

estando considerado este último insecto como un excelente hospedador por lo que ha sido utilizado para el cultivo "in vivo" del nematodo.

La inexistencia de diferencias estadísticamente significativas en la producción de formas infectivas en relación con la dosis del inóculo, podría deberse a que en los steinernemátidos el tamaño de las hembras está determinado por la cantidad de alimento disponible (Wouts, 1984) y el tamaño de las hembras puede afectar al número de formas infectivas producidas. Puesto que la cantidad de alimento disponible depende del nivel poblacional existente, este fenómeno tenderá a igualar la producción final de formas infectivas a diferentes concentraciones iniciales de infección.

Sin embargo también hemos constatado una manifiesta tendencia (aunque no significativa) a obtener un mayor número de formas infectivas cuanto mayor es la dosis del inóculo. Este hecho también fue observado por Zervos et al. (1991) en *S. glaseri* sobre larvas de *Galleria mellonella*. Esta menor producción de formas infectivas a bajas concentraciones del inóculo puede reflejar una cierta dificultad por parte de los nematodos en aparearse cuando existen niveles poblacionales muy bajos al inicio de la infección. Esta dificultad en encontrar pareja también podría provocar un retraso en la salida de las primeras formas infectivas como hemos podido comprobar que ocurría en nuestro ensayo.

Los resultados obtenidos en los ensayos de campo con una reducción de la población entre el 24 y el 71% en una única aplicación de los nematodos, nos indica una prometedora eficacia para su utilización a gran escala.

Sin embargo, Tanada y Reiner (1960) y posteriormente Bari y Kaya (1984) observaron que en el caso de otro taladro de la alcachofa *Platyptilia carduidactyla* (Lep. Pterophoridae) cuando las larvas alcanzan el botón floral quedan protegidas de la infección de los nematodos. En nuestras observaciones de campo también hemos detectado la dificultad de que los nematodos penetren en las galerías realizadas por las larvas en la parte aérea de la planta, debido principalmente a que la entrada de estas galerías suele estar obstruida por los excrementos de la propia larva. No obstante, como muestra nuestro estudio, la utilización de los nematodos puede ser muy eficaz contra aquellas larvas de estadios

avanzados que permanecen en la parte inferior o subterránea de la planta después de su poda para el rebrote del próximo año. En estos casos las galerías quedan al descubierto por lo que el nematodo puede penetrar fácilmente hasta localizar a la larva y provocar su muerte, llegando a ser así un eficaz agente de control biológico de este insecto.

### 6.2.3. UTILIZACIÓN DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE LA POLILLA DEL PUERRO, *Acrolepiopsis assectella* Zeller. (Lepidoptera: Plutellidae).

#### 1) Introducción

La polilla del puerro, *Acrolepiopsis assectella* Zeller (Lepidoptera: Plutellidae), es uno de los insectos que ocasiona daños más importantes en el cultivo del puerro (*Allium porrum*), causando graves pérdidas tanto en las plantas de primer año destinadas al consumo, como en las plantas de segundo año destinadas a la producción de semillas.

Las larvas jóvenes de este lepidóptero viven como minadoras en el parénquima foliar, para posteriormente introducirse en las vainas de las hojas hasta llegar a alcanzar el cogollo de la planta. El crecimiento del vegetal es entonces lento, las hojas exteriores amarillean y las del centro presentan perforaciones o adelgazamientos longitudinales que impiden su comercialización (Bovey, 1984).

Debido al hábitat críptico en que se desarrollan las larvas de este insecto, la lucha contra esta plaga se ha centrado en la utilización de insecticidas químicos con gran poder de penetración. Sin embargo, estos productos únicamente son efectivos contra los primeros estadios larvarios (Bonnemaison, 1976), poseen un plazo de seguridad elevado, y presentan conocidos problemas de contaminación ambiental (Bovey, 1984). Por todo ello, se hace necesario profundizar en el estudio de métodos más eficaces e inocuos para la lucha contra esta plaga, que implican la consideración de los sistemas de control biológico.

En este contexto se encuentran los trabajos realizados por Laumond et al (1972, 1979) sobre la susceptibilidad en el laboratorio de dos especies de la familia Plutellidae (*Plutella maculipennis* y *Acrolepiopsis assectella*) al nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae*.

