epigenetic molecular mechanisms (EMMs) are capable of regulating and stabilizing a wide range of living cell processes without altering its DNA sequence. EMMs can be triggered by environmental inputs. In insects, EMMs contribute to explaining both negative effects as well as adaptive responses towards environmental cues. Among these stimuli are chemical stressors, such as pesticides. We review the link between EMMs and pesticides in insects. We suggest that pesticide chemical behavior promotes both lethal and sublethal exposure of both target and non-target insects. As a consequence, for several native and beneficial insect (e.g., pollinators), EMMs are involved in diseases and disruptive responses due to pesticides, while in the case of pest species, EMMs are linked in the development of pesticide resistance and hormesis. We discuss the consequences of these in the context of insect global decline and biotic homogenization.

Abstract: Currently, the human species has been recognized as the primary species responsible for Earth's biodiversity decline. Contamination by different chemical compounds, such as pesticides, is among the main causes of population decreases and species extinction. Insects are key for ecosystem maintenance; unfortunately, their populations are being drastically affected by human-derived disturbances. Pesticides, applied in agricultural and urban environments, are capable of polluting soil and water sources, reaching non-target organisms (native and introduced). Pesticides alter insect's development, physiology, and inheritance. Recently, a link between pesticide effects on insects and their epigenetic molecular mechanisms (EMMs) has been demonstrated. EMMs are capable of regulating gene expression without modifying genetic sequences, resulting in the expression of different stress responses as well as compensatory mechanisms. In this work, we review the main anthropogenic contaminants capable of affecting insect biology and of triggering EMMs. EMMs are involved in the development of several diseases in native insects affected by pesticides (e.g., anomalous teratogenic reactions). Additionally, EMMs also may allow for the survival of some species (mainly pests) under contamination-derived habitats; this may lead to biodiversity decline and further biotic homogenization. We illustrate these patterns by reviewing the effect of neonicotinoid insecticides, insect EMMs, and their ecological consequences.

Keywords: imidacloprid; insectageddon; hormetic responses; sublethal exposure

1. Introduction

Epigenetics is a complex field of research concerning the molecular mechanisms capable of modifying DNA expression through organism' ontogeny. These changes can even become inheritable [1]. Epigenetic alterations can take place through an ever-expanding set of chemical modifications, known as epigenetic molecular mechanisms (EMMs), including changes affecting nucleotides such as DNA methylation (i.e., C5-cytosine methylation), post-translational modifications of histone variants, and nucleosome configuration, as well as noncoding RNA effects on living cells, among others [1–3] (Table 1). Epigenetic changes can take place stochastically, although EMMs are often the result of the influence of environmental cues on organisms [4]. Epigenetics has gained increasing interest among basic and applied scientists, originating a mounting body of interdisciplinary research and providing us with novel approaches to longstanding questions in biological sciences [1,5,6]. Several insect species have contributed as model organisms to the study of EMMs. These processes have been found to contribute in the regulation and stabilization of the basic self-organizing functions of insect life. Among these are the response of insects towards different environmental cues and disturbances, including those derived from human activities. Therefore, EMMs participate in the insect expression of varied responses to environmental stimuli such as polymorphisms and social caste specialization [7–9], insecticide resistance [10,11], and a myriad of other aspects of insect biology in model systems and wild species [12,13]. Unfortunately, while in recent decades we have been able to enrich current explanations of EMMs thanks to the study of varied aspects of insect life in several species, at the same time, their populations have been experiencing steady declines [14–16].

Table 1. Currently described mechanisms of stable epigenetic inheritance *.

Epigenetic Inheritance Mechanism	Heritable Effect	Reference
C5-cytosine methylation/demethylation	Phase variation	Pearson (2019) [17]
	Inheritance of methylated <i>Cori</i> *	Frandi & Collier (2019) [18]
	Epimutations	Skinner et al. (2019) [19]
	Paramutations	House & Lukens (2019) [20]
	Genomic imprinting	Tucci et al. (2019) [21]
Histone modifications	Transcriptional silencing	Di Felice et al. (2019) [22]
	X chromosome inactivation	Żylicz et al. (2019) [23]
	Dosage compensation	Shevchenko et al. (2019) [24]
Post-transcriptional silencing through RNA interference	Vernalization	Zhong et al. (2019) [25]
	Transgenerational inheritance of neural processes	Posner et al. (2019) [26]
	Heritable effects of starvation	Dupont et al. (2019) [27]

* Chromosome replication origin.

Insect species reduction in diversity and population abundance has been accompanied by the demise of several other associated organisms (including symbionts), in what has been called the sixth mass extinction [28–33]. Several factors contributing to biodiversity loss are derived from the application of technological packages associated with human activities such as extractive and industrial production as well as industrialized intensive agriculture [34]. The contamination from chemicals incorporated during agricultural field management (e.g., pesticides and fertilizers) has been found to be one of the most harmful to the environment and human health [35–37]. These alterations increase the threats to a wide range of organisms, from beneficial soil microorganisms to our own species [38–40]. Pesticides can cause chronic adverse health effects due to altered gene expression mediated by EMM, e.g., C5-cytosine methylation (hereafter “DNAm”) [35]. Several negative effects of sub-lethal doses of pesticides have been observed in the western honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), which include reduced fecundity of queens; impaired immune response; flawed navigation and learning ability; and physiological, reproductive, and developmental negative side effects [41,42]. Pesticides have also been linked to DNAm alterations in bees [41]. Similar perturbations of biological processes have been observed in ground-nesting and solitary bees, with decreases in brood production and larval hatching as well as impaired foraging behavior [43]. EMMs have been proposed to provide resilience to environmentally derived stresses, including pesticides. It has been demonstrated that insects may be capable of developing resistance to anthropogenic chemical contaminants thanks to epigenetic modifications [44–46]. This has been found in several pest insects, where being exposed to these chemical formulations allows these pests to tolerate other sources of stresses [44]. This suggests that anthropogenic stress not only may be directly harmful to native insects but also may promote the rapid evolution of resistance in pest species. As a consequence, biodiversity and the further homogenization of industrial agriculturally managed land have seen steady declines [47].

Here, we review the current knowledge about EMMs in insect biology considering the epigenetic effects of different anthropogenic contaminants, with special emphasis on pesticides. We review in detail the case of the neuro-active neonicotinoid insecticides in non-target insect species and their relation to the decline in managed and wild bee species, drawing a potential link between EMMs and pesticide contamination and explaining colony collapse disorder [41,48]. Finally, we discuss the relationship between EMM responses to anthropogenic contamination and their potential role in the context of the sixth mass extinction [32].

2. Epigenetic Molecular Mechanisms

As previously mentioned, epigenetics focuses on the study of molecular interactions that modify gene expression both during cells’ differentiation as well as later in the life of an organism, during cells’ quiescence [49]. Epigenetic patterns are mainly defined as the result of the interaction of individuals with their surrounding environment [50]. EMMs include many processes involving biochemical reactions, with the collaboration of different biomolecules in living organisms capable of

generating transient or heritable changes in gene expression [1,51]. A broad distinction can be made between pre- and post-transcriptional epigenetic mechanisms, depending on the levels in which they act upon gene expression. The former chemically modifies DNA nucleotides or the tails of histone proteins that wrap DNA around the nucleosome to form chromatin [6]. The most studied EMMs are DNAm (Figure 1), histone acetylation/deacetylation, histone methylation, histone phosphorylation, and histone ubiquitination (Figure 2) [52,53]. In contrast, a large number of known post-transcriptional mechanisms are associated with RNA, including transcripts, messenger (mRNAs), and non-coding (miRNAs, sRNAs, and lncRNA) [54–58]. Figure 3 shows miRNA transcription repression.

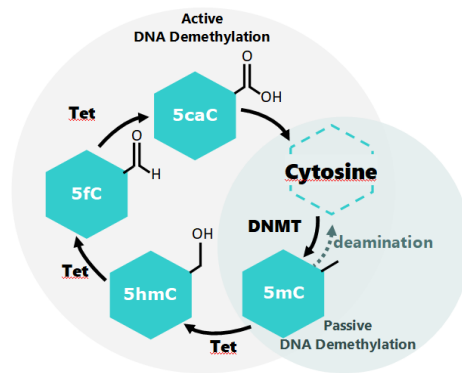


Figure 1. DNA demethylation and methylation: DNAm in eukaryotes occurs mainly at cytosine’s fifth carbon atom, catalyzed by de novo methyltransferases (*DNMT*). Active DNA demethylation involves the successive oxidation of the 5-methyl-cytosine (*5-mC*) to 5-hydroxymethyl-cytosine (*5-hmC*), to 5-formyl-cytosine (*5-fC*), and then to 5-carboxy- cytosine (*5-caC*), catalyzed by the Ten-eleven translocation enzyme family (*Tet*). Passive DNA demethylation occurs during replication due to the absence of methylation by *DNMT1* across several rounds of replication. Figure by Gabriela Olivares-Castro [59,60].

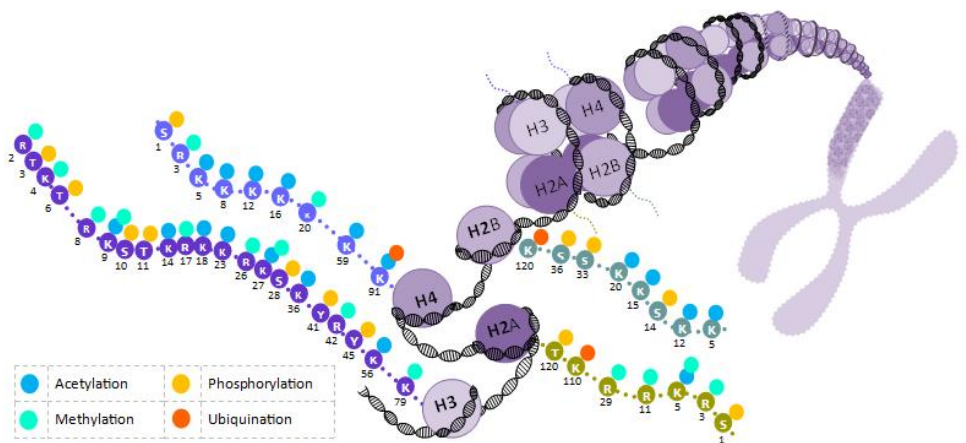


Figure 2. Histone modifications: Histones are proteins that package DNA into nucleosomes. Every nucleosome contains two subunits each of histones H2A, H2B,

H3, or H4. These histones have an N-terminal tail where the covalent modifications preferentially occur. These modifications can be acetylation/deacetylation, methylation, phosphorylation, or ubiquitination. All of these modifications can be related to different effects on the biology of the organism. Histone acetylation is triggered by the addition of an acetyl group and is involved in various cell processes such as chromatin dynamics and transcription, and apoptosis, among others. Histone methylation occurs via the addition of a methyl group and causes transcription repression or activation, depending on target sites. Histone phosphorylation happens when a phosphate group is added to the histone; it is involved in DNA repair, cell cycle progression, chromosome condensation, and apoptosis. Histone ubiquitination happens with the transport of ubiquitin to the histone core proteins and can either activate or inhibit target gene expression, depending on which histone is affected. Figure by Gabriela Olivares-Castro [61].

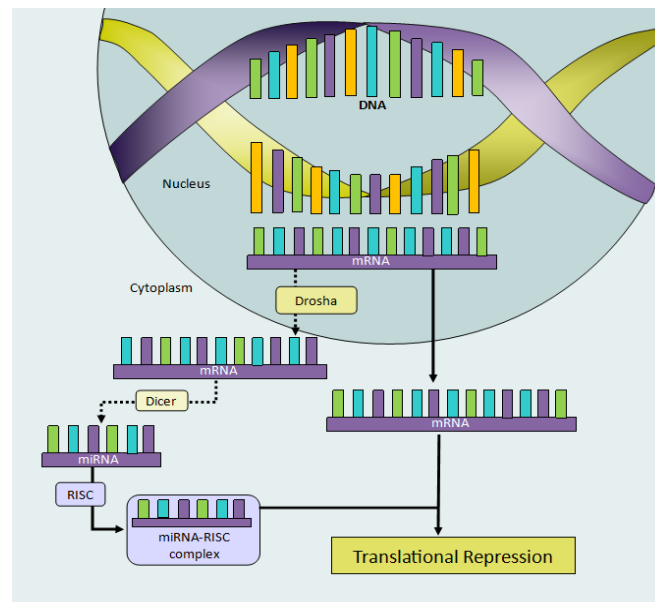


Figure 3. miRNA translational repression: to block protein expression, miRNA target mRNA and bind to them, preventing translation. Inside the nucleus, primary miRNA are cleaved by RNase III Droscha to produce smaller precursors of 60–70 nucleotides, which then translocate to the cytoplasm. Once there, the precursors are processed by another RNase III Dicer, which generates a duplex RNA of ~22 nucleotides. One strand is degraded, and the other is incorporated into the RNA-induced silencing complex (RISC), where it binds to the 3' untranslated region of complementary mRNA. As a consequence, this may result either in its degradation and/or reduced translation, which has been proposed to lead to translational repression. Figure by Gabriela Olivares-Castro [62].

The epigenome comprises all of the epigenetic modifications associated with a given genome in the form of chemical modifications of DNA and histone tails [63]. There are five environmental factors that define the origin and maintenance of epigenome modifications: behavior, stress (both biotic and abiotic), nutrition, toxin exposure, and stochasticity (in the placement of methylation marks). All of these factors are especially relevant during early developmental stages [64]. Figure 4 shows the main factors reported to be associated with EMMs in insects: DNAm, histone modifications, and micro-RNA (miRNA) interference.

Recent insightful reviews of EMMs illustrate current advances in the study of epigenetic modifications in insects [2,7,65,66]. It has been found that EMMs generally allow for the development of biological responses to environmental challenges, including those of anthropogenic origin. An example of these are EMM-related pesticide resistance, which has been observed from aphids to mosquitoes [45]. EMMs can also play a role in the protection of inheritance. For example, EEMs have been shown to be highly involved in insect transposon silencing through their potential to suppress genome rearrangements [54].

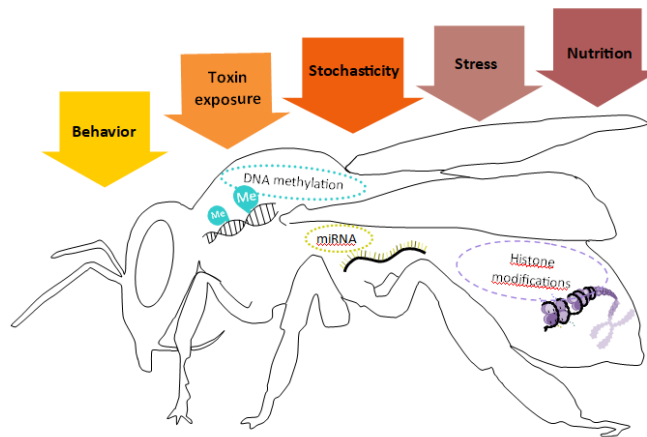


Figure 4. Environmental factors that trigger epigenetic mechanisms: Schematic representation of an insect (represented by a bee silhouette) illustrating the main EMMs found. The colored arrows denote the five main environmental factors that have been described in the literature that trigger the different epigenetic responses in the organism. These responses may be pre-transcriptional such as DNAm and histone modifications, or post-transcriptional such as miRNA interference. Figure by Gabriela Olivares-Castro [64].

DNA expression changes induced by EMMs can be inherited by the descendants of the exposed individuals through transgenerational epigenetic inheritance, which bypasses the reprogramming of DNAm and chromatin proteins during meiosis [67]. Some authors consider that the heritability of epigenetic changes, either as a cell lineage effect or in a transgenerational sense, is their defining quality [64]. An extensive recent review on the subject of epigenetic inheritance by Tikhodeyev [68] describes ten different mechanisms of stable allelic epigenetic inheritance (SAEI) and discusses two other possible mechanisms. In Table 1, we provide an updated version of Tikhodeyev’s summary of different mechanisms of epigenetic inheritance, in which we incorporate recent examples of SAEI, focusing on the three main epigenetic mechanisms discussed in this work.

Insect Epigenetics and Contamination

Genetics has benefited greatly from the study of various insect models (class *Insecta*), which have been used in the discovery and

characterization of different molecular mechanisms [66,69–75]. Major topics in biology have been enriched by the feedback from the study of insect EMMs, such as cell biology, development, and evolution [54]. For example, epigenetics has contributed to enriching explanations regarding the mechanisms underlying polymorphisms such as sociality in insects, where EMMs have been shown to be relevant in explaining caste differentiation [76,77]. EMMs have also contributed to explaining how environmental influences alter different aspects of phenotypes without modifying genotypes [78].

The study of anthropogenically derived influences as epigenetic stimuli, such as pollution and climate change, are among the fast-growing areas of interest within insect EMMs [79–81]. The goal of these studies is to assess how stressors may affect different ecological levels [82], considering exposure to pesticides [41,44,83], endocrine disruptors [11,84,85], heavy metals [84,86,87], or temperature changes [88] as triggers of epigenetic changes. In Table 2, we summarize the different responses of insect biology to different kinds of toxicants and whether there is evidence of the role of EMMs in these processes.

Table 2. Responses of insects to different toxicants. The first column indicates the kind of chemical compound described; the second indicates the compound. The third lists the affected species. The fourth column indicates the order and family of the insect. The fifth lists the effects observed in response to the toxicant. The sixth shows the epigenetic molecular mechanisms involved, where “DNA M.” refers to C5-cytosine methylation, “H. M.” stands for histone modifications, and “RNA-b M.” is RNA-based mechanisms [54]. The seventh column has the corresponding references cited.