En el presente trabajo se analiza la eficacia en el laboratorio, en maceta y en el campo de una cepa autóctona del nematodo entomopatógeno *S. feltiae* en el control de *Acrolepiopsis assectella*.

## 2) Materiales y Métodos

El nematodo entomopatógeno utilizado en estos ensayos, es a una cepa de *Steinernema feltiae* aislada en el suelo de un cultivo de viña en el término municipal de Vilafranca del Penedès (Barcelona). Dicho nematodo fue reproducido en el laboratorio sobre larvas del lepidóptero *Galleria mellonella* siguiendo la técnica de Dutky et al (1964). Las formas infectivas del nematodo se guardaron a una temperatura entre 7 y 10°C en disolución de 0,1% de formol hasta el momento de su utilización. La viabilidad de los nematodos después de su almacenamiento fue comprobada antes de su aplicación.

### A.- Prueba de laboratorio.

Las larvas de *Acrolepiopsis assectella* utilizadas en esta prueba fueron recogidas en una plantación de puerros situada en el Prat de Llobregat (Barcelona), e inmediatamente fueron llevadas al laboratorio para ser sometidas a la prueba de infectabilidad con el nematodo

Para esta prueba se colocaban cinco larvas de últimos estadios de *A. assectella* en cámaras de infección que consistían en placas de Petri de 7 cm de diámetro con dos piezas de papel de filtro esterilizado donde se pipeteaba 1,5 ml de suspensión acuosa de nematodos a diferentes concentraciones: 10, 20, 50, 100, 250, 500 y 1000 nematodos. Cada serie de concentración contaba con tres réplicas, al igual que la serie testigo, que sólo contenía 1,5 ml de disolución acuosa de formol al 0,1%. Las dos primeras dosis (10 y 20 nematodos por placa), se obtuvieron por cómputo individual de los nematodos, mientras que las demás concentraciones fueron obtenidas por métodos volumétricos (mediante la cámara de Mac Master).

Todas las placas se colocaron en una cámara climatizada que mantenía una temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ , una humedad relativa del aire entre 60-70% y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, realizándose controles cada 24 horas para la observación de síntomas y mortalidad de las larvas.

B.- Prueba en maceta.

Para realizar el ensayo en maceta, se recogieron puerros atacados por *Acrolepiopsis assectella* de un campo situado en el Prat de Llobregat (Barcelona), siendo transplantados posteriormente de forma individual a macetas de 1 litro de capacidad para su mantenimiento en el laboratorio.

Se realizó una aplicación foliácea con el nematodo *Steinernema feltiae* en 25 plantas, dejando sin tratar otras cinco como testigo. En base a los resultados obtenidos en la prueba de susceptibilidad de laboratorio y las referencias bibliográficas de utilización de nematodos entomopatógenos en cultivos similares, la dosis empleada por puerro fue de 30.000 nematodos en 30 ml. de agua con un 0,025 % de agente humectante "Bayer". La aplicación de los nematodos se realizó con un pulverizador manual para plantas de hogar. Las macetas se mantuvieron en una terraza al aire libre durante todo el experimento, con una temperatura media de 23,5 °C (Min. 15°C Máx. 29°C).

A los 5 días del tratamiento fueron analizados los puerros, sometiéndolos a una minuciosa disección para determinar el número de larvas vivas y muertas existentes, examinando posteriormente la presencia de nematodos en el interior de las larvas encontradas muertas.

C.- Prueba de campo.

Las pruebas de campo se realizaron en noviembre de 1988 (Ensayo I) y en septiembre de 1989 (Ensayo II) en un cultivo comercial de puerros situado en el término municipal de Vilasar de Mar (Barcelona).

El ensayo I se realizó sobre parcelas elementales de 2 m<sup>2</sup>, con cuatro repeticiones, que contenía aproximadamente 60 puerros con un elevado ataque de *Acrolepiopsis assectella*. La dosis utilizada por parcela fue de 1,75 millones de nematodos en 900 cc de agua con 0,05% de agente humectante (aproximadamente 30.000 nematodos/puerro), aplicado con un pulverizador manual de mochila.

La eficacia del tratamiento con el nematodo fue comparada con la aplicación de *Bacillus thuringiensis* (var. *kurstaki*) (BACTOSPEINE, Agrocros) a una concentración total de 2,4 gr. en 1.600 ml de agua en cuatro parcelas similares a las anteriores.