Chemical Group/ Functional Category	Elements or Compound s	Affected Species	Order: Family	Effects	EMMs Studied	References
Heavy Metals	Cu ²⁺	<i>Aedes aegypti</i> ; <i>Anopheles arabiensis</i>	Diptera: Culicidae	Cell metabolisms, egg hatching, apoptosis; decrease in RNA methylation; DNAm methylation	DNA M., RNA-b M	Rayms-Keller et al., 2000 [89]; Raes et al., 2000 [90]; Jeanrenaud, Brooke & Oliver, 2020 [84]
	Zn	<i>Rhithrogena robusta</i>	Ephemeroptera: Heptageniidae	Reduced individual growth rate	NO	Carlisle & Clements, 2003 [91]
	Pb	<i>Lymantria dispar</i> ; <i>Anopheles arabiensis</i>	Lepidoptera: Erebidae; Diptera: Culicidae	Decrease in growth and reduction in hatching success; increased in RNA methylation patterns; DNA methylation	DNA M., RNA-b M.	Gintenreiter, Ortel & Nopp, 1993 [87]; Jeanrenaud, Brooke & Oliver, 2020 [84]
	Cd	<i>Orchesella cincta</i> ; <i>Anopheles arabiensis</i>	Collembola: Entomobryidae; Diptera: Culicidae	Transcriptome stress response; increase in 5-hmC methylation	DNA M.	Roelofs et al., 2009 [86]; Jeanrenaud, Brooke & Oliver, 2020 [84]
Heavy Metals	Al	<i>Drosophila melanogaster</i>	Diptera: Drosophilidae	Reduction in median life span; climbing ability and cognitive capacity	NO	Wu et al., 2012 [92]

Chlorinated hydrocarbons	DDT	<i>Ephemerella subvaria</i> , <i>Ephemerella auravillii</i>	Ephemeroptera: Ephemerellidae	Impaired subimago emergence	NO	Hitchcock, 1965 [93]
	Aldrin	<i>Cheumatopsyche analis</i>	Trichoptera: Hydropsychidae	Hormetic response	NO	Moye & Luckmann, 1964 [94]
	Chlordane	<i>Periplaneta americana</i>	Blattodea: Blattidae	Increase in total hemocyte count; excessive vacuolization of epithelial cells in the midgut lumen	NO	Gupta & Sutherland, 1968 [95]
	Endrin	<i>Periplaneta americana</i>	Blattodea: Blattidae	Dose-dependent blocking of GABA receptors	NO	Wafford et al., 1989 [96]
Chlorinated hydrocarbons	Heptachlor	<i>Periplaneta americana</i>	Blattodea: Blattidae	Dose-dependent blocking of GABA receptors	NO	Lummis et al., 1990 [97]
	Lindane	<i>Periplaneta americana</i> ; <i>Chironomus riparius</i>	Blattodea: Blattidae; Diptera: Chironimidae	Dose-dependent blocking of GABA receptors; reduction in imago emergence	NO	Wafford et al., 1989 [96]; Maund et al., 1992 [98]
Organophosphates	Parathion	<i>Musca domestica</i>	Diptera: Muscidae	Toxin degradation	NO	Matsumura & Hogendijk, 1964 [99]
	Malathion	<i>Periplaneta americana</i> ; <i>Musca domestica</i>	Blattodea: Blattidae; Diptera: Muscidae	Toxin metabolization	NO	Krueger & O'Brien, 1959 [100]
	Glyphosate	<i>Deleatidium spp.</i>	Ephemeroptera: Leptophlebiidae	Reduction in imago emergence	NO	Magbanua et al., 2016 [101]
Organophosphates	Diazinon	<i>Musca domestica</i>	Diptera: Muscidae	Toxin degradation	NO	Matsumura & Hogendijk, 1964 [99]
	Tetrachlorvinphos	<i>Alphitobius diaperinus</i>	Coleoptera: Tenebrionidae	Resistance to pesticide	NO	Hamm et al., 2006 [102]
	Azamethiphos	<i>Musca domestica</i>	Diptera: Muscidae	Resistance to pesticide	NO	Kristensen et al., 2000 [103]
	Phosmet	<i>Megachile rotundata</i>	Hymenoptera: Megachilidae	Reduced nesting and progeny production	NO	Alston et al., 2007 [104]
	Diclorvos	<i>Alphitobius diaperinus</i>	Coleoptera: Tenebrionidae	Resistance to pesticide	NO	Chernaki-Leffer et al., 2011 [105]
	Terbufos	<i>Alphitobius diaperinus</i>	Diptera: Sarcophagidae	Avoidance of pesticide	NO	Jales et al., 2020 [106]
	Sevin	<i>Musca domestica</i>	Diptera: Muscidae	Metabolization of pesticide	NO	Eldefrawi & Hoskims, 1964 [107]
Carbamates	Aldicarb	<i>Pseudatomoscelis seriatius</i> ; <i>Musca domestica</i>	Hemiptera: Miridae; Diptera: Muscidae	Death	NO	Davis & Cowan, 1972 [108]; Spurr & Sousa, 1974 [109]
	Carbofuran	<i>Diabrotica virgifera</i>	Coleoptera: Chrysomelidae	Increase in oviposition; increase in longevity	NO	Ball & Su, 1979 [110]
	Carbaryl	<i>Diabrotica virgifera</i>	Coleoptera: Chrysomelidae	Increase in oviposition	NO	Ball & Su, 1979 [110]
Pyrethroids	Allethrin	<i>Periplaneta americana</i>	Blattodea: Blattidae	Temperature dependent	NO	Gammon, 1978 [111]

				disruption of the nervous system		
	Bifenthrin	<i>Apis mellifera ligustica</i>	Hymenoptera: Apidae	Reduction in oviposition; reduction in cap rate; reduction in emergence rate; success rate of development	NO	Dai et al., 2010 [112]
	β Cyfluthrin	<i>Drosophila melanogaster</i> (Sepia mutant)	Diptera: Drosophilidae	Reduction imago emergence; prolongation of total developmental period	NO	Nadda, Saxena & Srivastava, 2005 [113]
	Cypermethrin	<i>Alphitobius diaperinus</i>	Coleoptera: Tenebrionidae	Resistance to pesticide	NO	Chernaki-Leffer et al., 2011 [105]
	Cyphenothrin	<i>Ranatra filiformis</i>	Hemiptera: Nepidae	Hyperactivity, death	NO	Saha & Kaviraj, 2007 [114]
	Deltamethrin	<i>Apis mellifera ligustica</i>	Hymenoptera: Apidae	Reduction in oviposition; lower hatch rate; reduction in cap rate; success rate of development	NO	Dai et al., 2010 [112]
Pyrethroids	Permethrin	<i>Acheta domesticus</i>	Orthoptera: Gryllidae	Death	NO	Schleier & Peterson, 2010 [115]
	Resmethrin	<i>Danaus plexippus</i>	Lepidoptera: Nymphalidae	Reduced adult size, death	NO	Oberhauser et al., 2009 [116]
	Transfluthrin	<i>Culex tarsalis</i>	Diptera: Culicidae	Avoidance of pesticide	NO	Britch et al., 2020 [117]
Neonicotinoids (neuroinsecticides)	Thiamethoxam	<i>Musca domestica</i>	Diptera: Muscidae	Acetylcholine receptors hyperexcitation; ATPase activity	NO	Abdel-Haleem et al., 2018 [118]
	Imidacloprid	<i>Apis mellifera</i>	Hymenoptera: Apidae	Acetylcholine receptors hyperexcitation; Malpighian tubule deformation; changes in global DNA methylation	DNA	Paleolog et al., 2020 [119]; M. Hu et al., 2018 [120]; Brevik et al., 2020 [81]
Neonicotinoids (neuroinsecticides)	Acetamiprid	<i>Apis mellifera</i>	Hymenoptera: Apidae	Reduction in sucrose sensitivity; increased locomotive activity	NO	El-hassani et al., 2007 [121]
	Clothianidin	<i>Chironomus dilutus</i>	Diptera: Chironomidae	Reduction of emergence	NO	Maloney et al., 2018 [122]
	Nitenpyram	<i>Bemisia tabaci B biotype</i>	Hemiptera: Aleyrodidae	Resistance to pesticide	NO	Liang et al., 2012 [123]
	Thiacloprid	<i>Culex pipiens</i>	Diptera: Culicidae	Preimaginal development duration	NO	Beketov & Liess, 2008 [124]
	Dinotefuran	<i>Chironominae spp.</i>	Diptera: Chironomidae	Population hormetic response	NO	Kobashi et al., 2017 [125]

Endocrine disruptors (ED)	Bisphenol A	<i>Chironomus riparius</i>	Diptera: Chironomidae	Increase in mRNA for ecdysone receptor and increase in the expression of HSP70	RNA-b M.	Planelló, Martínez-Guitarte & Morcillo, 2008 [85]
	Tributyltin	<i>Chironomus riparius</i>	Diptera: Chironomidae	DNA breakage	NO	Martínez-Paz et al., 2013 [126]
	Pentachlorophenol	<i>Chironomus riparius</i>	Diptera: Chironomidae	Upregulation of Hsp70 gene transcription; downregulation of the Hsp27 transcription	NO	Morales et al., 2014 [127]
	Nonylphenol	<i>Chironomus riparius</i>	Diptera: Chironomidae	DNA breakage	NO	Martínez-Paz et al., 2013 [126]
	Triclosan	<i>Chironomus riparius</i>	Diptera: Chironomidae	DNA breakage	NO	Martínez-Paz et al., 2013 [126]
	Benzyl butyl phthalate	<i>Chironomus riparius</i>	Diptera: Chironomidae	Overexpression of the EcR gene	NO	Planelló et al., 2011 [128]
Endocrine disruptors (ED)	DEHP/Di(2-ethylhexyl)phthalate	<i>Chironomus riparius</i>	Diptera: Chironomidae	Mouthparts deformities	NO	Park & Kwak, 2008 [129]
	Ethinylestradiol	<i>Drosophila melanogaster</i>	Diptera: Drosophilidae	Reduction in lifespan, decrease in fertility	NO	Bovier et al., 2018 [130]
	Genistein/5,7-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	<i>Aedes albopictus</i> ; <i>Anopheles arabiensis</i>	Diptera: Culicidae	DNA methylation; reduction in egg hatching	DNA M.	Oppold et al., 2015 [11]; Jeanrenaud, Brooke & Oliver, 2020 [84]
	Vinclozolin (Fungicide)	<i>Aedes albopictus</i> ; <i>Anopheles arabiensis</i>	Diptera: Culicidae	DNA methylation; reduction in egg hatching	DNA M.	Oppold et al., 2015 [11]; Jeanrenaud, Brooke & Oliver, 2020 [84]
	DMSO/dimethyl sulphoxide	<i>Antheraea assamensis</i>	Lepidoptera: Saturniidae	Alterations in hormonal balance; alterations in silk production	NO	Unni et al., 2009 [131]
	Micro plastics	Polystyrene	<i>Culex pipiens</i>	Diptera: Culicidae	Accumulation in Malpighian tubules	NO
Polypropylene		<i>Lestes viridis</i>	Odonata: Lestidae	Accumulation in body	NO	Akindele, Ehlers & Koop, 2020 [133]
Acrylonitrile butadiene styrene (ABS)		<i>Siphonurus sp.</i>	Ephemeroptera: Siphonuridae	Accumulation in body	NO	Akindele, Ehlers & Koop, 2020 [133]

Besides direct lethality, a wide array of sub-lethal effects has been described in insect biology in response to different levels of exposure to environmental toxicants [134–138]. Population hormetic responses appear after an organism is stimulated by a relatively low dose of a stressor; thus, this may enhance their chances of survival under the pressure of this environmental stress source [125]. For example, exposure to sub-lethal pesticide traces can induce changes such as a reduction in sucrose sensitivity [121], a deformation of the Malpighian tubules [120], or the development of resistance towards the pesticide [102,105,123]. Although some of these effects have been linked to EMMs by previous researchers [54,120], there are other responses towards different pesticides where it is possible to hypothesize the involvement of EMMs [83,139], for instance, the activation of the cytochrome P₄₅₀ monooxygenase (CYP450) pathway after exposure to a low dose of pesticide [83].

Over half of the studies shown in Table 2 were conducted on dipterans as model organisms, with considerable focus on species with aquatic phases during development such as mosquitoes (e.g., [11,84,132]). Of all the toxicants reviewed, the only group without studies in aquatic environments is the carbamate cholinesterase inhibitors, a group of organic compounds derived from carbamic acid (NH₂COOH) found in broad-spectrum pesticides (e.g., [107–110]). Despite the concern raised about carbamides and their effects on human health [36,140], this group is one of the least studied regarding their effect on biodiversity, including arthropods [141]. Carbamates have been found among the cocktail of contaminants detected in irrigation water sources, along with other pesticides, microplastics, and pharmaceutical residues. Importantly, these contaminants may exert synergistic negative effects on aquatic organisms [142].

Organophosphates such as diazinon and glyphosate have shown remarkably high sorption and irreversible sorption in allophanic agricultural soils [143,144]. It has been reported that glyphosate has consequences at the ecosystem level, affecting the soil and water sources due to its leaching from the soil [143]. Evidence also shows glyphosate teratogenicity in vertebrates including our own species, reporting unwanted effects in non-target organisms for GPS ranging from physiological abnormalities to carcinogenesis [143]. GPS also affects the intestinal microorganisms of bees, increasing the mortality of native bees [137].

Only 20% of the studied organisms in Table 2 are native species, with none of the studies exploring the involvement of EMM responses to toxicants, contrasting with 40% of studies considering plague organisms and 40% conducted on model species. These values reflect how limited the currently available information is on these kinds of effects in native species regarding pesticides and other toxins, an aspect that should be further explored if loss of biodiversity is to be addressed.

In contrast, endocrine disruptors are the group with the most studies in insects, about 22.4% of reviewed articles, with the majority from aquatic environments, followed closely by organophosphates with 17.2%. The

most frequently observed effects in these cases were epigenetic modifications as well as changes in fertility and egg hatching. DNAm was the most frequently observed of the EMMs reviewed in Table 2, being described in dipterans of the culicid and chironomid families as well as in hymenopterans such as honeybees. RNA-based modifications were also described in aquatic dipterans from the culicid and chironomid families, reinforcing the importance of aquatic organisms in toxicological research. It is relevant to highlight that most of the consequences of the contaminants reviewed can be categorized as sub-lethal alterations. This stresses the need to reconsider the protocols broadly used to assess the effects of pesticide toxicants on study organisms for further applied use in agriculture farmlands and urban environments, as sub-lethal exposure is the most likely source of EMM-related alterations, since a “sub-lethal” exposure to contaminants is capable not only of generating detrimental environmentally induced effects in the organisms directly affected but also in their progeny. This may result in pervasive transgenerational alterations to insect populations and species.

Even in the cases where effects on EMMs in response to a specific chemical have not been studied, it is possible to hypothesize their potential involvement in several of the phenotypic alterations detected due to exposure to contaminants (Table 2). This can be achieved through comparing similar effects of contaminants in the focal species previously investigated, where phenotypic alterations (e.g., physiological) had a clear link with EMMs [54]. This approach may help to identify further links between human-derived pollution and EMMs to be explored in future studies. The participation of EMMs as regulators of insect responses to pesticides can also be inferred by analyzing the methylome and genome in specific experimental situations such as resistance to a certain chemical [145].

Different innovative approaches are being employed to address this problem, such as *in vitro* studies using vertebrate and invertebrate model organisms. Several of these toxicants have been identified as capable of affecting epigenetic states in humans [60,140,146]. In the following section, we delve into the interactions between pesticides and the environment.

3. Pesticide Chemical Behavior in the Environment

Pesticides include many classes of chemicals used to control undesirable target species such as agricultural or household pests [147]. These can be chemical extracts derived from the metabolites of different organisms such as pyrethrins [148] and neem seed oil [149]. However, most pesticides used are synthetic chemical formulations massively produced and distributed by pharmaceutical companies [150]. As has been extensively demonstrated and reviewed, pesticides not only harm the intended target species but also, most of the time, can exert negative effects on a diversity of other non-target life forms exposed to them, including humans [3,151–153]. Pesticide formulations have been found to have adverse consequences in the central nervous system; cognitive abilities and behavior; reproduction; endocrine regulation; development; the promotion of diseases (e.g., cancer) [154–157]; and ultimately the survival

of many organisms, including pollinators exposed to these agrochemicals [135,158,159].

The global amount of pesticide application has remained constant during recent decades; nonetheless, it has been reported that the toxicity of these formulations has been increasing. The total worldwide expenditure in pesticides exceeded 56 billion USD in 2012. Herbicides are the dominant pesticide used to control weeds in agricultural production, accounting for the largest proportion (45%) of total pesticide expenditure, followed by insecticides, fungicides, and other pesticides [160].

The main processes studied to evaluate the environmental fate of herbicides are sorption kinetics, sorption–desorption, degradation, biodegradation, bioavailability, and transport [161–163]. Sorption is the key parameter in evaluating the fate and behavior of herbicides in soils in relation to bioavailability, distribution, and transport to other environmental compartments [164]. The sorption process in soils is one of the most relevant aspects to consider for appropriate use of herbicides and their environmental fate. The chemical properties of herbicides together with the physical, chemical, and biological characteristics of soils influence their fate and behavior in soils [144].

Volcanic ash-derived soils (VADS) such as andisols generally have a high concentration of total phosphorus but not plant-available P, so these soils require frequent adjustments of the soil pH, replacement of exchangeable Mg, and heavy P applications in order to yield crops [144]. These industrial agriculture amendments can increase the leaching potential of organophosphate herbicides such as glyphosate (GPS) (Table 2) that have been recently applied as a consequence of competition with phosphate for surface sites, an increase in negative charge on the surface resulting from phosphate sorption [165]. These aspects help to explain how pesticide residues can be adsorbed in the soil as well as can infiltrate into groundwater [122,166–169].

The broad-spectrum herbicide GPS is used non-selectively in agriculture to control weeds and herbaceous plants [143,165]. GPS sorption studies on VADS have reported that it is strongly adsorbed by mineral clays and organic matter (hereafter “OM”) from agricultural VADS [143,165]. GPS has shown irreversible sorption in allophanic agricultural soils [143,165]. The exceptionally high sorption of GPS in ultisols has been related to kaolinite content and acidic *pH* [165].

An excess of GPS sorption in unfertilized VADS may result in an unavailability of this herbicide to targeted pests as well as uneven distribution around the plants [170]; microbial degradation of this herbicide to its primary metabolites, glyoxylate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) [143,144,165]; alteration of soil microbiota; and adverse effects on multicellular species [171]. It has been reported that GPS has consequences at the ecosystem level, affecting the soil and water due to its leaching from the soil [143]. The contamination of water sources by pesticides may also trigger detrimental effects in several aquatic insects during early development stages [170,172]. Evidence also shows GPS teratogenicity in vertebrates, including our own species, reporting unwanted effects in non-target organisms ranging from physiological abnormalities to carcinogenesis [161]. GPS also affects the

intestinal microorganisms of bees, increasing the mortality of native bees [143].

Similar patterns of environmental risks due to pesticide use have been reported for other formulations such as carbamates and neonicotinoid insecticides, which were initially considered not harmful but in which the risks are currently under question [173]. Carbamate insecticides (Table 2) have been found among the cocktail of contaminants detected in irrigation water sources, along with other pesticides, microplastics, and pharmaceutical residues. Importantly, these contaminants may exert synergistic negative effects on aquatic organisms [142].

Neonicotinoids such as acetamiprid (ACT) and imidacloprid (IMD) (Table 2) are insecticides widely used in agriculture [164]; they exert a powerful systemic action on insects for the protection of various crops against piercing and sucking pests, with low acute and chronic toxicity for mammals, birds, and fish [164,174]. Neonicotinoids usually have high water solubility and a low octanol–water partition coefficients (K_{ow}) [164] and are not readily biodegradable [164]. All neonicotinoid insecticides are rather stable at acidic or neutral pH and even at alkaline pH (half-life from 11.5 to 420 days) [164], since they hydrolyze slowly. The half-lives of ACT and IMD are 3–8 weeks, and 13 and a half months, respectively [174]. These properties of neonicotinoid insecticides influence their fate in the environment, since between 2 and 20% of the active ingredient is adsorbed by the plant (depending on the type of crop), with an average adsorption of 5%; thus, between 80 and 90%, or even > 95% of the bulk active ingredient is spread in the environment and enters the soil or surface/ground water after planting [164,174].

Neonicotinoids easily diffuse into soils and waterways in agricultural settings and their neighboring areas through leaching and runoff from arable lands [174,175] due to their hydrophilic character and low potential for sorption to soil [174], raising concerns that they may pass into bodies of water and therefore can pose a risk for water quality. Neonicotinoids have been found in the aquatic environment in almost all continents at concentrations above the European Union (EU) legislation limits [164].

The amount of neonicotinoid sorption to soil increases with increasing soil OM content and a slower sorption rate due the presence of chemical non-equilibrium [161,174,175]. Neocotinoid sorption increases with the aging of soil residues due to sorption kinetic processes and diffusion of this kind of insecticides, which can lead to an unexpected persistence of neocotinoids in the environment, decreasing the potential risk of leaching to deeper layers [175].

It has been reported that the fraction of humic substances (HS) (HA, fulvic acids (FA), and humin (HM)) can be more important in determining neocotinoid sorption parameters given the high reactivity of HA and FA [174]. ACT has been mainly sorbed to HS fractions in soil; ACT has been sorbed in mineral particles, and Al^{3+} and Fe^{3+} ions through electrostatic interactions, but these play only a minor role in the ACT sorption process on soil under weakly acidic to neutral pH [174].

All of this evidence shows how difficult it is to control the environmental fate of pesticides (or even to be able to track their contamination levels in soil, water, or air). In order to assess how common

it is for different non-target species, from urban, rural, agricultural, and adjacent wild habitats, to suffer from pesticide contamination, it is key to understand the probability with which different pesticides end in non-desired places. Thus, the study of the link between pesticide environmental fate and sublethal effects on non-target organism is a must.

Sub-lethal effects on target pests are also an inevitable consequence of these applications. These exposures have been found to allow pests to develop resistance, for instance, through hermetic responses that have been also hypothesized to be linked with EMMs. This is developed further in the following section.

4. Pesticide Effects on Pest and Non-Target Organisms

Pesticides may control target pest species, leading to a temporal/local decline in these non-desired organisms but can also lead to the development of resistance, among a wide range of other possible responses [3,43,122,123,176–180]. Such a range of responses has to do with a variety of factors, from the type of organism being exposed to the dose and venue of exposure [32]. For instance, under intensive agriculture management, pesticides are often reapplied several times due to their natural decrease in availability over time. It has been reported that pests can develop resistance to formulations during periods of exposure to lower pesticide concentration [10,44,181]. It has also been described that the use of pesticides may end up helping the pest they were intended to combat by suppressing pest predators and competitors that are naturally available in the ecosystem. Outbreaks of new pests that were under control before the application of the pesticide can emerge due to the development of resistance against pesticides by the pest species [3,43].

The exposure of non-target insects (such as parasitic wasps and social Hymenoptera) to sub-lethal levels of contamination may trigger several developmental and physiological alterations as well as may augment their susceptibility to develop diseases, thereby reducing their chances of survival [12,182]. The effects of pesticides on insects may depend, among other factors, on the mechanisms that the exposed organisms employ to process these toxicants [45]. These mechanisms include behavioral responses such as avoiding pesticides, metabolic adaptation to process toxic chemicals, epigenetic changes, and altered regulation of coding proteins [43,45,54,85].

Insects are recognized as the main collaborators in nature's contribution to people, such as in food production [182]. For instance, data from USA show that the main crops produced are strongly dependent on insect pollination, where wild pollinators contribute to a large portion of the crop yield obtained [183]. This pattern is similar worldwide [184], even for crop species with autonomous self-reproduction [185]. This evidence stresses the need for understanding and considering the interaction of pesticides with pollinators. In the following section, we focus on neonicotinoid pesticides. Although these formulations were initially proposed as less harmful in comparison with other pesticide chemical formulations to non-target organisms such as insect pollinators, recent evidence demonstrates that this is not an accurate claim.

5. Neonicotinoid Insecticides

Neonicotinoids are third-generation broad spectrum pesticides intended for the control of sucking (e.g., aphids, whiteflies, leaf- and planthoppers, and thrips) and chewing pest insects (e.g., microlepidoptera and some Coleoptera) [123,186]. These pesticides can be translocated to different tissues as a systemic property of this type of pesticide; for instance, neonicotinoids can be absorbed by roots [41,187]. Neonicotinoids can also be applied by directly impregnating treated seeds, a method that transfers a great portion of the pesticides to the soil due to their high solubility in water [188]. The apparent benefits of neonicotinoid applications on plants have been overshadowed by recent studies showing that the use of thiamethoxam (hereafter “TMX”) and imidacloprid (hereafter “IMI”) on crop sunflowers *Helianthus annuus* L. (Asteraceae) induces mitotic phase irregularities as well as genotoxic effects (e.g., DNA damage and genome instability) [189]. Neonicotinoid pesticides have also been used in home gardens to control domestic pests and in cats and dogs to prevent fleas and ticks [190].

The most common active ingredients in neonicotinoids are IMI, acetamiprid, nitenpyram, TMX, thiacloprid, clothianidin (hereafter “CTD”), and dinotefuran [186]. However, novel formulations are continuously being produced. Neonicotinoid pesticides work by binding to the nicotine acetylcholine receptor (nAChR), thereby affecting the central nervous system of insects [118,190,191]. As acetylcholine receptors were proposed as less important for vertebrates than invertebrates, neonicotinoids as pesticides were promoted to be safer for non-target organisms (such as humans) [187]. These ideas have promoted an indiscriminate use of these pesticides in all types of crops and soils, even though the human health impacts of exposure to these chemicals is not fully understood [187].

Often, pesticide application methods, both agricultural and domiciliary, do not appropriately discriminate between target and non-target organisms. Neonicotinoids are not an exception to this problem [192–194]; many different organisms (e.g., insects) may be affected by these toxicants, triggering varied responses [44,195,196]. Neonicotinoid contamination of non-target organisms has been extensively documented in animals [197–199]. For example, neonicotinoid contamination can impact native fauna such as the Japanese crested ibis, where exposure to CTD was found to be detrimental to reproduction, most likely due to triggering oxidative stress [197]. IMI can alter early development in mammals (e.g., mice). These alterations were found to be related to C5-cytosine methylation due to exposure to this neonicotinoid pesticide [200]. Exposure to acetamiprid has been found to be linked to DNAm in rat brain and liver [201]. There have been studies in mice showing that neonicotinoid and acetamiprid can cross the blood–brain barrier, which highlights the severity of the potential risks to mammals [166]. Thus, neonicotinoids trigger alterations in different regulatory process, including EMMs, in vertebrates.

Varied sub-lethal detrimental effects and epigenetic consequences have been also found in other life forms. It has been demonstrated that neonicotinoids are extremely toxic to a great diversity of invertebrates. For

instance, the evaluation of the impact of the IMI-containing insecticide “Tree and Shrub”™ on wildtype *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) (Nematoda: Rhabditidae) disrupted fertility along with growth and locomotion [202]. It has been demonstrated in Gastropoda that neonicotinoid thiacloprid damages the central nervous system of the native species *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) (Hydrophila: Lymnaeidae), the great pond snail, through its modulation of nicotinic acetylcholine receptors, hampering cholinergic neurotransmission [203].

Neonicotinoids lead to death and to a wide array of critical sub-lethal impacts in Insecta evaluated in field-realistic exposure, including alterations linked to EMMs (both in managed and wild species) [43,119,137,158,204]. These consequences led to the loss of the ecosystem services provided by these insects, including nutrient cycling and pollination [205]. These declines in local insect biodiversity have been shown to be linked to unexpected costs in agricultural production under industrialized management and impacts on the health of managed agroecosystems [206]. Although non-target insects may be exposed to lower doses of insecticides than target ones, for flying insects, this situation depends also on chance, unless they exhibit behavioral resistance [45]. Exposure to lower doses might not kill them, but there is recent evidence of their impact on different regulatory processes at different scales [140], including providing the descendants with resistance to this pesticide [83,207] and increasing their population via hormetic response [182,208]. In insects, this has been chiefly studied in managed bees *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) [187]. Nonetheless, there is also a growing body of evidence demonstrating adverse consequences on other managed as well as native insects [209–211].

For instance, in the parasitic wasps key for biological control in agricultural management such as *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae), the neonicotinoid imidacloprid disrupts sex allocation cues, reducing their reproductive success [212]. Sub-lethal IMI exposure in the Colorado potato beetle, pest *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824 (Coleoptera: Chrysomelidae) has been linked to alterations in specific genes, C5-cytosine methylation, and transposable elements that have been postulated as linked to the development of insecticide resistance [81].

Similar patterns were found for one of the major pests of fruit orchards: the codling moth *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Tortricidae). In this pest species, it was found that acetamiprid exposure in a field population triggered a significant increase in biotransformation and antioxidant enzyme activity; the detoxification of acetamiprid was proposed to be achieved by methylation [213]. These hormesis-like resistance patterns were proposed by the authors to be linked with epigenetic mechanisms [213,214].

These consequences on insect biology of the exposure to these toxicants are very likely to be shared between most studied insects (e.g., managed species and model insects) and native insects. For instance, EMMs found to be involved in alterations detected in managed bees due to the application of neonicotinoid pesticides may also impact wild bee species and other native insect species, especially in agricultural

landscapes [215]. These plausible scenarios are discussed in the following section, with a particular focus on bees.

Neonicotinoid Effects on Bees

There is an abundant body of evidence that shows that sub-lethal doses of neonicotinoids have direct effects on several vital functions of *Apis mellifera* [41,48,83,120,187,216], from reproductive ability to cognitive impairments. These issues have been linked to epigenetic mechanisms [45]. For instance, different authors have described changes in histone acetylation and deacetylation [120,215], their transgenerational inheritance [76], and C5-cytosine methylation effects [41].

There has been strong evidence for almost a whole decade on the involvement of sub-lethal doses of neonicotinoids in the development of colony collapse disorder (hereafter “CCD”). Of particular interest is an experiment showing that the use of high-fructose corn syrup (HFCS) as an alternative to honey or sucrose-based food was related to CCD [48]. When the authors investigated the composition of the HFCS used, they found sub-lethal dosages of imidacloprid, a neonicotinoid insecticide widely used in the Americas (Canada, the United States, the Caribbean, and Central and South American countries) and China [119,190,207,217,218]. As previously mentioned, imidacloprid and other neonicotinoids are systemic pesticides applied directly to seeds through impregnation, which stay on the plant during its development and are detected in most plant tissues [187], and might end up in the final product that humans and other animals consume, although in much lower concentrations than the original dose [219].

The effects of neonicotinoids on bees are many and wide-ranging (e.g., [137]), including decreased microglomerular density of mushroom bodies [220], symptoms of neurotoxicity [191], reduced fecundity in queens and males [41], and impaired immune response [221], among other issues that challenge the sustainability and survival of colonies [43]. Memory issues in bees have been linked to epigenetic changes, specifically in relation to histone acetylation [120] and DNAm [222]. There is also evidence that exposure to neonicotinoids has global DNA methylation effects on honeybees [119].

Evidence suggests that CCD is related to the emergence of neonicotinoids and their massive use in agriculture [120]. This would be mainly due to the previously described sub-lethal effects of pesticides [41,43,221], which impair the proper functioning of colonies, leading to their ultimate collapse [48,216,220,223].

Ongoing studies are being conducted to understand how to counteract the detrimental effects of neonicotinoids, with sodium butyrate as a possible candidate antidote to the epigenetic modifications experienced by bees exposed to neonicotinoids [120,216]. This kind of research is of high importance due to the menace that declining numbers of bees and other flying insects represent for all kinds of ecosystems and for human survival [15,224]. Despite all of these problems detected in different non-target organisms, the use of neonicotinoids is currently poorly regulated, especially in developing countries [205].

6. The Link between Insect EMMs and Current Loss of Biodiversity

Organisms around the globe are currently experiencing emerging pressures that threaten their survival and are causing the extinction of an unprecedented number of species in a short span of time [28,30]. Insects are being seriously affected by these pressures and their numbers are declining quickly [15], while we can hardly quantify the losses due to the incompleteness of the available information [176].

The main drivers of the global environmental crisis have been classified as “planetary boundaries” or safe operational limits within which the perpetuation of humanity is feasible [225]. Global biodiversity decline is one of the most worrisome limits [224]. The loss of biodiversity has been linked to other planetary boundaries such as climate change, pollution, alteration of biogeochemical cycles, and habitat loss and degradation [45,89]. This last means that habitat quality decrease, for instance, due to fragmentation (i.e., increasing habitat isolation) [29]. These drivers are deeply interdependent and are the main reasons behind the visible reduction in biodiversity that affects our planet. Their interactions and effects are of utmost scientific interest, since most species are threatened by a combination of these and other planetary boundaries instead of the alteration of a single one [224].

The increased weather volatility brought about by climate change [226] and its effects are now felt in a wide variety of ecosystems [31,227,228]. There is evidence from previous extinction events that high-frequency fluctuations in mean temperatures and even in geological timescales may elevate the extinction rate in marine invertebrates compared with more stable periods [229]. Thus, the effects of climate change and increasing temperatures in both the upper and deep ocean [230] might have catastrophic results not only for marine biodiversity but also on terrestrial processes highly dependent on its stability [225].

Pollution directly decimates biodiversity not only due to its toxic effects on living organisms but also through the contamination of non-renewable natural resources such as soil and water. Pollution derived from the human productive industry has been stressed as the base of biodiversity loss [174,231]. These alterations are also linked to the dramatic alteration of biogeochemical cycles, mostly mediated by soil microorganisms and associated invertebrates [225]. Contamination leads to habitat loss, which is closely related to anthropogenic activities such as intensive agriculture, urban development, and other extractive activities that humans perform in order to thrive under the current economic paradigm [232]. Pesticides are an important factor in habitat loss, which affects the biology of non-target organisms [83,93,98,111,117,122] and/or behavior [105,116,127,233], with potentially lethal consequences [107,108,114].

Habitat fragmentation is caused by a wide array of anthropogenic activities such as intensive agricultural practices [29], with monocultures in huge portions of land affecting whole ecosystems [234], the process of urbanization [235,236] with the building of roads to connect cities that slash through habitats [237–239], and land and sea exploitation for the extraction of fossil fuels or minerals [240,241].

The decrease in habitat quality is deeply linked to the contamination derived from human activities [242,243] such as soil degradation by intensive agriculture and subsequent land abandonment [244,245]; extensive use of fertilizers and the associated nitrogen accumulation [29]; indiscriminate application of pesticides with direct and indirect effects on trophic chains [122,178,180,246]; pollution of soil [151,247], and nearby water bodies and streams [93, 98, 124, 188]; road building [237,238]; and inappropriate management of protected habitats [248].

The abovementioned drivers affect the resilience of the different ecosystems that are exposed to them, reducing the chances of recovery of biodiversity and its functional relations [29]. Different organisms react in a wide array of ways in response to these drivers. While some organisms perish, others are able to adapt through different strategies, which include EMMs [80,249]. In fact, EMMs may be key to the survival of entire species because they allow for fast responses to a changing environment, which may be fundamental for the survival of organisms [80,250].

As shown in Table 2, many studies have been performed in artificial [84, 89, 101, 125] and natural [91,94,122] aquatic settings to emulate scenarios of water pollution. This kind of study is vital in order to gauge the impact of the presence and application of chemicals in the environment. Since aquatic insects are routinely used as bioindicators of the toxicity of different chemicals [98], it is not surprising that interest in their epigenetic responses to harmful stimuli has grown recently [11,84,85].

As previously mentioned, the response of an insect to pesticide exposure depends on the amount of chemical involved [83,134]. The chemical behavior of pesticides in the environment as well as their inaccurate application often lead to the development of resistance in target organisms or even to hormetic responses [115,116,208]. These adaptive mechanisms include epigenetic changes that allow organisms to modify biological processes via changes in gene expression [83]. It has been proposed that new formulations of pesticides should consider their potential epigenetic effects in order to increase their effectiveness and to reduce the damage to non-target species [44,45,80]. The use of insect EMMs has also been proposed as a promising venue for the development of methods to ameliorate the negative effects of pesticides once considered "safe". One example of this approach is the application of histone deacetylase inhibition treatment in order to restore learning abilities in honey bees with memory impairment caused by neonicotinoid exposure [120].

While the effects of pesticides on non-target organisms have been widely studied [148], to our knowledge, a direct comparison between a native versus an introduced species in order to assess whether there are differences in their responses towards a specific pesticide has not been made (Table 2). A few studies have been conducted in bees [251] and ants [251]. In these evaluations, contrasts have been shown on how pesticides affect native and introduced species, suggesting that while native species suffer mostly detrimental effects, pests are capable of developing resistance with sub-lethal exposures. These trends stress the need for further research on this subject, especially the relation between pesticides

and EMMs, as these links may hold the key for these contrasting responses to stress derived from agrochemicals. This would allow for better understanding of the potential damage that pesticides may inflict in ecosystems and helps manufacturers produce more precise pesticides that inflict less environmental damage [253].

We must reiterate the importance of investigating EMMs involved in the responses of insects towards pesticide exposure. As shown in Table 1, to the best of our knowledge, there are at least three main processes described as EMMs. Thus far, insect EMMs triggered in relation to the exposure of environmental toxicants are mainly DNAm and RNA-based mechanisms, while in vertebrates, it has been shown that histone alterations can also be triggered due to pesticide exposure. This has been found in rats exposed to the pesticide Dichlorodiphenyltrichloroethane, DDT [254]. These differences may be due to the nature of these particular EMMs and the biases towards the study of vertebrates as a proxy for human health. Nonetheless, considering that the abovementioned evidences showing that histone deacetylase inhibitors are capable of upregulating memory-related genes in IMI memory-damaged bees [119], it is possible to suggest a key role of post-translational processes in relation to insect epigenetic responses facing the exposure to toxicant stress. Despite this, it is also probable that there is a lack of studies on other species besides canonical model organisms and ecological contexts involved in insect epigenetic responses towards toxicants. This scenario emphasizes the need for further research on this topic both from applied and basic points of view.

The actual complexity of the relationship between inheritance, environmental cues, and their phenotypic consequences found in different systems (including insects) allows us to recognize that EMMs contribute to the systemic regulation and stabilization properties of living organisms [255]. Understanding the biological mechanisms involved in insect epigenetic responses towards agrochemicals, what stage of insect ontogeny it affects, and what type of disturbances or compensations are triggered in its features is fundamental to assessing the impact of pesticides in insects (native, managed, and pest species). This may hold the key to reducing the damage of pesticides to non-target species and thus helps in the fight against the current global decline in biodiversity [45,83].

7. Conclusions

In a rapidly changing world with several planetary boundaries near collapse [225], the consideration of the role of EMMs in the context of insect exposure to varied and abundant human-derived stressors (such as pesticides) may be relevant to prevent further population declines in wild insect species. This understanding also helps to prevent the development of pesticide resistance in pests and introduced species that should be controlled [83]. Intensified schemes of agricultural production have been shown to be the main contributors to biodiversity decline globally, including the demise of pollinating insects [256–259]. In particular, pesticide use is one of the main factors responsible for the decimation of managed as well as native pollinators [135,157,260].

By studying insect EMMs in response to stressors both in the wild and in agriculturally managed ecosystems, it becomes possible to understand why some species can adapt rapidly while others perish. As we have shown here, there is strong evidence that supports the thesis that responses involving EMMs should be considered in the formulation and testing of new pesticides as well as in the search for more sustainable and ecologically minded alternatives. These new developments may be fundamental to understanding the biological responses of affected organisms to control measures and may provide tools to avoid formulations that have proven detrimental effects on ecosystems [44,45,80]. New knowledge and technology developed based on EMMs in insects may allow us to find ways to ameliorate the consequences of pollinator exposure to pesticides. Promising results have been shown in honeybee memory repair through treatments involving EMMs [120]. A better understanding of EMMs in insects could be an important resource in the fight against the loss of biodiversity that we currently face in what has been called the sixth mass extinction [28,32,240,261].

8. Further Remarks

The epigenetic effects found in insects due to pesticide exposure should be “the canary in the coal mine” for the consequences of contamination on our own species and a source of development for novel technologies to allow us to have a more sustainable relationship with biodiversity. The chemical behavior of different pesticides demonstrates that it is almost impossible to control the contamination of soil and water sources, and the exposure of non-target organisms to the current toxic formulations [161, 165, 171]. This pollution may affect vulnerable native and endemic species, where EMMs are found to be associated with stress and abnormal functioning in insects. To worsen the situation, among non-target organisms, it is possible to find undesired pest and invasive insects, where EMMs lead to the development of tolerance and resistance against pesticides. There is evidence for the role of EMMs in the development of resistance towards pesticides. This has been demonstrated in insects with aquatic immature stages such as mosquitoes [11].