También se delimitaron cuatro parcelas sin tratar para ser utilizadas como testigo.

Al cabo de 7 días del tratamiento fueron recogidos al azar un número determinado de puerros de cada parcela para ser analizados en el laboratorio mediante una minuciosa disección de los mismos (Tabla 6.7). Debido al elevadísimo ataque que presentaban los puerros tratados, no aptos para su comercialización, nos limitamos únicamente a determinar el porcentaje de mortalidad de las larvas de *A. assectella* que producían la aplicación de los productos utilizados.

El ensayo II se realizó sobre puerros de tamaño adecuado para su comercialización, que comenzaban a manifestar un ligero ataque de *A. assectella* y que no habían sido tratados durante su desarrollo.

El diseño experimental se realizó en bloques al azar con cinco repeticiones en parcelas elementales de 2m<sup>2</sup> que contenían unos 80 puerros. La dosis utilizada por parcela fue de 3 millones de nematodos en 1,2 litros de disolución acuosa con 0,05% de agente humectante (aproximadamente 35.000 nematodos/puerro) y aplicada de forma similar al ensayo I. La eficacia del tratamiento se contrastó con cinco parcelas testigos que no sufrieron ningún tipo de tratamiento.

A los nueve días del tratamiento se recogieron al azar 10 puerros de cada parcela, examinando el número de larvas vivas por puerro y mediante la fórmula de Abbott determinar la eficacia del tratamiento.

Las aplicaciones de los nematodos en los ensayos de campo se realizaron a última hora de la tarde para evitar la excesiva desecación y la radiación ultravioleta del sol.

En ambos ensayos, y previamente al tratamiento, se recogieron muestras de suelo de las parcelas para determinar la posible presencia natural de nematodos entomopatógenos. También se determinó la persistencia de los nematodos aplicados, tanto en la planta como en el suelo, mediante un seguimiento periódico de los puerros tratados y el análisis de muestras de suelo de las parcelas de los ensayos mediante el método de "trampa de *Galleria*".

Durante todo el desarrollo de las pruebas se registraron los datos climáticos (temperatura y precipitación) que pueden influir en la eficacia de los nematodos.

#### D.- Análisis estadísticos.

Las diferencias entre las medias del porcentaje de mortalidad en función de la concentración de nematodos en las pruebas de laboratorio y del tratamiento realizado en los ensayos de campo, se contrastaron, después de la transformación arco seno de los porcentajes, con un Análisis de la Varianza (ONEWAY. SPSS-PC) y sus medias fueron separadas por el test de rango múltiple de Duncan con una significación de  $p < 0,05$ .

### 3) Resultados

#### A.- Prueba de laboratorio.

Los resultados obtenidos en la prueba de laboratorio (tabla 6.5), mediante la aplicación, en placas de petri, de diferentes concentraciones de formas infectivas del nematodo *Steinernema feltiae* demuestran que las larvas de *A. assectella* son muy susceptibles a pequeñas concentraciones de este nematodo.

La mortalidad que provocan los nematodos a las 17 horas de ponerlos en contacto con las larvas de *Acolepiopsis*, difieren significativamente (Análisis de la varianza,  $p < 0,05$ ) en función de la concentración aplicada. A concentraciones de 500 y 1.000 nematodos por cámara de infección se obtiene un porcentaje de mortalidad significativamente mayor que con el resto de las concentraciones (tabla 6.5), mientras que la concentración de 10 nematodos por cámara de infección no produce mortalidad de las larvas de *Acrolepiopsis*, presentando un comportamiento similar a la serie control.

A las 40 horas del ensayo se siguen observando diferencias estadísticamente significativas (Análisis de la Varianza  $p < 0,05$ ), pudiendo comprobar que la concentración de 10 nematodos por cámara de infección presenta un mayor porcentaje de mortalidad que la serie testigo pero significativamente menor que las demás concentraciones, diferencias que se mantienen hasta el final del ensayo (87 horas), donde todas las concentraciones presentan un porcentaje de mortalidad similar y significativamente mayor que la serie testigo (fig. 6.5).

Tabla 6.5. Infección de las larvas de *Acrolepiopsis* a diferentes concentraciones del inoculo en la prueba de laboratorio.