Thus, a change towards a better understanding of insect epigenetics as well as the application of agroecological approaches promoting sustainable agriculture is a must [54,205,262]). Future evidence of EMM-related changes in insects exposed to pesticides may serve as bioindicators of potentially dangerous levels of exposure to contamination in our own species. This is another promising venue of research in relation to EMMs in insects and their effects in response to anthropogenically derived contamination.

References

1. Burggren W. Epigenetic Inheritance and its Role in Evolutionary Biology: Re-evaluation and New Perspectives. *Biology*. **2016**, 5, 24.
2. Mukherjee K, Twyman RM, Vilcinskis A. Insects as Models to Study the Epigenetic Basis of Disease. *Prog. In Bioph. and Mol. Biol.* **2015**,118,69-78.
3. Ware GW. Effects of Pesticides on Nontarget Organisms. In *Residue Reviews* 1980 (pp. 173-201). Springer, New York, NY.
4. Bird A. Perceptions of Epigenetics. *Nature*. **2007**, 447,396.
5. Jablonka, E., & Lamb, M. J. Evolution in Four Dimensions: Genetic, Epigenetic, Behavioral, and Symbolic Variation in the History of Life, Vol. 5. 1st Edition. MIT Press: Cambridge, Massachusetts. USA, **2005**.
6. Jaenisch, R., & Bird, A. Epigenetic Regulation of Gene Expression: How the Genome Integrates Intrinsic and Environmental signals. *Nat. Gen.* **2003**, 33, 245.
7. Glastad KM, Hunt BG, Goodisman MA. Epigenetics in Insects: Genome Regulation and the Generation of Phenotypic Diversity. *Ann. Rev. of Ent.* **2019**, 64, 185-203.
8. Berens AJ, Hunt JH, Toth AL. Nourishment Level Affects Caste-related Gene Expression in *Polistes* wasps. *BMC Gen.* **2015**,16,1-2.
9. Patalano S, Hore TA, Reik W, Sumner S. Shifting Behaviour: Epigenetic Reprogramming in Eusocial Insects. *Curr. Op. Cell Biol.* **2012**,24,367-73.
10. Kavi LA, Kaufman PE, Scott JG. Genetics and Mechanisms of Imidacloprid Resistance in House flies. *Pest. Biochem. Physiol.* **2014**,109,64-69.
11. Oppold A, Kress A, Bussche JV, Diogo JB, Kuch U, Oehlmann J, Vandegehuchte MB, Müller R. Epigenetic Alterations and Decreasing Insecticide Sensitivity of the Asian Tiger Mosquito *Aedes albopictus*. *Ecotox. and Environ. Safety.* **2015**,122,45-53.
12. Feldhaar H, Otti O. Pollutants and Their Interaction with Diseases of Social Hymenoptera. *Insects.* 2020,11,153.
13. Ardura A, Clusa L, Zaiko A, Garcia-Vazquez E, Miralles L. Stress Related Epigenetic Changes May Explain Opportunistic Success in Biological Invasions in Antipode mussels. *Scien. Rep.* **2018**,8,1-10.
14. Hallmann CA, Sorg M, Jongejans E, Siepel H, Hofland N, Schwan H, Stenmans W, Müller A, Sumser H, Hörren T, Goulson D. More than 75 Percent Decline Over 27 Years in Total Flying Insect Biomass in Protected Areas. *PloS One.* **2017**,12, e0185809.
15. Cardoso P, Barton PS, Birkhofer K, Chichorro F, Deacon C, Fartmann T, Fukushima CS, Gaigher R, Habel JC, Hallmann CA, Hill MJ. Scientists' Warning to Humanity on Insect Extinctions. *Biol. Conserv.* **2020**,242,108426.
16. Van der Sluijs JP. Insect Decline, an Emerging Global Environmental Risk. *Curr. Op. in Environ. Sust.* **2020**.
17. Pearson MM. Phase Variation of the mrp Fimbrial Promoter. In *Proteus mirabilis Humana*, New York, NY, USA. **2019**; pp. 121-127.
18. Frandi A, Collier J. Multilayered Control of Chromosome Replication in *Caulobacter crescentus*. *Biochem. Soc. Trans.* **2019**, 47,187-96.
19. Skinner MK, Nilsson E, Sadler-Riggelman I, Beck D, Ben Maamar M, McCarrey JR. Transgenerational Sperm DNA Methylation Epimutation Developmental Origins Following Ancestral Vinclozolin Exposure. *Epigenetics.* **2019**,14,721-39.
20. House M, Lukens L. The Role of Germinally Inherited Epialleles in Plant Breeding: An Update. In *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications*, Springer: Cham, Germany, **2019**; pp. 115-128.
21. Tucci V, Isles AR, Kelsey G, Ferguson-Smith AC, Erice Imprinting Group. Genomic Imprinting and Physiological Processes in Mammals. *Cell.* **2019**, 176, 952-65.
22. Di Felice F, Egidi A, D'Alfonso A, Camilloni G. Fob1p recruits DNA Topoisomerase I to Ribosomal Genes Locus and Contributes to its Transcriptional Silencing Maintenance. *Int. Jour. Biochem. & Cell Biol.* **2019**,110,143-148.
23. Żylicz JJ, Bousard A, Žumer K, Dossin F, Mohammad E, da Rocha ST, Schwalb B, Syx L, Dingli F, Loew D, Cramer P. The Implication of Early Chromatin Changes in X Chromosome Inactivation. *Cell.* **2019**,176,182-97.
24. Shevchenko AI, Dementyeva EV, Zakharova IS, Zakian SM. Diverse Developmental Strategies of X Chromosome Dosage Compensation in Eutherian Mammals. *Int. Jour. of Dev. Biol.* **2019**, 63,223-33.
25. Zhong P, Li J, Luo L, Zhao Z, Tian Z. TOP1 α Regulates FLOWERING LOCUS C Expression by Coupling Histone Modification and Transcription Machinery. *Development.* **2019**,146,4.
26. Posner R, Toker IA, Antonova O, Star E, Anava S, Azmon E, Hendricks M, Bracha S, Gingold H, Rechavi O. Neuronal Small RNAs Control Behavior Transgenerationally. *Cell.* **2019**,177,1814-26.
27. Dupont C, Kappeler L, Saget S, Grandjean V, Lévy R. Role of miRNA in the Transmission of Metabolic Diseases Associated with Paternal Diet-induced Obesity. *Front. Gen.* **2019**, 10,337.

28. Ceballos G, Ehrlich PR, Raven PH. Vertebrates on the Brink s Indicators of Biological Annihilation and the Sixth Mass Extinction. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* **2020**, *117*, 13596-13602, doi:10.1073/pnas.1922686117.
29. Habel JC, Samways MJ, Schmitt T. Mitigating the Precipitous Decline of Terrestrial European Insects: Requirements for a New Strategy. *Biod. Conserv.* **2019**, *28*,1343-1360.
30. Ceballos G, Ehrlich PR, Dirzo R. Biological Annihilation Via the Ongoing Sixth Mass Extinction Signaled by Vertebrate Population Losses and Declines. *Proc. Natl. Ac. Sci.* **2017**,*114*,E6089-96.
31. Giersch JJ, Hotaling S, Kovach RP, Jones LA, Muhlfield CC. Climate-Induced Glacier and Snow Loss Imperils Alpine Stream Insects. *Glob. Ch. Biol.* **2017**, *23*,2577-2589.
32. Barnosky AD, Matzke N, Tomiya S, Wogan GO, Swartz B, Quental TB, Marshall C, McGuire JL, Lindsey EL, Maguire KC, Mersey B. Has the Earth's Sixth Mass Extinction Already Arrived? *Nature.* **2011**,*471*,51-57.
33. Kim KC. Biodiversity, Conservation and Inventory: Why Insects Matter. *Biod. Conserv.* **1993**, *2*,191-214.
34. Hamilton C, Gemenne F, Bonneuil C. Thinking the anthropocene. In *The Anthropocene and The Global Environmental Crisis: Rethinking Modernity In A New Epoch* Hamilton C, Bonneuil C, Gemenne F, Eds.; 1st Ed. Routledge: Abingdon, Oxon, UK, **2015**; pp. 1-13.
35. Rusiecki JA, Beane Freeman LE, Bonner MR, Alexander M, Chen L, Andreotti G, Barry KH, Moore LE, Byun HM, Kamel F, Alavanja M. High Pesticide Exposure Events and DNA Methylation Among Pesticide Applicators in The Agricultural Health Study. *Environ. Mol. Mut.* **2017**, *58*,19-29.
36. Morais S, Dias E, Pereira ML. Carbamates: human exposure and health effects. In *The Impact of Pesticides*; Academy Publication: London, UK, **2012**; pp. 21–38.
37. Requena-Mullor M, Navarro-Mena A, Wei R, López-Guarnido O, Lozano-Paniagua D, Alarcon-Rodriguez R. Evaluation of Gonadal Alterations in a Population Environmentally Exposed to a Mixture of Endocrine Active Pesticides. *Int. Jour. Environ. Res. Publ. Health.* **2021**,*18*,2355.
38. Ekroos J, Kleijn D, Batáry P, Albrecht M, Báldi A, Blüthgen N, Knop E, Kovács-Hostyánszki A, Smith HG. High Land-use Intensity in Grasslands Constrains Wild Bee Species Richness in Europe. *Biol. Conserv.* **2020**, *241*,108255.
39. Gallai N, Salles JM, Settele J, Vaissière BE. Economic Valuation of the Vulnerability of World Agriculture Confronted with Pollinator Decline. *Ecol. Econ.* **2009**,*68*,810-21.
40. Xider KM. Histopathological and Morphological Alterations in Salivary Gland of House Fly Induced by Oral Administration Thiamethoxam. *Kurd. Jour. Appl. Res.* **2018**,*3*, 40-4.
41. Bebane PS, Hunt BJ, Pegoraro M, Jones AC, Marshall H, Rosato E, Mallon EB. The Effects of the Neonicotinoid Imidacloprid on Gene Expression and DNA Methylation in the Buff-Tailed Bumblebee *Bombus terrestris*. *Proc. Royal Soc. B. Biol Sci.* **2019**, *286*,20190718.
42. Mao W, Schuler MA, Berenbaum MR. Honey Constituents Up-Regulate Detoxification and Immunity Genes in The Western Honey Bee *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Ac. Sci.* **2013**,*110*,8842-8846.
43. Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, McField M, Morrissey CA. Effects of Neonicotinoids and Fipronil on Non-Target Invertebrates. *Environ. Sci. Poll. Res.* **2015**, *22*,68-102.
44. Brevik K, Lindström L, McKay SD, Chen YH. Transgenerational Effects of Insecticides—Implications for Rapid Pest Evolution in Agroecosystems. *Curr. Op. Insect Sci.* **2018**, *26*,34-40.
45. Oppold AM, Müller R. Epigenetics: a hidden target of insecticides. *Adv. Insect Phys.* **2017**, *53*, 313-324.
46. Gressel J. Evolving Understanding of The Evolution of Herbicide Resistance. *Pest Man. Sci.* **2009**, *65*, 1164-73.
47. Chiron F, Chargé R, Julliard R, Jiguet F, Muratet A. Pesticide Doses, Landscape Structure and their Relative Effects on Farmland Birds. *Agr., Ecosyst. Environ.* **2014**, *185*,153-60.
48. Chensheng LU, Warchol KM, Callahan RA. In Situ Replication of Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Bull. Insect.* **2012**, *65*, 99-106.
49. Burdge GC, Lillycrop KA. Nutrition, Epigenetics, and Developmental Plasticity: Implications for Understanding Human Disease. *Ann. Rev. Nutr.* **2010**, *30*,315-39.
50. Feil R, Fraga MF. Epigenetics and The Environment: Emerging Patterns and Implications. *Nat. Rev. Gen.* **2012**, *13*, 97-109.
51. Laubach ZM, Perng W, Dolinoy DC, Faulk CD, Holekamp KE, Getty T. Epigenetics and the Maintenance of Developmental Plasticity: Extending the Signalling Theory Framework. *Biol. Rev.* **2018**, *93*,1323-1338.
52. Vidaki A, Daniel B, Court DS. Forensic DNA Methylation Profiling—Potential Opportunities and Challenges. *Foren. Sci. Int. Gen.* **2013**, *7*, 499-507.
53. Hunt BG, Glastad KM, Yi SV, Goodisman MA. The Function of Intragenic DNA Methylation: Insights From Insect Epigenomes. *Integr. Comp. Biol.* **2013**, *53*, 319–328, doi:10.1093/icb/ict003.
54. Villagra C, Frías-Lasserre D. Epigenetic Molecular Mechanisms in Insects. *Neot. Ent.* **2020**, *49*, 615-642.

55. Kim D, Thairu MW, Hansen AK. Novel Insights Into Insect-Microbe Interactions—Role of Epigenomics and Small Rnas. *Front. Plant Sci.* **2016**,7,1164.
56. Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, Yang Y, Yi C, Lindahl T, Pan T, Yang YG, He C. N 6-Methyladenosine in Nuclear RNA is a Major Substrate of the Obesity-Associated FTO. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 885-7.
57. Mattick JS, Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mehler MF. RNA Regulation of Epigenetic Processes. *Bioessays.* **2009**, 31,51-59.
58. Bushati N, Cohen SM. microRNA Functions. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **2007**,23,175-205.
59. Morales-Nebreda L, McLafferty FS, Singer BD. DNA Methylation as a Transcriptional Regulator of the Immune System. *Translational Research.* **2019**, 204:1-8.
60. Alavian-Ghavanini A, Rüegg J. Understanding Epigenetic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals: From Mechanisms to Novel Test Methods. *Bas. Cl. Pharm. & Tox.* **2018**, 122,38-45.
61. Modified Histone Antibodies. Available online: <https://www.cusabio.com/catalog-67-1.html> (Accessed on 12 of July 2020)
62. Koch MW, Metz LM, Kovalchuk O. Epigenetics and Mirnas in the Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis. *Trends Mol. Med.* **2013**, 19, 23-30.
63. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The Mammalian Epigenome. *Cell.* **2007**,128, 669-81.
64. Faulk C, Dolinoy DC. Timing is Everything: The When and How of Environmentally Induced Changes in the Epigenome of Animals. *Epigenetics.* **2011**, 6, 791-797.
65. Burggren WW. Epigenetics in Insects: Mechanisms, Phenotypes and Ecological and Evolutionary Implications. *Adv. Insect Phys.* **2017**, 53,1-30.
66. Kozeretska IA, Serga SV, Koliada AK, Vaiserman AM. Epigenetic Regulation of Longevity in Insects. *Adv. Insect Phys.* **2017**, 53, 87-114.
67. Youngson NA, Whitelaw E. Transgenerational Epigenetic Effects. *Ann. Rev. Gen. Human Gen.* **2008**, 9,233-57.
68. Tikhodeyev ON. The Mechanisms of Epigenetic Inheritance: How Diverse Are They? *Biol. Rev.* **2018**, 93,1987-2005.
69. Wang H, Liu Z, Wang Y, Ma L, Zhang W, Xu B. Genome-Wide Differential DNA Methylation in Reproductive, Morphological, and Visual System Differences Between Queen Bee and Worker Bee (*Apis mellifera*). *Front. Gen.* **2020**,11,770.
70. Gulati P, Kohli S, Narang A, Brahmachari V. A Comparative Analysis of Histone Methyltransferases and Demethylases in Insect Genome: A Meta-Analysis. *bioRxiv.* **2019**,598946.
71. Mukherjee K, Dubovskiy I, Grizanova E, Lehmann R, Vilcinskas A. Epigenetic Mechanisms Mediate the Experimental Evolution of Resistance Against Parasitic Fungi in the Greater Wax Moth *Galleria mellonella*. *Sci. Rep.* **2019**, 9,1-11.
72. Ney G, Schul J. Epigenetic and Genetic Variation Between Two Behaviorally Isolated Species of *Neoconocephalus* (Orthoptera: Tettigonoidea). *Jour. Orth. Res.* **2019**;28,11.
73. Lo N, Simpson SJ, Sword GA. Epigenetics and Developmental Plasticity in Orthopteroid Insects. *Curr. Op. Insect Sci.* **2018**,25,25-34.
74. Reynolds JA, Clark J, Diakoff SJ, Denlinger DL. Transcriptional Evidence for Small RNA Regulation of Pupal Diapause in the Flesh Fly, *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2013**,43,982-989.
75. Khosla S, Mendiratta G, Brahmachari V. Genomic Imprinting in the Mealybugs. *Cyt. Gen. Res.* **2006**,113,41-52.
76. Morandin C, Brendel VP, Sundström L, Helanterä H, Mikheyev AS. Changes in Gene DNA Methylation and Expression Networks Accompany Caste Specialization and Age-Related Physiological Changes in a Social Insect. *Mol. Ecol.* **2019**, 28,1975-1993.
77. Simola DF, Graham RJ, Brady CM, Enzmann BL, Desplan C, Ray A, Zwiebel LJ, Bonasio R, Reinberg D, Liebig J, Berger SL. Epigenetic (Re) Programming of Caste-Specific Behavior in the Ant *Camponotus floridanus*. *Science.* **2016**, 351,6268, doi:10.1126/science.aac6633.
78. Arsenault SV, Hunt BG, Rehan SM. The Effect of Maternal Care on Gene Expression and DNA Methylation in a Subsocial Bee. *Nat. Com.* **2018**,9,1-9.
79. Richard G, Le Trionnaire G, Danchin E, Sentis A. Epigenetics and Insect Polyphenism: Mechanisms and Climate Change Impacts. *Curr. Op. Insect Sci.* **2019**, 35,138-45.
80. Chatterjee N, Gim J, Choi J. Epigenetic Profiling to Environmental Stressors in Model and Non-Model Organisms: Ecotoxicology Perspective. *Environ. Health Tox.* **2018**, 33,3.
81. Brevik K, Bueno EM, McKay S, Schoville SD, Chen YH. Insecticide Exposure Affects Intergenerational Patterns of DNA Methylation in the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Evol. Appl.* **2021**, 14, 1-12.
82. Seebacher F, Krause J. Epigenetics Of Social Behaviour. *Trends Ecol. Evol.* **2019**, 34,818-30.