DOSIS (nem./placa)	DOSIS (nem./larva)	DOSIS (nem./ cm <sup>2</sup> )	17 horas	40 horas	65 horas	87 horas
control	0	0.00	0.0 (a)	0.0	6.7	13.3
10	2	0.26	0.0 (a)	46.7 (a)	63.3 (a)	80.0 (a)
20	4	0.52	13.3 (a)(b)	86.7 (b)	86.7 (a)(b)	86.7 (a)(b)
50	10	1.30	33.3 (a)(b)(c)	93.3 (b)	100.0 (b)	100.0 (b)
100	20	2.60	33.3 (a)(b)(c)	93.3 (b)	100.0 (b)	100.0 (b)
250	50	6.50	33.3 (a)(b)(c)	86.7 (b)	93.3 (b)	93.3 (b)
500	100	13.00	60.0 (b)	86.7 (b)	93.3 (b)	93.3 (b)
1.000	200	26.00	66.6 (c)	100.0 (b)	100.0 (b)	100.0 (b)

(\*) Medias seguidas por la misma letra, no presentan diferencias significativas, según el test de Duncan, para una  $p < 0,05$ .

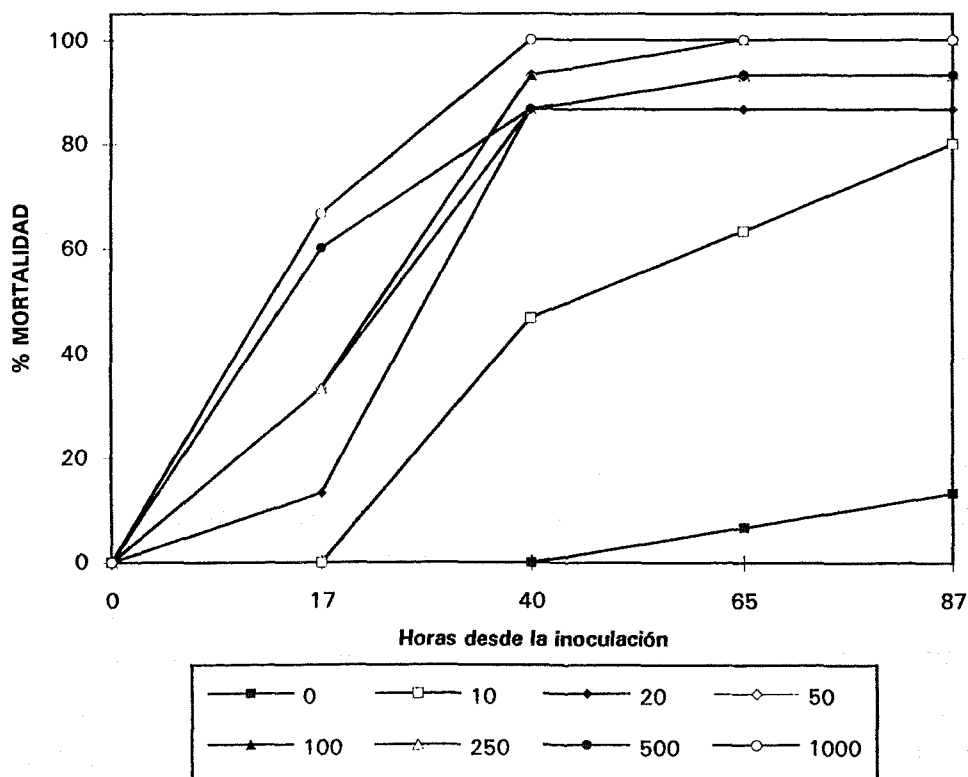


Figura 6.5. Evolución de la mortalidad de las larvas de *Acrolepiopsis* a diferentes concentraciones de inoculo de nematodos.



**B.- Prueba en maceta**

Los resultados obtenidos en esta prueba se muestran en la tabla 6.6, donde se observa un elevado grado de parasitismo (97,62%) de las larvas que se encontraban en los puerros tratados con el nematodo, frente a la nula mortalidad de las larvas de la serie control.

Tabla 6.6. Eficacia de la aplicación del nematodo en puerro infestados por *Acrolepiopsis* trasplantados a macetas.