83. Bantz A, Camon J, Froger JA, Goven D, Raymond V. Exposure to Sublethal Doses of Insecticide and their Effects on Insects at Cellular and Physiological Levels. *Curr. Op. Insect Sci.* **2018**,30:73-8.
84. Jeanrenaud AC, Brooke BD, Oliver S. Larval Metal Pollutant Exposure Alters the Epigenetic Architecture of the Major Malaria Vector *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae). *Res. Sq.* 2020, doi:10.21203/rs.3.rs-49568/v1.
85. Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. The Endocrine Disruptor Bisphenol a Increases the Expression of HSP70 and Ecdysone Receptor Genes in the Aquatic Larvae of *Chironomus riparius*. *Chemosphere.* **2008**, 7, 1870-1876.
86. Roelofs D, Janssens TK, Timmermans MJ, Nota B, Marien J, Bochdanovits Z, Ylstra B, Van Straalen NM. Adaptive Differences in Gene Expression Associated with Heavy Metal Tolerance in the Soil Arthropod *Orchesella cincta*. *Mol. Ecol.* **2009**, 18, 3227-3239.
87. Gintenreiter S, Ortel J, Nopp HJ. Effects of Different Dietary Levels of Cadmium, Lead, Copper, and Zinc on the Vitality of the Forest Pest Insect *Lymantria dispar* L.(Lymantriidae, Lepid). *Arch. Environ. Cont. Tox.* **1993**, 25,62-66.
88. Dai TM, Lü ZC, Liu WX, Wan FH, Hong XY. The Homology Gene *Btdnmt1* is Essential for Temperature Tolerance in Invasive *Bemisia Tabaci* Mediterranean Cryptic Species. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 1-11.
89. Rayms-Keller A, McGaw M, Oray C, Carlson JO, Beaty BJ. Molecular Cloning and Characterization of a Metal Responsive *Aedes Aegypti* Intestinal Mucin Cdna. *Insect Mol. Biol.* **2000**, 9,419-26.
90. Raes H, Braeckman BP, Criel GR, Rzeznik U, Vanfleteren JR. Copper Induces Apoptosis in *Aedes C6/36* Cells. *Jour. Exp. Zool.* **2000**,286,1-2.
91. Carlisle DM, Clements WH. Growth and Secondary Production of Aquatic Insects Along a Gradient of Zn Contamination in Rocky Mountain Streams. *Jour. North Am. Benth. Soc.* **2003**, 22, 582-597.
92. Wu Z, Du Y, Xue H, Wu Y, Zhou B. Aluminum Induces Neurodegeneration and its Toxicity Arises from Increased Iron Accumulation and Reactive Oxygen Species (ROS) Production. *Neur. Aging.* **2012**, 33,199-e1.
93. Hitchcock SW. *Field And Laboratory Studies Of DDT And Aquatic Insects*. Connecticut Agricultural Experiment Station: New Haven, CT, USA, **1965**.
94. Moyer WC, Luckmann WH. Fluctuations in Populations of Certain Aquatic Insects Following Application of Aldrin Granules to Sugar Creek, Iroquois County, Illinois. *Jour. Econ. Ent.* **1964**, 57,318-322.
95. Gupta AP, Sutherland DJ. Effects of Sublethal Doses of Chlordane on the Hemocytes and Midgut Epithelium of *Periplaneta americana*. *Ann. Ent. Soc. Am.* **1968**,61,910-918.
96. Wafford KA, Sattelle DB, Gant DB, Eldefrawi AT, Eldefrawi ME. Noncompetitive Inhibition of GABA Receptors in Insect and Vertebrate CNS By Endrin and Lindane. *Pest. Biochem. Physiol.* **1989**, 33,213-219.
97. Lummis SC, Buckingham SD, Rauh JJ, Sattelle DB. Blocking Actions of Heptachlor at an Insect Central Nervous System GABA Receptor. *Proc. Royal Soc. London. B.* **1990**, 240, 97-106.
98. Maund SJ, Peither A, Taylor EJ, Jüttner I, Beyerle-Pfnür R, Lay JP, Pascoe D. Toxicity of Lindane to Freshwater Insect Larvae in Compartments of an Experimental Pond. *Ecotox. Environ. Saf.* **1992**, 23,76-88.
99. Matsumura F, Hogendijk CJ. Insect Resistance to Insecticides, Enzymatic Degradation of Parathion in Organophosphate-Susceptible and-Resistant Houseflies. *Jour. Agri. Food Chem.* **1964**,12,447-453.
100. Krueger HR, O'brien RD. Relationship Between Metabolism and Differential Toxicity of Malathion in Insects and Mice. *Jour. Econ. Ent.* **1959**, 52,1063-1067.
101. Magbanua FS, Townsend CR, Hageman KJ, Piggott JJ, Matthaei CD. Individual and Combined Effects of Fine Sediment and Glyphosate Herbicide on Invertebrate Drift and Insect Emergence: A Stream Mesocosm Experiment. *Fresh. Sci.* **2016**,35,139-151.
102. Hamm RL, Kaufman PE, Reasor CA, Rutz DA, Scott JG. Resistance to cyfluthrin and tetrachlorvinphos in the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*, collected from the eastern United States. *Pest Man. Sci.* **2006**,62,673-677.
103. Kristensen M, Knorr M, Spencer AG, Jespersen JB. Selection and Reversion of Azamethiphos-Resistance in a Field Population of the Housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), and the Underlying Biochemical Mechanisms. *Jour. Econ. Ent.* **2000**, 93,1788-1795.
104. Alston DG, Tepedino VJ, Bradley BA, Toler TR, Griswold TL, Messinger SM. Effects of the Insecticide Phosmet on Solitary Bee Foraging and Nesting in Orchards of Capitol Reef National Park, Utah. *Environ. Ent.* **2007**, 36,811-6.
105. Chernaki-Leffer AM, Sosa-Gómez DR, Almeida LM, Lopes ID. Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* (Panzer)(Coleoptera, Tenebrionidae) to Cypermethrin, Dichlorvos and Triflumuron in Southern Brazil. *Rev. Bras. Ent.* **2011**,55,125-8.

106. Jales JT, de Moura Barbosa T, Dos Santos LC, Rachetti VD, Gama RA. Carrion Decomposition and Assemblage of Necrophagous Dipterans Associated with Terbufos (Organophosphate) Intoxicated Rat Carcasses. *Act. Trop.* **2020**, *212*,105652.
107. Eldefrawi ME, Hoskins WM. Relation of the Rate of Penetration and Metabolism to the Toxicity of Sevin to Three Insect Species. *Jour. Econ. Ent.* **1961**, *54*,401-405.
108. Davis JW, Cowan Jr CB. Field Evaluation of Three Formulations of Aldicarb for Control of Cotton Insects. *Jour. Econ. Ent.* **1972**, *65*,231-232.
109. Spurr Jr HW, Sousa AA. Potential Interactions of Aldicarb and its Metabolites on Nontarget Organisms in the Environment. *Jour. Environ. Qual.* **1974**, *3*,130-133.
110. Ball HJ, Su PP. Effect of Sublethal Dosages of Carbofuran and Carbaryl on Fecundity and Longevity of the Female Western Corn Rootworm. *Jour. Econ. Ent.* **1979**, *72*, 873-876.
111. Gammon DW. Neural Effects of Allethrin on the Free Walking Cockroach *Periplaneta americana*: An Investigation Using Defined Doses At 15 and 32 C. *Pest. Sci.* **1978**, *9*,79-91.
112. Dai PL, Wang Q, Sun JH, Liu F, Wang X, Wu YY, Zhou T. Effects of Sublethal Concentrations of Bifenthrin and Deltamethrin on Fecundity, Growth, and Development of the Honeybee *Apis mellifera ligustica*. *Environ. Tox. Chem.* **2010**, *29*, 644-649.
113. Nadda G, Saxena PN, Srivastava G. Effects of Sublethal Doses of Beta-Cyfluthrin on Mutant *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Appl. Ent. Zool.* **2005**, *40*, 265-271.
114. Saha S, Kaviraj A. Acute Toxicity of Synthetic Pyrethroid Cypermethrin to Some Freshwater Organisms. *Bull. Environ. Cont. and Tox.* **2008**, *80*, 49-52.
115. Schleier JJ, Peterson RK. Toxicity and Risk of Permethrin and Naled to Non-Target Insects after Adult Mosquito Management. *Ecotoxicology.* **2010**, *19*,1140-1146.
116. Oberhauser KS, Manweiler SA, Lelich R, Blank M, Batalden RV, De Anda A. Impacts of Ultra-Low Volume Resmethrin Applications on Non-Target Insects. *Jour. Amer. Mosqu. Contr. Assoc.* **2009**, *25*,83-93.
117. Britch SC, Linthicum KJ, Kline DL, Aldridge RL, Golden FV, Wittie J, Henke J, Hung K, Gutierrez A, Snelling M, Lora C. Transfluthrin Spatial Repellent on US Military Materials Reduces *Culex tarsalis* Incursion in a Desert Environment. *Jour. Amer. Mosqu. Contr. Assoc.* **2020**,*36*,37-42.
118. Abdel-Haleem DR, Genidy NA, Fahmy AR, Azm AE, Fatma SM, Ismail NS. Comparative Modelling, Toxicological and Biochemical Studies of Imidacloprid and Thiamethoxam Insecticides on the house fly, *Musca domestica* L.(Diptera: Muscidae). *Egyp. Acad. Jour. Biol. Sci. A, Ent.* **2018**,*11*,33-42.
119. Paleolog J, Wilde J, Siuda M, Bąk B, Wójcik Ł, Strachecka A. Imidacloprid Markedly Affects Hemolymph Proteolysis, Biomarkers, DNA Global Methylation, and the Cuticle Proteolytic Layer in Western Honeybees. *Apidologie* **2020**, *51*, 620–630, doi:10.1007/s13592-020-00747-4.
120. Hu YT, Tang CK, Wu CP, Wu PC, Yang EC, Tai CC, Wu YL. Histone Deacetylase Inhibitor Treatment Restores Memory-Related Gene Expression and Learning Ability in Neonicotinoid-Treated *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* **2018**, *27*, 512-521.
121. El Hassani AK, Dacher M, Gary V, Lambin M, Gauthier M, Armengaud C. Effects of Sublethal Doses of Acetamiprid and Thiamethoxam on the Behavior of the Honeybee (*Apis mellifera*). *Arch. Environ. Cont. Tox.* **2008**,*54*,653-61.
122. Maloney EM, Liber K, Headley JV, Peru KM, Morrissey CA. Neonicotinoid Insecticide Mixtures: Evaluation Of Laboratory-Based Toxicity Predictions Under Semi-Controlled Field Conditions. *Environ. Poll.* **2018**, *243*, 1727-1739.
123. Liang P, Tian YA, Biondi A, Desneux N, Gao XW. Short-Term and Transgenerational Effects of the Neonicotinoid Nitenpyram on Susceptibility to Insecticides in Two Whitefly Species. *Ecotoxicology.* **2012**, *21*,1889-1898.
124. Beketov MA, Liess M. Acute and Delayed Effects of the Neonicotinoid Insecticide Thiacloprid on Seven Freshwater Arthropods. *Environ. Tox. Chem.* **2008**, *27*, 461-470.
125. Kobashi K, Harada T, Adachi Y, Mori M, Ihara M, Hayasaka D. Comparative Ecotoxicity of Imidacloprid and Dinotefuran to Aquatic Insects In Rice Mesocosms. *Ecotox. Environ. Saf.* **2017**, *138*,122-129.
126. Martínez-Paz P, Morales M, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. Genotoxic Effects of Environmental Endocrine Disruptors on the Aquatic Insect *Chironomus riparius* Evaluated Using the Comet Assay. *Mut. Res./ Gen. Tox. Environ. Mut.* **2013**, *758*, 41-47.
127. Morales M, Martínez-Paz P, Martín R, Planelló R, Urien J, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. Transcriptional Changes Induced by *In Vivo* Exposure to Pentachlorophenol (PCP) in *Chironomus riparius* (Diptera) Aquatic Larvae. *Aqu. Toxicol.* **2014**,*157*:1-9.

128. Planelló R, Herrero O, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. Comparative Effects of Butyl Benzyl Phthalate (BBP) and Di (2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) on the Aquatic Larvae of *Chironomus riparius* Based on Gene Expression Assays Related to the Endocrine System, the Stress Response and Ribosomes. *Aqu. Toxicol.* **2011**, *105*,62-70.
129. Park K, Kwak IS. Characterization of Heat Shock Protein 40 and 90 in *Chironomus Riparius* Larvae: Effects of Di (2-ethylhexyl) Phthalate Exposure on Gene Expressions and Mouthpart Deformities. *Chemosphere.* **2008**, *74*, 89-95.
130. Bovier TF, Rossi S, Mita DG, Digilio FA. Effects of the Synthetic Estrogen 17-A-Ethinylestradiol on *Drosophila melanogaster*: Dose and Gender Dependence. *Ecotox. Environ. Saf.* **2018**, *162*,625-632.
131. Unni BG, Peck KE, Pytel MM, Dahm KH, Bhaskaran G, Singh HR, Kakoty Y, Devi B, Wann SB. Dimethyl Sulphoxide Inhibits *In Vitro* Synthesis of Juvenile Hormone I and II and Stimulates Juvenile Hormone III by *corpora allata* of Insects. *Curr. Sci.* **2009**, 1114-1119.
132. Al-Jaibachi R, Cuthbert RN, Callaghan A. Up and Away: Ontogenic Transference as a Pathway for Aerial Dispersal of Microplastics. *Biol. Lett.* **2018**, *14*, 20180479.
133. Akindele EO, Ehlers SM, Koop JH. Freshwater Insects of Different Feeding Guilds Ingest Microplastics in Two Gulf of Guinea Tributaries in Nigeria. *Environ. Sci. Poll. Res.* **2020**, *27*, 33373-33379.
134. Desneux N, Rafalimanana H, Kaiser L. Dose-Response Relationship in Lethal and Behavioural Effects of Different Insecticides on the Parasitic Wasp *Aphidius ervi*. *Chemosphere.* **2004**, *54*,619-27.
135. Tosi S, Nieh JC. Lethal and Sublethal Synergistic Effects of a New Systemic Pesticide, flupyradifurone (Sivanto®), on Honeybees. *Proc. Royal Soc. B.* **2019**, *286*,20190433.
136. Haynes KF. Sublethal Effects of Neurotoxic Insecticides on Insect Behavior. *Ann. Rev. Ent.* **1988**, *33*,149-68.
137. Colin T, Meikle WG, Wu X, Barron AB. Traces of a Neonicotinoid Induce Precocious Foraging and Reduce Foraging Performance in Honey Bees. *Environ. Sci. & Tech.* **2019**, *53*, 8252-8261.
138. Stanley J, Preetha G. Pesticide Toxicity To Arthropod Predators: Exposure, Toxicity And Risk Assessment Methodologies. In *Pesticide Toxicity To Non-Target Organisms*, Stanley, J., Preetha, G., Stanley. Eds; Springer, Dordrecht, Netherlands, **2016**; pp. 1-98.
139. Müller T, Römer CI, Müller C. Parental Sublethal Insecticide Exposure Prolongs Mating Response and Decreases Reproductive Output in Offspring. *Jour. Appl. Ecol.* **2019**, *56*,1528-1537.
140. Collotta M, Bertazzi PA, Bollati V. Epigenetics and Pesticides. *Toxicology.* **2013**, *307*, 35-41.
141. Hardstone MC, Scott JG. Is *Apis mellifera* More Sensitive to Insecticides Than Other Insects? *Pest Man. Sci.* **2010**, *66*,1171-1180
142. Picó Y, Alvarez-Ruiz R, Alfarhan AH, El-Sheikh MA, Alshahrani HO, Barceló D. Pharmaceuticals, Pesticides, Personal Care Products and Microplastics Contamination Assessment of Al-Hassa Irrigation Network (Saudi Arabia) and Its Shallow Lakes. *Sci. Tot. Environ.* **2020**, *701*,135021.
143. Caceres-Jensen L, Rodríguez-Becerra J, Sierra-Rosales P, Escudey M, Valdebenito J, Neira-Albornoz A, Dominguez-Vera V, Villagra CA. Electrochemical Method to Study the Environmental Behavior of Glyphosate on Volcanic Soils: Proposal of Adsorption-Desorption and Transport Mechanisms. *Jour. Haz. Mat.* **2019**, *379*,120746.
144. Caceres-Jensen LC, Rodríguez-Becerra J, Escudey M. Impact of Physical/Chemical Properties of Volcanic Ash-Derived Soils on Mechanisms Involved During Sorption of Ionisable and Non-Ionisable Herbicides. In *Advanced Sorption Process Applications*, IntechOpen, Rijeka, Croatia. **2018**.
145. Augustyniak M, Plachetka-Božek A, Kafel A, Babczyńska A, Tarnawska M, Janiak A, Loba A, Dziewięcka M, Karpeta-Kaczmarek J, Zawisza-Raszka A. Phenotypic Plasticity, Epigenetic or Genetic Modifications in Relation to the Duration of Cd-Exposure Within a Microevolution Time Range in the Beet Armyworm. *PLoS One.* **2016**, *11*,e0167371.
146. Jadiya P, Nazir A. Environmental Toxicants as Extrinsic Epigenetic Factors for Parkinsonism: Studies Employing Transgenic *C. Elegans* Model. *CNS & Neuro. Disor-Drug Targ.* **2012**, *11*,976-983.
147. Colosio, C., Rubino, F.M., Moretto, A., Pesticides, In *International Encyclopedia of Public Health*. 2nd edition, SR Quah Ed., 2nd Ed., Academic Press: New York, NY, USA, **2016**; pp. 454-462.
148. Mužinić V, Želježić D. Non-Target Toxicity of Novel Insecticides. *Arch. Indust. Hyg. Tox.* **2018**, *69*,86-102.
149. Darvas B, Polgar LA. Novel-Type Insecticides: Specificity and Effects on Non-Target Organisms. In *Insecticides with Novel Modes of Action*, Ishaaya, I., Horowitz, A. R., Eds., Springer: Berlin, Germany, **1998**; pp. 188-259.
150. Smith CJ, Perfetti TA. A Comparison of The Persistence, Toxicity, and Exposure to High-Volume Natural Plant-Derived and Synthetic Pesticides. *Tox. Res. Appl.* **2020**, *4*,2397847320940561.
151. Zahm SH, Ward MH. Pesticides and Childhood Cancer. *Environ. Health Persp.* **1998**, *106*,893-908.

152. Howe CM, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Werry K, Veldhoen N. Toxicity of Glyphosate-Based Pesticides to Four North American Frog Species. *Environ. Tox. Chem.* **2004**,23,1928-38.
153. Isenring R. Pesticides Reduce Biodiversity. *Pest. News.* **2010**,88,4-7.
154. Lerro CC, Freeman LE, DellaValle CT, Andreotti G, Hofmann JN, Koutros S, Parks CG, Shrestha S, Alavanja MC, Blair A, Lubin JH. Pesticide Exposure and Incident Thyroid Cancer Among Male Pesticide Applicators in Agricultural Health Study. *Environ. Int.* **2021**, 146,106187.
155. Seide VE, Bernardes RC, Pereira EJ, Lima MA. Glyphosate is Lethal and Cry Toxins Alter the Development of the Stingless Bee *Melipona quadrifasciata*. *Environ. Poll.* **2018**, 243,1854-1860.
156. Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* **2007**, 52,81-106.
157. Tasei JN. Impact of Agrochemicals on Non-Apis bees. Honey bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals. Taylor & Francis Group: Abingdon, UK, **2002**; pp. 101–131.
158. Hoshi N. Adverse Effects of Pesticides on Regional Biodiversity and Their Mechanisms. In *Risks and Regulation of New Technologies*, T Matsuda, J Wolff, T Tanagawa, Eds, Springer: Singapore, **2021**; pp. 235-247.
159. Gill RJ, Raine NE. Chronic Impairment of Bumblebee Natural Foraging Behaviour Induced by Sublethal Pesticide Exposure. *Funct. Ecol.* **2014**, 28,1459-71.
160. Atwood, D., Paisley-Jones, C. Pesticides industry sales and usage 2008-2012 market estimates. US EPA, Washington, DC. **2017**.
161. Caceres-Jensen L, Neira-Albornoz A, Escudey M. Herbicides Mechanisms Involved In The Sorption Kinetic Of Ionisable And Non Ionisable Herbicides: Impact of Physical/Chemical Properties Of Soils And Experimental Conditions. In *Kinetic Modeling for Environmental Systems*, IntechOpen. **2019**.
162. Junqueira LV, Mendes KF, Sousa RN, Almeida CD, Alonso FG, Tornisielo VL. Sorption-Desorption Isotherms and Biodegradation of Glyphosate in Two Tropical Soils Aged with *Eucalyptus* Biochar. *Arch. Agr. Soil Sci.* **2020**, 66,1651-67.
163. Liu J, Zhou JH, Guo QN, Ma LY, Yang H. Physicochemical Assessment of Environmental Behaviors of Herbicide Atrazine in Soils Associated With its Degradation and Bioavailability to Weeds. *Chemosphere.* **2021**, 262,127830.
164. Pietrzak D, Kania J, Kmiecik E, Malina G, Wątor K. Fate of Selected Neonicotinoid Insecticides in Soil–Water Systems: Current State of The Art and Knowledge Gaps. *Chemosphere.* 2020, 255,126981.
165. Cáceres-Jensen L, Gan J, Baez M, Fuentes R, Escudey M. Adsorption of Glyphosate on Variable-Charge, Volcanic Ash–Derived Soils. *Jour. Environ. Qual.* **2009**, 38,1449-1457.
166. Annabi E, Ben Salem I, Abid-Essefi S. Acetamiprid, a Neonicotinoid Insecticide, Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in PC12 Cells. *Tox. Mech. Met.* **2019**, 29,580-586.
167. Bansal OP. Sorption, Degradation and Movement of Three Carbamate Pesticides in Soils. *Ind. Jour. Agr. Sci.* **2011**,81,578-581.
168. Hussain S, Siddique T, Saleem M, Arshad M, Khalid A. Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity, Enzymes, and Biochemical Reactions. *Adv. Agr.* **2009**, 102,159-200.
169. Mattina MJ, White J, Eitzer B, Iannucci-Berger W. Cycling of Weathered Chlordane Residues in the Environment: Compositional and Chiral Profiles in Contiguous Soil, Vegetation, And Air Compartments. *Environ. Tox. Chem.* **2002**, 21,281-288.
170. Folmar LC, Sanders HO, Julin AM. Toxicity of the Herbicide Glyphosate and Several of its Formulations to Fish and Aquatic Invertebrates. *Arch. Environ. Cont. Tox.* **1979**, 8, 269-278.
171. Aparicio VC, De Gerónimo E, Marino D, Primost J, Carriquiriborde P, Costa JL. Environmental Fate of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in Surface Waters And Soil Of Agricultural Basins. *Chemosphere.* **2013**, 93,1866-1873.
172. Gill JP, Sethi N, Mohan A, Datta S, Girdhar M. Glyphosate Toxicity for Animals. *Environ. Chem. Lett.* **2018**, 16, 401-426.
173. Caceres-Jensen L, Rodriguez-Becerra J, Escudey M, Joo-Nagata J, Villagra CA, Dominguez-Vera V, Neira-Albornoz A, Cornejo-Huentemilla M. Nicosulfuron Sorption Kinetics and Sorption/Desorption on Volcanic Ash-Derived Soils: Proposal of Sorption and Transport Mechanisms. *Jour. Haz. Mat.* **2020**, 385,121576.
174. Murano H, Suzuki K, Kayada S, Saito M, Yuge N, Arishiro T, Watanabe A, Isoi T. Influence of Humic Substances and Iron and Aluminum Ions on the Sorption of Acetamiprid to an Arable Soil. *Sci. Tot. Environ.* **2018**, 615,1478-84.
175. Fernandez-Bayo JD, Nogales R, Romero E. Evaluation Of The Sorption Process For Imidacloprid And Diuron In Eight Agricultural Soils From Southern Europe Using Various Kinetic Models. *Jour. Agr. Food Chem.* **2008**, 56, 5266-5272

176. Eggleton P. The State of the World's Insects. *Ann. Rev. Environ. Res.* **2020**, *26*,45.
177. Studzińska MB, Sallé G, Roczeń-Karczmarz M, Szczepaniak K, Demkowska-Kutrzepa M, Tomczuk K. A Survey of Ivermectin Resistance in *Parascaris* Species Infected Foals in South-Eastern Poland. *Act. Vet. Scand.* **2020**, *62*,1-5.
178. Motaung TE. Chloronicotinyl Insecticide Imidacloprid: Agricultural Relevance, Pitfalls and Emerging Opportunities. *Crop Prot.* **2020**, *131*,105097.
179. Saaristo M, Brodin T, Balshine S, Bertram MG, Brooks BW, Ehlman SM, McCallum ES, Sih A, Sundin J, Wong BB, Arnold KE. Direct and Indirect Effects of Chemical Contaminants on the Behaviour, Ecology and Evolution of Wildlife. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* **2018**, *285*, 20181297.
180. Hallmann CA, Foppen RP, van Turnhout CA, de Kroon H, Jongejans E. Declines in Insectivorous Birds are Associated With High Neonicotinoid Concentrations. *Nature.* **2014**, *511*, 341-343.
181. Yusmalinar, S.; Anggtaeni, T.; Kustiati; Wibowo, I.; Putra, R.E. & Ahmad, I. Reproductive Ability Enhancement of Housefly (*Musca domestica* Linn) (Diptera: Muscidae) Through Hormesis by Application of Sublethal Doses of Imidacloprid and Permethrin. *J. Entomol.* **2017**, *14*,199-207
182. Chen X, Tang J. Utilization of Biodiversity In Agriculture: Today And Tomorrow. *Chin. Jour. Eco-Agr.* **2013**,*21*,54-60.
183. Reilly JR, Artz DR, Biddinger D, Bobiwash K, Boyle NK, Brittain C, Brokaw J, Campbell JW, Daniels J, Elle E, Ellis JD. Crop Production in the USA is Frequently Limited by a Lack of Pollinators. *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.* **2020**, *287*,20200922.
184. Melathopoulos AP, Cutler GC, Tyedmers P. Where is the Value in Valuing Pollination Ecosystem Services to Agriculture? *Ecol. Econ.* **2015**, *109*,59-70.
185. Kremen C, Bugg RL, Nicola N, Smith SA, Thorp RW, Williams NM. Native Bees, Native Plants and Crop Pollination in California. *Fremontia.* **2002**, *30*, 41-49.
186. Elbert A, Haas M, Springer B, Thielert W, Nauen R. Applied Aspects of Neonicotinoid Uses in Crop Protection. *Pest Man. Sci.* **2008**, *64*,1099-105.
187. Lu C, Chang CH, Palmer C, Zhao M, Zhang Q. Neonicotinoid Residues in Fruits and Vegetables: an Integrated Dietary Exposure Assessment Approach. *Environ. Sci. Tech.* **2018**, *52*,3175-3184.
188. Basley K, Davenport B, Vogiatzis K, Goulson D. Effects of Chronic Exposure to Thiamethoxam on Larvae of the Hoverfly *Eristalis tenax* (Diptera, Syrphidae). *PeerJ.* **2018**, *6*:e4258.
189. Georgieva, M.; Bonchev, G.; Zehirov, G.; Vasileva, V. Neonicotinoid Insecticides Exert Diverse Cytotoxic and Genotoxic Effects on Cultivated Sunflower. *Environ. Sci. Pollut. G.* **2021**, 1-15. doi:10.1007/s11356-021-14497-y.
190. Craddock HA, Huang D, Turner PC, Quirós-Alcalá L, Payne-Sturges DC. Trends in Neonicotinoid Pesticide Residues in Food and Water in the United States, 1999–2015. *Environ. Health.* **2019**, *18*,7.
191. Farahat NM, Zyaan OH, Khaled AS, Hussein MA. Toxic and Biochemical Effects of Imidacloprid and Tannic Acid on the *Culex pipiens* Larvae (Diptera: Culicidae). *Int. Jour. Mosqu. Res.* **2018**, *5*, 111-115.
192. Byholm, P.; Mäkeläinen, S.; Santangeli, A.; Goulson, D. First evidence of neonicotinoid residues in a long-distance migratory raptor, the European honey buzzard (*Pernis apivorus*). *Sci. Total Environ.* **2018**, *639*, 929–933, doi:10.1016/j.scitotenv.2018.05.185.
193. Piironen, S.; Goulson, D. Chronic Neonicotinoid Pesticide Exposure and Parasite Stress Differentially Affects Learning in Honeybees and Bumblebees. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2016**, *283*, 20160246, doi:10.1098/rspb.2016.0246.
194. Mörtl, M.; Vehovszky, Á.; Klátyik, S.; Takács, E.; Győri, J.; Székács, A. Neonicotinoids: Spreading, Translocation and Aquatic Toxicity. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 2006, doi:10.3390/ijerph17062006.
195. Bordoni L, Gabbianelli R. Nutrigenomics of Food Pesticides. In *Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, Caterina, R. D., Martinez, J. A., Kohlmeier, M., Eds., Academic Press: Cambridge, MA, USA, **2020**; pp. 513-518.
196. Parkinson RH, Zhang S, Gray JR. Neonicotinoid and Sulfoximine Pesticides Differentially Impair Insect Escape Behavior and Motion Detection. *Proc. Nat. Ac. Sci.* **2020**,*117*, 5510-5515.
197. Hoshi, N.; Hirano, T.; Omotehara, T.; Tokumoto, J.; Umemura, Y.; Mantani, Y.; Tanida, T.; Warita, K.; Tabuchi, Y.; Yokoyama, T.; et al. Insight into the Mechanism of Reproductive Dysfunction Caused by Neonicotinoid Pesticides. *Biol. Pharm. Bull.* **2014**, *37*, 1439–1443, doi:10.1248/bpb.b14-00359.
198. Simon-Delso, N.; Amaralrogers, V.; Belzunces, L.P.; Bonmatin, J.M.; Chagnon, M.; Downs, C.; Furlan, L.; Gibbons, D.W.; Giorio, C.; Girolami, V.; et al. Systemic Insecticides (Neonicotinoids And Fipronil): Trends, Uses, Mode of Action and Metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 5–34, doi:10.1007/s11356-014-3470-y.
199. Millot, F.; Decors, A.; Mastain, O.; Quintaine, T.; Berny, P.; Vey, D.; Lasseur, R.; Bro, E. Field Evidence of Bird Poisonings by Imidaclo-Prid-Treated Seeds: A Review of Incidents Reported by the French SAGIR Network from 1995 to 2014. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *24*, 5469–5485.

200. Wang, W.; Ito, T.; Otsuka, S.; Nansai, H.; Abe, K.; Nakao, Y.; Ohgane, J.; Yoneda, M.; Sone, H. Epigenetic Effects of Insecticides on Early Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Toxicol. Vitro*. **2021**, *75*, 105174, doi:10.1016/j.tiv.2021.105174.
201. Arican, Y.E.; Karaman, E.F.; Özden, S. The Subchronic Effects of Acetamipride on the Global DNA Methylation Levels in Sprague-Dawley Rat Brain and Liver. *Istanb. J. Pharm.* **2019**, *49*, 167–172.
202. Bradford, B.R.; Whidden, E.; Gervasio, E.D.; Checchi, P.M.; Raley-Susman, K.M. Neonicotinoid-Containing Insecticide Disruption Of Growth, Locomotion, and Fertility in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0238637, doi:10.1371/journal.pone.0238637.
203. Vehovszky, Á.; Farkas, A.; Ács, A.; Stoliar, O.; Székács, A.; Mörtl, M.; Győri, J. Neonicotinoid Insecticides Inhibit Cholinergic Neuro-Transmission in a Molluscan (*Lymnaea stagnalis*) Nervous System. *Aquat. Toxicol.* **2015**, *167*, 172–179.
204. Samson-Robert O, Labrie G, Chagnon M, Fournier V. Planting of Neonicotinoid-Coated Corn Raises Honey Bee Mortality and Sets Back Colony Development. *PeerJ*. **2017**, *5*, e3670.
205. Henríquez-Piskulich, P.; Schapheer, C.; Vereecken, N.; Villagra, C. Agroecological Strategies to Safeguard Insect Pollinators in Biodiversity Hotspots: Chile as a Case Study. *Sustainability* **2021**, *13*, 6728, doi:10.3390/su13126728.
206. Stanley DA, Garratt MP, Wickens JB, Wickens VJ, Potts SG, Raine NE. Neonicotinoid Pesticide Exposure Impairs Crop Pollination Services Provided By Bumblebees. *Nature*. **2015**, *528*, 548-50.
207. Li J, Wang Q, Zhang L, Gao X. Characterization of Imidacloprid Resistance in the Housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pest. Biochem. Phys.* **2012**, *102*, 109-114.
208. Cutler GC. Insects, Insecticides and Hormesis: Evidence and Considerations for Study. *Dose-Response*. **2013**, *11*, 154–177.
209. Botías, C.; David, A.; Hill, E.M.; Goulson, D. Contamination of Wild Plants Near Neonicotinoid Seed-Treated Crops, and Implications for Non-Target Insects. *Sci. Total Environ.* **2016**, *566*, 269–278, doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.065.
210. Forister, M.L.; Cousens, B.; Harrison, J.G.; Anderson, K.; Thorne, J.H.; Waetjen, D.; Nice, C.C.; De Parsia, M.; Hladik, M.L.; Meese, R.; et al. Increasing Neonicotinoid Use and the Declining Butterfly Fauna of Lowland California. *Biol. Lett.* **2016**, *12*, 20160475, doi:10.1098/rsbl.2016.0475.
211. Wilcox, A.A.; Newman, A.E.M.; Raine, N.E.; Mitchell, G.W.; Norris, D.R. Effects of Early-Life Exposure to Sublethal Levels of a Common Neonicotinoid Insecticide on the Orientation and Migration of Monarch Butterflies (*Danaus plexippus*). *J. Exp. Biol.* **2020**, *224*, jeb230870.
212. Cook, N.; Green, J.; Shuker, D.M.; Whitehorn, P.R. Exposure to the Neonicotinoid Imidacloprid Disrupts Sex Allocation Cue Use During Superparasitism in the Parasitoid Wasp *Nasonia vitripennis*. *Ecol. Entomol.* **2016**, *41*, 693–697.
213. Parra-Morales, L.B.; Alzogaray, R.; del Brio, J.; Cichón, L.; Garrido, S.A.; D’Hervé, F.; Montagna, M. Acetamiprid-Induced Response of Biotransformation and Antioxidant Parameters in the Codling Moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Int. J. Pest Manag.* **2019**, *67*, 1–10.
214. Vaiserman, A.M. Hormesis and Epigenetics: Is There a Link? *Ageing Res. Rev.* **2011**, *10*, 413–21, doi:10.1016/j.arr.2011.01.004.
215. Lawrence, T.J.; Culbert, E.M.; Felsot, A.S.; Hebert, V.R.; Sheppard, W.S. Survey and Risk Assessment of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) Exposure to Neonicotinoid Pesticides in Urban, Rural, and Agricultural Settings. *J. Econ. Entomol.* **2016**, *109*, 520–528, doi:10.1093/jee/tov397.
216. Hu YT, Wu TC, Yang EC, Wu PC, Lin PT, Wu YL. Regulation of Genes Related to Immune Signaling and Detoxification In *Apis mellifera* by an Inhibitor of Histone Deacetylation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1-4.
217. Stoughton SJ, Liber K, Culp J, Cessna A. Acute and Chronic Toxicity of Imidacloprid to the Aquatic Invertebrates *Chironomus Tentans* and *Hyalella azteca* Under Constant-and Pulse-Exposure Conditions. *Arch. Environ. Cont. Tox.* **2008**, *54*, 662-673.
218. Zhao JZ, Bishop BA, Grafius EJ. Inheritance and Synergism of Resistance to Imidacloprid in the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Jour. Econ. Ent.* **2000**, *93*, 1508-1514.
219. Rundlöf M, Andersson GK, Bommarco R, Fries I, Hederström V, Herbertsson L, Jonsson O, Klatt BK, Pedersen TR, Yourstone J, Smith HG. Seed Coating With a Neonicotinoid Insecticide Negatively Affects Wild Bees. *Nature*. **2015**, *521*, 77-80.
220. Peng YC, Yang EC. Sublethal Dosage of Imidacloprid Reduces the Microglomerular Density of Honey Bee Mushroom Bodies. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19298.

221. Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D, Varricchio P, Caprio E, Nazzi F, Gargiulo G, Pennacchio F. Neonicotinoid Clothianidin Adversely Affects Insect Immunity and Promotes Replication of a Viral Pathogen in Honey Bees. *Proc. Nat. Ac. Sci.* **2013**, *110*,18466-18471.
222. Biergans SD, Claudianos C, Reinhard J, Galizia CG. DNA Methylation Mediates Neural Processing After Odor Learning in the Honeybee. *Sci. Rep.* **2017**, *7*,43635.
223. Chaudhary OP, Poonia R. Qualitative Decline of Pollinator Spectrum in Sunflower Agro Ecosystem. *Ind. Jour. Ecol.* **2018**,*45*,592-597.
224. Eisenhauer N, Bonn A, Guerra CA. Recognizing the Quiet Extinction of Invertebrates. *Nat. Com.* **2019**, *10*,1-3.
225. Rockström, J.; Steffen, W.; Noone, K.; Persson, Å.; Chapin, F.S., III; Lambin, E.; Lenton, T.M.; Scheffer, M.; Folke, C.; Schellnhuber, H.J.; Nykvist, B. Planetary Boundaries: Exploring the Safe Operating Space for Humanity. *Ecol. Soc.* **2009**, *14*, 32
226. Summerhayes CP, Zalasiewicz J. Global Warming and the Anthropocene. *Geol. Today* **2018**, *34*,194-200.
227. Hobbie SE, Grimm NB. Nature-Based Approaches to Managing Climate Change Impacts in Cities. *Phil. Tran. R. Soc. B.* **2020**, *375*,20190124.
228. Nolan RH, Boer MM, Collins L, Resco de Dios V, Clarke H, Jenkins M, Kenny B, Bradstock RA. Causes and Consequences of Eastern Australia's 2019–20 Season of Mega-Fires. *Glob. Ch. Biol.* **2020**, *26*,1039-1041.
229. Edie SM, Huang S, Collins KS, Roy K, Jablonski D. Loss of Biodiversity Dimensions Through Shifting Climates and Ancient Mass Extinctions. *Integ. Comp. Biol.* **2018**, *58*, 1179-90.
230. Abraham JP, Baringer M, Bindoff NL, Boyer T, Cheng LJ, Church JA, Conroy JL, Domingues CM, Fasullo JT, Gilson J, Goni G. A Review of Global Ocean Temperature Observations: Implications for Ocean Heat Content Estimates and Climate Change. *Rev. Geoph.* **2013**, *51*,450-83.
231. Cáceres L, Fuentes R, Escudey M, Fuentes E, Báez ME. Metsulfuron-Methyl Sorption/Desorption Behavior on Volcanic Ash-Derived Soils. Effect of Phosphate And Ph. *Jour. Agr. Food Chem.* **2010**, *58*, 6864-6869.
232. Mantyka-pringle CS, Martin TG, Rhodes JR. Interactions Between Climate and Habitat Loss Effects on Biodiversity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gl. Ch. Biol.* **2012**, *18*,1239-1252.
233. Singh JS. The Biodiversity Crisis: A Multifaceted Review. *Curr. Sci.* **2002**,*82*, 638-47.
234. Luiza-Andrade A, Brasil LS, Benone NL, Shimano Y, Farias AP, Montag LF, Dolédec S, Juen L. Influence of Oil Palm Monoculture on the Taxonomic and Functional Composition of Aquatic Insect Communities in Eastern Brazilian Amazonia. *Ecol. Indic.* **2017**, *82*,478-83.
235. Guenat S, Kunin WE, Dougill AJ, Dallimer M. Effects of Urbanisation and Management Practices on Pollinators in Tropical Africa. *Jour. Appl. Ecol.* **2019**, *56*,214-24.
236. Elmqvist T, Zipperer W, Güneralp B. Urbanization, Habitat Loss, Biodiversity Decline: Solution Pathways to Break the Cycle. In *Routledge Handbook of Urbanization and Global Environmental Change*; Seta, K., Solecki, W.D., Griffith, C.A., Eds.; Routledge: London, UK, **2016**.
237. Marcantonio M, Rocchini D, Geri F, Bacaro G, Amici V. Biodiversity, Roads, & Landscape Fragmentation: Two Mediterranean Cases. *Appl. Geog.* **2013**, *42*,63-72.
238. Goosem M. Fragmentation Impacts Caused by Roads Through Rainforests. *Curr. Sci.* **2007**, 1587-1595.
239. Geneletti D. Biodiversity Impact Assessment of Roads: An Approach Based on Ecosystem Rarity. *Environ. Imp. Assess. Rev.* **2003**, *23*,343-365.
240. Butt N, Beyer HL, Bennett JR, Biggs D, Maggini R, Mills M, Renwick AR, Seabrook LM, Possingham HP. Biodiversity Risks From Fossil Fuel Extraction. *Science.* **2013**, *342*,425-426
241. Virah-Sawmy M, Ebeling J, Taplin R. Mining and Biodiversity Offsets: A Transparent and Science-Based Approach to Measure "No-Net-Loss". *Jour. Environ. Manag.* **2014**, *143*,61-70.
242. Maiti SK, Chowdhury A. Effects of Anthropogenic Pollution on Mangrove Biodiversity: A Review. *Jour. Environ. Prot.* **2013**, *4*, 1428-1434.
243. McNeely JA. The Sinking Ark: Pollution and the Worldwide Loss of Biodiversity. *Biod. Cons.* **1992**, *1*, 2-18.
244. Baur B, Cremene C, Groza G, Rakosy L, Schileyo AA, Baur A, Stoll P, Erhardt A. Effects of Abandonment of Subalpine Hay Meadows on plant and Invertebrate Diversity in Transylvania, Romania. *Biol. Cons.* **2006**, *132*, 261-73.
245. MacDonald D, Crabtree JR, Wiesinger G, Dax T, Stamou N, Fleury P, Lazpita JG, Gibon A. Agricultural Abandonment in Mountain Areas of Europe: Environmental Consequences and Policy Response. *Jour. Environ. Man.* **2000**, *59*,47-69.
246. Cristi de Barros EC, Ventura HV, Gontijo PC, Pereira RR, Picanço MC. Ecotoxicological Study of Insecticide Effects on Arthropods in Common Bean. *Jour. Insect Sci.* **2015**, *15*,1.
247. Liu S, Jaouannet M, Dempsey DM, Imani J, Coustau C, Kogel KH. RNA-Based Technologies for Insect Control in Plant Production. *Biotech. Adv.* **2020**,*39*,107463.