TRATAMIENTO	PUERROS ANALIZADOS	LARVAS VIVAS	LARVAS MUERTAS	% PARASITISMO
<i>S. feltiae</i>	25	1	41	97,6
Testigo	5	14	0	-

En cuanto a la persistencia de las formas infectivas en las hojas de los puerros tratados, el análisis minucioso de los mismos detectó la presencia de formas infectivas vivas 5 días después de haberse realizado el tratamiento.

**C.- Pruebas de campo**

Los resultados del ensayo I y el ensayo II de las pruebas de campo se muestran en las tablas 6.7 y 6.8 respectivamente. En el ensayo I el porcentaje de mortalidad de las larvas de *A. assectella* debido a la aplicación del nematodo alcanza el 58,75 %, el cual difiere significativamente, según el test de rango múltiple de Duncan ( $p < 0,05$ ), del porcentaje de mortalidad obtenido por *Bacillus thuringiensis* (5%) y del encontrado en las parcelas testigo (1,02%). Mientras que la mortalidad obtenida por *B. thuringiensis* no difiere significativamente de la encontrada en las parcelas testigo.

Tabla 6.7. Eficacia de la aplicaci6n de campo del nematodo en puerro infestados por *Acrolepiopsis*. (Ensayo I).

TRATAMIENTO	Puerros	Larvas		% Mortalidad
	Analizados	Vivas	Muertas	
<i>S. feltiae</i>	126	297	423	58,75
<i>B. thuringiensis</i>	60	912	47	5,00 (a)
Testigo	84	1641	17	1,02 (a)

(\*) Medias seguidas por la misma letra, no presentan diferencias significativas, seg6n el test de Duncan, para una  $p < 0,05$ .

La climatolog6a durante los d6as en que transcurri6 el ensayo I fue muy adversa para la aplicaci6n de cualquier producto fitosanitario tanto qu6mico como biol6gico (fig. 6.6). La temperatura media oscil6 entre 3 y 18 °C, mientras que la temperatura m6xima registrada no super6 los 20 °C y la m6nima alcanz6 los -1,5 °C. En cuanto a la precipitaci6n recogida durante la realizaci6n del ensayo, cabe destacar la enorme precipitaci6n de 140 litros/m<sup>2</sup> registrada dos d6as despu6s de la aplicaci6n del nematodo (fig. 6.7).

El an6lisis del suelo de las parcelas donde se realiz6 el ensayo demostr6 la no presencia de estos nematodos entomopat6genos previamente a la aplicaci6n de los mismos en el ensayo. Sin embargo su presencia en el suelo de las parcelas tratadas se pudo comprobar hasta 34 d6as despu6s de su aplicaci6n.