248. Rada S, Schweiger O, Harpke A, Kühn E, Kuras T, Settele J, Musche M. Protected Areas do not Mitigate Biodiversity Declines: A Case Study on Butterflies. *Div. Distr.* **2019**, *25*, 217-24.
249. Rostant WG, Wedell N, Hosken DJ. Transposable Elements and Insecticide Resistance. *Adv. Gen.* **2012**, *78*, 169-201.
250. Gutzat R, Scheid OM. Epigenetic responses to stress: triple defense? *Current Opinion in Plant Biology.* 2012 Nov 1;15(5):568-73.
251. Woodcock BA, Bullock JM, Shore RF, Heard MS, Pereira MG, Redhead J, Ridding L, Dean H, Sleep D, Henrys P, Peyton J. Country-Specific Effects of Neonicotinoid Pesticides on Honey Bees and Wild Bees. *Science.* **2017**, *356*,1393-1395.
252. Barbieri RF, Lester PJ, Miller AS, Ryan KG. A Neurotoxic Pesticide Changes the Outcome of Aggressive Interactions Between Native and Invasive Ants. *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.* **2013**, *280*,20132157.
253. Barbosa WF, Smaghe G, Guedes RN. Pesticides and Reduced-Risk Insecticides, Native Bees and Pantropical Stingless Bees: Pitfalls and Perspectives. *Pest Man. Sci.* **2015**, *71*,1049-1053.
254. Skinner, M.K.; Ben Maamar, M.; Sadler-Riggelman, I.; Beck, D.; Nilsson, E.; McBirney, M.; Klukovich, R.; Xie, Y.; Tang, C.; Yan, W. Alterations in Sperm DNA Methylation, Non-Coding RNA and Histone Retention Associate With DDT-Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Disease. *Epig. Chrom.* **2018**, *11*, 1–24, doi:10.1186/s13072-018-0178-0.
255. Vargas, A.O.; Botelho, J.F.; Mpodozis, J. The Evolutionary Consequences of Epigenesis and Neutral Change: A Conceptual Approach at the Organismal Level. *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.* **2020**, doi:10.1002/jez.b.23023.
256. Stavert JR, Pattenmore DE, Gaskett AC, Beggs JR, Bartomeus I. Exotic Species Enhance Response Diversity to Land-Use Change But Modify Functional Composition. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* **2017**, *284*,20170788.
257. Wilting HC, Schipper AM, Bakkenes M, Meijer JR, Huijbregts MA. Quantifying Biodiversity Losses Due to Human Consumption: A Global-Scale Footprint Analysis. *Environ. Sci.Tech.* **2017**, *51*,3298-306.
258. Biesmeijer JC, Roberts SP, Reemer M, Ohlemüller R, Edwards M, Peeters T, Schaffers AP, Potts SG, Kleukers RJ, Thomas CD, Settele J. Parallel Declines in Pollinators and Insect-Pollinated Plants in Britain and The Netherlands. *Science.* **2006**, *313*, 351-354.
259. Steffan-Dewenter, I., Potts, S. and Packer, L., Pollinator Diversity and Crop Pollination Services are at Risk. *T. Ecol. & Evol.* **2005**, *20*, 651-652.
260. Pettis JS, Lichtenberg EM, Andree M, Stitzinger J, Rose R. Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. *PloS One.* **2013**, *8*,e70182.
261. Pievani T. The Sixth Mass Extinction: Anthropocene and the Human Impact on Biodiversity. *Rend. Lincei* **2014**, *25*, 85-93.
- Schapheer, C.; Pellens, R.; Scherson, R. Arthropod-Microbiota Integration: Its Importance for Ecosystem Conservation. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 1–18, doi:10.3389/fmicb.2021.

Anexo B: Estadígrafos
 Ensayo de tolerancia:

Tabla 1: supervivencia en ensayo de tolerancia al compuesto

Ensayo	Concentración (ppm)	Larvas vivas	Larvas muertas	pupas	adultos
1	0	6	0	6	6
1	1	0	4	0	0
1	0,1	4	0	3	3
1	0,01	2	2	1	1
2	0	2	2	0	0
2	1	3	1	3	3
2	0,1	2	2	2	1
2	0,01	1	3	0	0
3	0	0	6	0	0
3	1	2	4	2	2
3	0,1	0	6	0	0
3	0,01	2	4	2	2
4	0	6	0	5	5
4	1	0	6	0	0
4	0,1	4	2	3	3
4	0,01	2	4	2	2
5	0	2	4	2	2
5	1	2	4	2	2
5	0,1	1	5	1	1
5	0,01	0	6	0	0

Tabla 2: Estadísticos descriptivos larvas vivas de *L. sericata* ensayo de tolerancia

tipo de tratamiento		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
control	número de larvas vivas	5	,00	6,00	3,2000	2,68328
	N válido (por lista)	5				
1 ppm	número de larvas vivas	5	,00	3,00	1,4000	1,34164
	N válido (por lista)	5				
0,1 ppm	número de larvas vivas	5	,00	4,00	2,2000	1,78885
	N válido (por lista)	5				
0,01 ppm	número de larvas vivas	5	,00	2,00	1,4000	,89443
	N válido (por lista)	5				

Tabla 3: Estadísticos descriptivos larvas muertas de *L. sericata* ensayo de tolerancia

tipo de tratamiento		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Control	número de larvas vivas	5	,00	6,00	3,2000	2,68328
	N válido (por lista)	5				
1 ppm	número de larvas vivas	5	,00	3,00	1,4000	1,34164
	N válido (por lista)	5				
0,1 ppm	número de larvas vivas	5	,00	4,00	2,2000	1,78885
	N válido (por lista)	5				
0,01 ppm	número de larvas vivas	5	,00	2,00	1,4000	,89443
	N válido (por lista)	5				

Tabla 4: Estadísticos descriptivos pupas de *L. sericata* ensayo de tolerancia

tipo de tratamiento		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Control	pupas	5	,00	6,00	2,6000	2,79285
	N válido (por lista)	5				
1 ppm	pupas	5	,00	3,00	1,4000	1,34164
	N válido (por lista)	5				
0,1 ppm	pupas	5	,00	3,00	1,8000	1,30384
	N válido (por lista)	5				
0,01 ppm	pupas	5	,00	2,00	1,0000	1,00000
	N válido (por lista)	5				

Tabla 5: Estadísticos descriptivos imagos de *L. sericata* ensayo de tolerancia

tipo de tratamiento		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Control	adultos	5	,00	6,00	2,6000	2,79285
	N válido (por lista)	5				
1 ppm	adultos	5	,00	3,00	1,4000	1,34164
	N válido (por lista)	5				
0,1 ppm	adultos	5	,00	3,00	1,6000	1,34164
	N válido (por lista)	5				
0,01 ppm	adultos	5	,00	2,00	1,0000	1,00000
	N válido (por lista)	5				

Larvas

Tabla 6: porcentaje de larvas vivas de *L. sericata* por generación y tratamiento

Expuesto o control	generación	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	
Control	1	Porcentajelarvas	6	36,47	85,00	58,5784	18,02503
		N válido (por lista)	6				
	2	Porcentajelarvas	6	97,57	100,00	98,7764	,89673
		N válido (por lista)	6				
	3	Porcentajelarvas	6	65,33	100,00	88,3049	13,12931
		N válido (por lista)	6				
	4	Porcentajelarvas	6	67,36	100,00	93,1396	12,72208
		N válido (por lista)	6				
expuesto	1	Porcentajelarvas	6	50,00	81,00	65,2403	11,42468
		N válido (por lista)	6				
	2	Porcentajelarvas	6	31,12	100,00	74,1302	28,34434
		N válido (por lista)	6				
	3	Porcentajelarvas	6	95,77	100,00	98,5331	2,13908
		N válido (por lista)	6				
	4	Porcentajelarvas	6	95,77	100,00	98,0754	1,67097
		N válido (por lista)	6				

Tabla 7: Prueba de T de muestras independientes para larvas vivas separado por generación

Generación	Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias							
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
								Inferior	Superior	
1 larvas										
vivas										
	Se asumen									
	varianzas	1,591	,236	-,647	10	,532	-6,000	9,268	-26,650	14,650
	iguales									
	No se asumen									
	varianzas			-,647	8,203	,535	-6,000	9,268	-27,279	15,279
	iguales									
2 larvas										
vivas										
	Se asumen									
	varianzas	1,822	,207	2,496	10	,032	130,167	52,142	13,986	246,347
	iguales									
	No se asumen									
	varianzas			2,496	8,729	,035	130,167	52,142	11,653	248,681
	iguales									
3 larvas										
vivas										
	Se asumen									
	varianzas	2,229	,166	1,647	10	,131	168,667	102,432	-59,566	396,899
	iguales									
	No se asumen									
	varianzas			1,647	5,794	,152	168,667	102,432	-84,153	421,487
	iguales									
4 larvas										
vivas										
	Se asumen									
	varianzas	,426	,529	,896	10	,391	68,500	76,427	-101,791	238,791
	iguales									
	No se asumen									
	varianzas			,896	9,175	,393	68,500	76,427	-103,889	240,889
	iguales									

Tabla 8: Porcentaje de mortalidad de larvas

Expuesto o control		generación	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Control	1	porcentajeletalidad	6	15,00	63,53	41,4216	18,02503
		N válido (por lista)	6				
	2	porcentajeletalidad	6	,00	2,43	1,2236	,89673
		N válido (por lista)	6				
	3	porcentajeletalidad	6	,00	34,67	11,6951	13,12931
		N válido (por lista)	6				
	4	porcentajeletalidad	6	,00	32,64	6,8604	12,72208
		N válido (por lista)	6				
expuesto	1	porcentajeletalidad	6	19,00	50,00	34,7597	11,42468
		N válido (por lista)	6				
	2	porcentajeletalidad	6	,00	68,88	25,8698	28,34434
		N válido (por lista)	6				
	3	porcentajeletalidad	6	,00	4,23	1,4669	2,13908
		N válido (por lista)	6				
	4	porcentajeletalidad	6	,00	4,23	1,9246	1,67097
		N válido (por lista)	6				

Tabla 9: largo máximo larvas por generación y tratamiento

Expuesto o control		generación	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Control	1	largo larva A mm	6	12,229	13,851	13,32483	,657926
		largo larva B mm	6	4,442	11,558	8,25433	2,462865
		N válido (por lista)	6				
	2	largo larva A mm	6	9,953	15,416	13,12083	2,241388
		largo larva B mm	6	4,214	11,499	7,15133	2,575612
		N válido (por lista)	6				
	3	largo larva A mm	6	11,445	13,813	12,94683	,869598
		largo larva B mm	6	6,310	7,413	6,66450	,422580
		N válido (por lista)	6				
	4	largo larva A mm	6	10,547	15,572	13,07700	1,911285
		largo larva B mm	6	2,262	7,323	4,70867	2,010135
		N válido (por lista)	6				
expuesto	1	largo larva A mm	6	9,840	15,088	13,07233	1,944627
		largo larva B mm	6	6,981	12,671	10,09283	2,201281

	N válido (por lista)	6				
2	largo larva A mm	6	11,174	15,240	13,10217	1,454752
	largo larva B mm	6	5,819	12,028	8,44433	2,546992
	N válido (por lista)	6				
3	largo larva A mm	6	12,175	15,279	14,09867	1,167205
	largo larva B mm	6	,000	12,913	6,34917	4,148307
	N válido (por lista)	6				
4	largo larva A mm	6	10,260	15,080	12,67900	1,759031
	largo larva B mm	6	3,824	11,366	6,58100	2,767687
	N válido (por lista)	6				

Tabla 10: Ancho máximo larvas por generación y tratamiento

Expuesto o control	generación	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	
Control	1	ancho larva A mm	6	2,093	2,610	2,34317	,194287
		ancho larva Bmm	6	,979	1,955	1,49967	,348586
		N válido (por lista)	6				
	2	ancho larva A mm	6	1,472	2,683	2,26250	,551892
		ancho larva Bmm	6	,819	2,091	1,25750	,474634
		N válido (por lista)	6				
	3	ancho larva A mm	6	1,872	2,375	2,16683	,175598
		ancho larva Bmm	6	,865	1,397	1,11667	,233209
		N válido (por lista)	6				
	4	ancho larva A mm	6	1,692	2,496	2,09950	,338592
		ancho larva Bmm	6	,523	1,099	,79017	,218055
		N válido (por lista)	6				
expuesto	1	ancho larva A mm	6	1,391	2,586	2,19067	,471511
		ancho larva Bmm	6	1,348	2,456	1,78883	,453543
		N válido (por lista)	6				
	2	ancho larva A mm	6	2,023	2,524	2,32717	,197431
		ancho larva Bmm	6	,598	2,276	1,58500	,617403
		N válido (por lista)	6				
	3	ancho larva A mm	6	2,195	2,900	2,49833	,266619
		ancho larva Bmm	5	,705	2,305	1,25120	,638301
		N válido (por lista)	5				
	4	ancho larva A mm	6	1,710	2,763	2,14750	,400135
		ancho larva Bmm	6	,579	1,864	1,11767	,462121
		N válido (por lista)	6				

Tabla 11: Prueba de t de muestras independientes para larvas vivas separado por generación

Generación			Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
			F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
										Inferior	Superior
1 larvas vivas	Se asumen varianzas iguales	1,591	,236	-,647	10	,532	-6,000	9,268	-26,650	14,650	
	No se asumen varianzas iguales			-,647	8,203	,535	-6,000	9,268	-27,279	15,279	
2 larvas vivas	Se asumen varianzas iguales	1,822	,207	2,496	10	,032	130,167	52,142	13,986	246,347	
	No se asumen varianzas iguales			2,496	8,729	,035	130,167	52,142	11,653	248,681	
3 larvas vivas	Se asumen varianzas iguales	2,229	,166	1,647	10	,131	168,667	102,432	-59,566	396,899	
	No se asumen varianzas iguales			1,647	5,794	,152	168,667	102,432	-84,153	421,487	
4 larvas vivas	Se asumen varianzas iguales	,426	,529	,896	10	,391	68,500	76,427	-101,791	238,791	
	No se asumen varianzas iguales			,896	9,175	,393	68,500	76,427	-103,889	240,889	

Tabla 12: Estadísticas grupales de T de muestras independientes para largo larva A

	expuesto o control	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
largo larva A mm	control	24	13,11737	1,471055	,300278
	expuesto	24	13,23804	1,593013	,325173

Tabla 13: Prueba de T de muestras independientes para largo larva A

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
largo larva A mm	Se asumen varianzas iguales	,297	,588	-,273	46	,786	-,120667	,442610	-1,011595	,770262
	No se asumen varianzas iguales			-,273	45,711	,786	-,120667	,442610	-1,011747	,770414

Tabla 14: Estadísticas grupales de T de muestras independientes para ancho larva A

	expuesto o control	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
ancho larva A mm	control	24	2,21800	,339110	,069221
	expuesto	24	2,29092	,355833	,072634

Tabla 15: Prueba de T de muestras independientes para largo larva A

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
ancho larva A mm	Se asumen varianzas iguales	,033	,856	-,727	46	,471	-,072917	,100336	-,274882	,129048
	No se asumen varianzas iguales			-,727	45,894	,471	-,072917	,100336	-,274894	,129061

Tabla 16: Estadísticas grupales de T de muestras independientes para largo larva B

		expuesto o control	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
largo larva B mm	control		24	6,69471	2,322955	,474171
	expuesto		23	8,20887	2,795293	,582859

Tabla 17: Prueba de T de muestras independientes para largo larva B

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
largo larva B mm	Se asumen varianzas iguales	2,592	,114	-2,023	45	,049	-1,514161	,748389	-3,021494	-,006829
	No se asumen varianzas iguales			-2,015	42,817	,050	-1,514161	,751374	-3,029638	,001315

Tabla 18: Estadísticas grupales de T de muestras independientes para ancho larva B

	expuesto o control	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
ancho larva B mm	control	24	1,16600	,407749	,083231
	expuesto	23	1,44370	,575622	,120025

Tabla 19: Prueba de T de muestras independientes para ancho larva B

		Prueba de Levene de calidad de varianzas				prueba t para la igualdad de medias		95% de intervalo de confianza de la diferencia		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
ancho larva B mm	Se asumen varianzas iguales	3,592	,064	-1,915	45	,062	-,277696	,145010	-,569761	,014369
	No se asumen varianzas iguales			-1,901	39,507	,065	-,277696	,146060	-,573009	,017618

Tabla 20: Correlación de Pearson entre largo y ancho de larva A

expuesto o control			largo larva A mm	ancho larva A mm
control	largo larva A mm	Correlación de Pearson		1
		Sig. (bilateral)		,890**
		N	24	24
control	ancho larva A mm	Correlación de Pearson	,890**	1
		Sig. (bilateral)	,000	
		N	24	24
expuesto	largo larva A mm	Correlación de Pearson		1
		Sig. (bilateral)		,876**
		N	24	24
expuesto	ancho larva A mm	Correlación de Pearson	,876**	1
		Sig. (bilateral)	,000	
		N	24	24

	Sig. (bilateral)	,000	
	N	24	24

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Tabla 21: Correlación de Pearson entre largo y ancho de larva B

expuesto o control			largo larva B mm	ancho larva Bmm
control	largo larva B mm	Correlación de Pearson	1	,908**
		Sig. (bilateral)		,000
		N	24	24
	ancho larva Bmm	Correlación de Pearson	,908**	1
		Sig. (bilateral)	,000	
		N	24	24
expuesto	largo larva B mm	Correlación de Pearson	1	,907**
		Sig. (bilateral)		,000
		N	23	23
	ancho larva Bmm	Correlación de Pearson	,907**	1
		Sig. (bilateral)	,000	
		N	23	23

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Pupas

Tabla 22: Estadísticas grupales de T de muestras independientes para pupas por generación

generación	expuesto o control	N	Media	Desviación	Media de error
				estándar	estándar
1	pupas total control	6	39,83	19,020	7,765
	expuesto	6	38,67	8,359	3,412
2	pupas total control	6	79,67	76,959	31,418
	expuesto	6	77,33	65,674	26,811
3	pupas total control	6	85,50	85,601	34,946
	expuesto	6	61,17	45,155	18,434
4	pupas total control	6	45,00	31,736	12,956
	expuesto	6	36,67	61,360	25,050

Tabla 23: Prueba de T de muestras independientes para pupas por generación

generación			Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
			F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior	
1	Porcent ajepupa s	Se asumen varianzas iguales	,123	,733	,678	10	,513	8,259272	12,184878	-18,890328	35,408872
		No se asumen varianzas iguales			,678	9,183	,515	8,259272	12,184878	-19,221318	35,739862
2	Porcent ajepupa s	Se asumen varianzas iguales	,438	,523	-1,210	10	,254	-14,000666	11,573307	-39,787602	11,786269
		No se asumen varianzas iguales			-1,210	9,718	,255	-14,000666	11,573307	-39,889576	11,888243
3	Porcent ajepupa s	Se asumen varianzas iguales	,007	,934	-,334	10	,745	-3,805171	11,394462	-29,193614	21,583273
		No se asumen varianzas iguales			-,334	9,892	,745	-3,805171	11,394462	-29,231244	21,620902
4	Porcent ajepupa s	Se asumen varianzas iguales	,896	,366	,524	10	,612	12,040041	22,995478	-39,197077	63,277159
		No se asumen varianzas iguales			,524	7,297	,616	12,040041	22,995478	-41,890448	65,970529

Tabla 24: Estadísticas grupales de T de muestras independientes para largo de pupas

	expuesto o control	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
largo pupa mm	control	24	6,31804	,943352	,192561
	expuesto	24	6,68125	,959667	,195891

Tabla 25: Prueba de T de muestras independientes para largo de pupa

		Prueba de Levene de calidad de varianzas				prueba t para la igualdad de medias				
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
largo pupa mm	Se asumen varianzas iguales	,223	,639	-1,322	46	,193	-,363208	,274687	-,916125	,189708
	No se asumen varianzas iguales			-1,322	45,986	,193	-,363208	,274687	-,916129	,189713

Tabla 26: Estadísticas grupales de T de muestras independientes para ancho de pupas

	expuesto o control	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
ancho pupa mm	control	24	2,33633	,401385	,081932
	expuesto	24	2,50546	,491323	,100291

Tabla 27: Prueba de T de muestras independientes para ancho de pupa

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
ancho pupa mm	Se asumen varianzas iguales	1,313	,258	-1,306	46	,198	-,169125	,129504	-,429802	,091552
	No se asumen varianzas iguales			-1,306	44,240	,198	-,169125	,129504	-,430083	,091833

Tabla 28: Correlación de Pearson para largo y ancho de pupa

Expuesto o control			largo pupa mm	ancho pupa mm
control	largo pupa mm	Correlación de Pearson	1	,902**
		Sig. (bilateral)		,000
		N	24	24
	ancho pupa mm	Correlación de Pearson	,902**	1
		Sig. (bilateral)	,000	
		N	24	24
expuesto	largo pupa mm	Correlación de Pearson	1	,825**
		Sig. (bilateral)		,000
		N	24	24
	ancho pupa mm	Correlación de Pearson	,825**	1
		Sig. (bilateral)	,000	
		N	24	24

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Adultos

Tabla 29: Estadísticos descriptivos de largo de adultos de *L. sericata* por generación y tratamiento

expuesto o control	generación	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
control	1 largo adulto A mm	6	5,926	10,538	9,00450	1,711331
	largo adulto B mm	6	6,268	10,182	8,16817	1,521247
	N válido (por lista)	6				
	2 largo adulto A mm	6	6,837	10,393	8,38983	1,153023
	largo adulto B mm	6	5,722	8,840	7,28683	1,001638
	N válido (por lista)	6				
	3 largo adulto A mm	6	5,779	9,444	7,32883	1,392217
	largo adulto B mm	6	6,742	8,720	7,33667	,713399
	N válido (por lista)	6				
	4 largo adulto A mm	6	5,446	7,332	6,65250	,829155
	largo adulto B mm	5	5,774	7,139	6,38020	,570219
	N válido (por lista)	5				
expuesto	1 largo adulto A mm	6	7,067	10,173	8,87300	1,194864
	largo adulto B mm	6	6,589	9,042	7,86100	,817247
	N válido (por lista)	6				
	2 largo adulto A mm	6	6,500	9,165	7,76950	1,046589
	largo adulto B mm	6	6,258	9,749	7,29700	1,318466
	N válido (por lista)	6				
	3 largo adulto A mm	6	6,495	9,244	8,06783	1,102910
	largo adulto B mm	6	6,834	8,337	7,55933	,679063
	N válido (por lista)	6				
	4 largo adulto A mm	5	5,736	7,535	6,69700	,740210
	largo adulto B mm	3	5,678	6,635	6,03300	,524136
	N válido (por lista)	3				

Tabla 30: Estadísticos descriptivos de ancho pronoto por generación y tratamiento

expuesto o control	generación		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
control	1	ancho pterotorax adulto A mm	6	1,970	3,546	2,93517	,544207
		ancho pterotorax adulto B mm	6	2,069	3,318	2,82550	,535179
		N válido (por lista)	6				
	2	ancho pterotorax adulto A mm	6	2,228	3,318	2,61383	,443838
		ancho pterotorax adulto B mm	6	1,733	3,027	2,43083	,483091
		N válido (por lista)	6				
	3	ancho pterotorax adulto A mm	6	1,911	2,901	2,38083	,364220
		ancho pterotorax adulto B mm	6	1,866	2,955	2,40500	,412724
		N válido (por lista)	6				
	4	ancho pterotorax adulto A mm	6	2,137	2,796	2,40033	,250246
		ancho pterotorax adulto B mm	5	1,990	2,819	2,29320	,392188
		N válido (por lista)	5				
expuesto	1	ancho pterotorax adulto A mm	6	2,664	3,964	3,15617	,484977
		ancho pterotorax adulto B mm	6	2,115	3,251	2,74583	,432627
		N válido (por lista)	6				
	2	ancho pterotorax adulto A mm	6	2,137	3,067	2,66000	,364516
		ancho pterotorax adulto B mm	6	2,305	2,661	2,43917	,123594
		N válido (por lista)	6				
	3	ancho pterotorax adulto A mm	6	2,134	2,971	2,56317	,304722
		ancho pterotorax adulto B mm	6	2,169	3,124	2,62633	,330867
		N válido (por lista)	6				

4	ancho pterotorax adulto A mm	5	1,963	2,796	2,41060	,380651
	ancho pterotorax adulto B mm	5	1,886	2,842	2,25200	,382430
	N válido (por lista)	5				

Tabla 31: Largo del pronoto por generación y tratamiento

expuesto o		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación
control	generación					estándar
control	1 largo pterotorax adulto A mm	6	2,817	4,781	4,01817	,691633
	largo pterotorax adulto B mm	6	2,791	4,483	3,72067	,584605
	N válido (por lista)	6				
	2 largo pterotorax adulto A mm	6	2,835	4,728	3,81350	,698676
	largo pterotorax adulto B mm	6	2,460	4,186	3,40450	,643060
	N válido (por lista)	6				
	3 largo pterotorax adulto A mm	6	2,820	3,916	3,20100	,403238
	largo pterotorax adulto B mm	6	2,660	4,358	3,24067	,653049
	N válido (por lista)	6				
	4 largo pterotorax adulto A mm	6	2,848	3,716	3,21383	,332460
	largo pterotorax adulto B mm	5	2,716	3,554	3,00000	,351667
	N válido (por lista)	5				
expuesto	1 largo pterotorax adulto A mm	6	3,296	4,511	3,97117	,447743
	largo pterotorax adulto B mm	6	3,075	4,289	3,78117	,536698
	N válido (por lista)	6				
	2 largo pterotorax adulto A mm	6	3,000	3,969	3,44517	,338479
	largo pterotorax adulto B mm	6	2,623	4,253	3,31033	,622644
	N válido (por lista)	6				
	3 largo pterotorax adulto A mm	6	3,015	4,564	3,70867	,604853
	largo pterotorax adulto B mm	6	3,273	4,237	3,68167	,359223
	N válido (por lista)	6				
	4 largo pterotorax adulto A mm	5	2,284	3,985	3,25340	,630889
	largo pterotorax adulto B mm	5	2,616	3,750	3,08540	,502177
	N válido (por lista)	5				

Tabla 32: Estadísticas grupales de T de muestras independientes para adultos por generación

generación	expuesto o control	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
------------	--------------------	---	-------	---------------------	-------------------------

1	adultos recuperados	control	6	30,33	18,522	7,562
		expuesto	6	30,50	7,148	2,918
2	adultos recuperados	control	6	51,50	55,565	22,684
		expuesto	6	60,67	50,631	20,670
3	adultos recuperados	control	6	47,33	38,417	15,684
		expuesto	6	39,33	27,926	11,401
4	adultos recuperados	control	6	16,83	23,129	9,443
		expuesto	6	21,83	41,199	16,819

Tabla 33: Prueba de T de muestras independientes para adultos por generación

generación		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
1 adultos recuperados	Se asumen varianzas iguales	2,992	,114	-,021	10	,984	-,167	8,105	-18,226	17,893
	No se asumen varianzas iguales			-,021	6,457	,984	-,167	8,105	-19,664	19,331
2 adultos recuperados	Se asumen varianzas iguales	,005	,943	-,299	10	,771	-9,167	30,689	-77,546	59,213
	No se asumen varianzas iguales			-,299	9,915	,771	-9,167	30,689	-77,626	59,293
3 adultos recuperados	Se asumen varianzas iguales	,744	,409	,413	10	,689	8,000	19,390	-35,203	51,203
	No se asumen varianzas iguales			,413	9,131	,689	8,000	19,390	-35,767	51,767
4 adultos recuperados	Se asumen varianzas iguales	,927	,358	-,259	10	,801	-5,000	19,289	-47,978	37,978
	No se asumen varianzas iguales			-,259	7,867	,802	-5,000	19,289	-49,611	39,611

Tabla 34: Estadísticas grupales de T de muestras independientes para largo de adultos A

	expuesto o control	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
largo adulto A mm	control	24	7,84392	1,537898	,313922
	expuesto	23	7,90204	1,244560	,259509

Tabla 35: Prueba de T de muestras independientes para largo de adultos A

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
largo adulto A mm	Se asumen varianzas iguales	1,075	,305	-,142	45	,888	-,058127	,409149	-,882196	,765943
	No se asumen varianzas iguales			-,143	43,795	,887	-,058127	,407298	-,879091	,762838

Tabla 36: Estadísticas grupales de T de muestras independientes para largo de adultos B

	expuesto o control	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
largo adulto B mm	control	23	7,33265	1,151475	,240099
	expuesto	21	7,35252	1,047285	,228536

Tabla 37: Prueba de T de muestras independientes para largo de adultos B

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
--	--	------------------------------------------	--	-------------------------------------	--	--	--	--	--	--

		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
largo	Se asumen									
adulto	varianzas	,004	,953	-,060	42	,953	-,019872	,332938	-,691767	,652024
B mm	iguales									
	No se asumen									
	varianzas			-,060	42,000	,952	-,019872	,331476	-,688818	,649074
	iguales									

Tabla 38: Estadísticas grupales de T de muestras independientes para ancho pronoto en adultos A

	expuesto o control	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
ancho pterotorax adulto A mm	control	24	2,58254	,449029	,091658
	expuesto	23	2,70996	,460789	,096081

Tabla 39: Prueba de T de muestras independientes para ancho de pronoto de adultos A

		Prueba de Levene de calidad de varianzas				prueba t para la igualdad de medias			95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
ancho	Se asumen									
pterotorax	varianzas	,188	,667	-,960	45	,342	-,127415	,132714	-,394714	,139884
adulto A	iguales									
mm	No se									
	asumen									
	varianzas			-,960	44,785	,342	-,127415	,132788	-,394900	,140070
	iguales									

Tabla 40: Estadísticas grupales de T de muestras independientes para ancho pronoto en adultos B

	expuesto o control	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
ancho pterotorax adulto B mm	control	23	2,49713	,476641	,099387
	expuesto	23	2,52730	,364038	,075907

Tabla 41: Prueba de T de muestras independientes para ancho de pronoto de adultos B

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
						95% de intervalo de confianza de la diferencia				
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
ancho pterotorax adulto B mm	Se asumen varianzas iguales	3,602	,064	-,241	44	,810	-,030174	,125058	-,282213	,221865
	No se asumen varianzas iguales			-,241	41,150	,811	-,030174	,125058	-,282707	,222359

Tabla 42: Estadísticas grupales de T de muestras independientes para largo pronoto en adultos A

	expuesto o control	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
largo pterotorax adulto A mm	control	24	3,56163	,637095	,130046
	expuesto	23	3,60943	,549231	,114523

Tabla 43: Prueba de T de muestras independientes para largo de pronoto de adultos A

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
						95% de intervalo de confianza de la diferencia				
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior

largo pterotorax adulto A mm	Se asumen varianzas iguales	1,488	,229	-,275	45	,785	-,047810	,173841	-,397943	,302323
	No se asumen varianzas iguales			-,276	44,516	,784	-,047810	,173284	-,396927	,301308

Tabla 44: Estadísticas grupales de T de muestras independientes para largo pronoto en adultos B

	expuesto o control	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
largo pterotorax adulto B mm	control	23	3,35630	,600340	,125180
	expuesto	23	3,48113	,554816	,115687

Tabla 45: Prueba de T de muestras independientes para largo de pronoto de adultos B

		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias				95% de intervalo de confianza de la diferencia		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
largo pterotorax adulto B mm	Se asumen varianzas iguales	,281	,598	-,732	44	,468	-,124826	,170451	-,468347	,218695
	No se asumen varianzas iguales			-,732	43,729	,468	-,124826	,170451	-,468407	,218755

Tabla 46: Correlación de Pearson para largo máximo y ancho pronoto adulto A

expuesto o control			largo adulto A mm	ancho pterotorax adulto A mm
control	largo adulto A mm	Correlación de Pearson		1
		Sig. (bilateral)		,852**
		N	24	24
	ancho pterotorax adulto A mm	Correlación de Pearson	,852**	1
		Sig. (bilateral)	,000	
		N	24	24

expuesto	largo adulto A mm	Correlación de Pearson	1	,722**
		Sig. (bilateral)		,000
		N	23	23
	ancho pterotorax adulto A mm	Correlación de Pearson	,722**	1
		Sig. (bilateral)	,000	
		N	23	23

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Tabla 47: Correlación de Pearson para largo máximo y ancho pronoto adulto B

expuesto o control			largo adulto B mm	ancho pterotorax adulto B mm
control	largo adulto B mm	Correlación de Pearson	1	,822**
		Sig. (bilateral)		,000
		N	23	23
	ancho pterotorax adulto B mm	Correlación de Pearson	,822**	1
		Sig. (bilateral)	,000	
		N	23	23
expuesto	largo adulto B mm	Correlación de Pearson	1	,678**
		Sig. (bilateral)		,001
		N	21	21
	ancho pterotorax adulto B mm	Correlación de Pearson	,678**	1
		Sig. (bilateral)	,001	
		N	21	23

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Tabla 48: Correlación de Pearson para largo máximo y largo de pronoto en adulto A

expuesto o control			largo adulto A mm	largo pterotorax adulto A mm
control	largo adulto A mm	Correlación de Pearson	1	,892**
		Sig. (bilateral)		,000
		N	24	24
	largo pterotorax adulto A mm	Correlación de Pearson	,892**	1
		Sig. (bilateral)	,000	
		N	24	24
expuesto	largo adulto A mm	Correlación de Pearson	1	,697**
		Sig. (bilateral)		,000
		N	23	23
	largo pterotorax adulto A mm	Correlación de Pearson	,697**	1
		Sig. (bilateral)	,000	
		N	23	23

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Tabla 49: Correlación de Pearson para largo máximo y largo de pronoto en adulto B

expuesto o control			largo adulto B mm	largo pterotorax adulto B mm
control	largo adulto B mm	Correlación de Pearson	1	,810**
		Sig. (bilateral)		,000
		N	23	23
	largo pterotorax adulto B mm	Correlación de Pearson	,810**	1
		Sig. (bilateral)	,000	
		N	23	23
expuesto	largo adulto B mm	Correlación de Pearson	1	,862**
		Sig. (bilateral)		,000
		N	21	21
	largo pterotorax adulto B mm	Correlación de Pearson	,862**	1
		Sig. (bilateral)	,000	
		N	21	23

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Tabla 50: Correlación de Pearson para ancho y largo de pronoto adulto A

expuesto o control			ancho pterotorax adulto A mm	largo pterotorax adulto A mm
control	ancho pterotorax adulto A mm	Correlación de Pearson	1	,868**
		Sig. (bilateral)		,000
		N	24	24
	largo pterotorax adulto A mm	Correlación de Pearson	,868**	1
		Sig. (bilateral)	,000	
		N	24	24
expuesto	ancho pterotorax adulto A mm	Correlación de Pearson	1	,607**
		Sig. (bilateral)		,002
		N	23	23
	largo pterotorax adulto A mm	Correlación de Pearson	,607**	1
		Sig. (bilateral)	,002	
		N	23	23

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Tabla 51: Correlación de Pearson para ancho y largo de pronoto adulto B

expuesto o control			ancho pterotorax adulto B mm	largo pterotorax adulto B mm
control	ancho pterotorax adulto B mm	Correlación de Pearson	1	,794**

		Sig. (bilateral)		,000
		N	23	23
	largo pterotorax adulto B mm	Correlación de Pearson	,794**	1
		Sig. (bilateral)	,000	
		N	23	23
expuesto	ancho pterotorax adulto B mm	Correlación de Pearson	1	,841**
		Sig. (bilateral)		,000
		N	23	23
	largo pterotorax adulto B mm	Correlación de Pearson	,841**	1
		Sig. (bilateral)	,000	
		N	23	23

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).