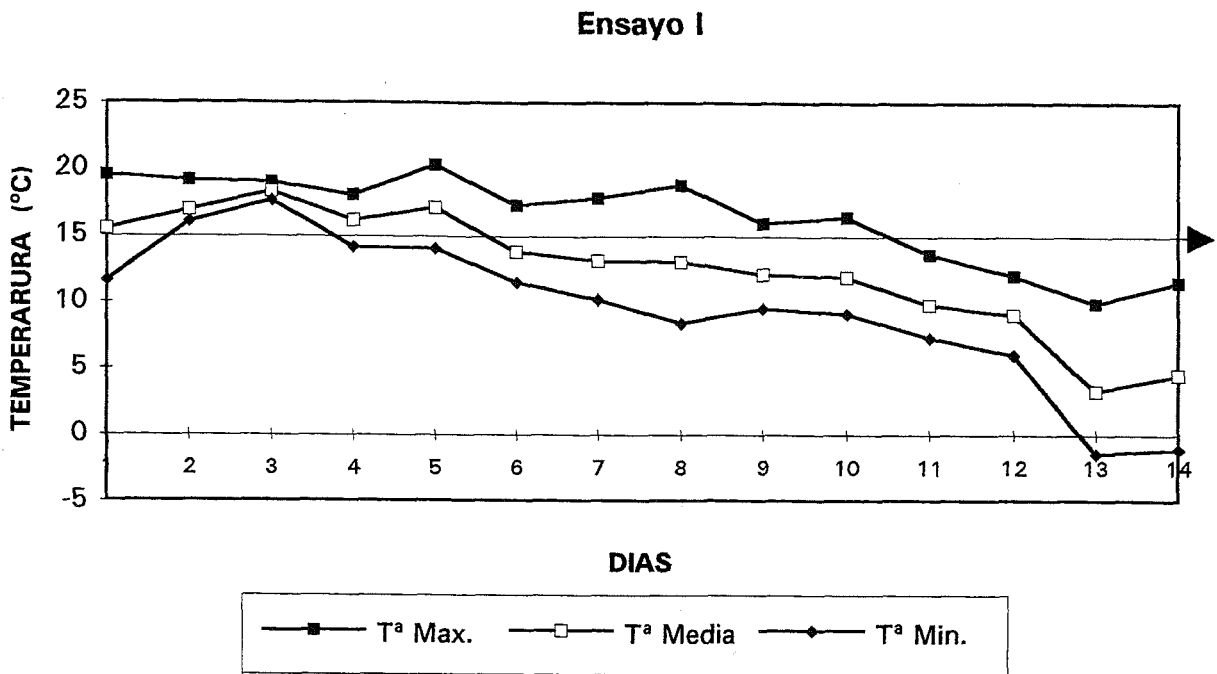


Figura 6.6. Temperaturas registradas durante los días en que se llevó a cabo el Ensayo I.

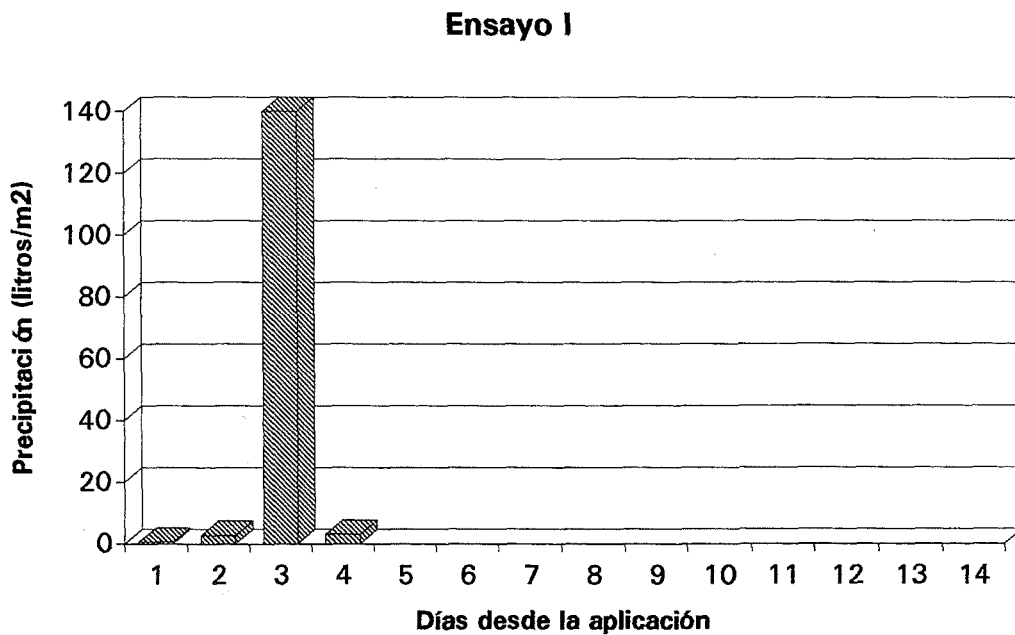


Figura 6.7. Pluviometría registrada durante los días en que se llevó a cabo el Ensayo I.

En el ensayo II donde las condiciones climáticas fueron más favorables (fig. 6.8), se obtuvo una eficacia, según la fórmula de Abbott, del 70,5% de reducción de la plaga (tabla 6.8).

En cuanto a la supervivencia de las formas infectivas de los nematodos entre las hojas de los puerros en el campo, hemos observado la presencia de nematodos vivos 20 días después de la aplicación de los mismos.

Tabla 6.8. Eficacia de la aplicación de campo del nematodo en puerro infestados por *Acrolepiopsis*. (Ensayo II).

TRATAMIENTO	Puerros Analizados	Larvas vivas/puerro	% Eficacia (1)
<i>S. feltiae</i>	51	2,8 ± 2,3	70,5
Testigo	49	9,7 ± 6,6	-

(1) Según la fórmula de Abbott.

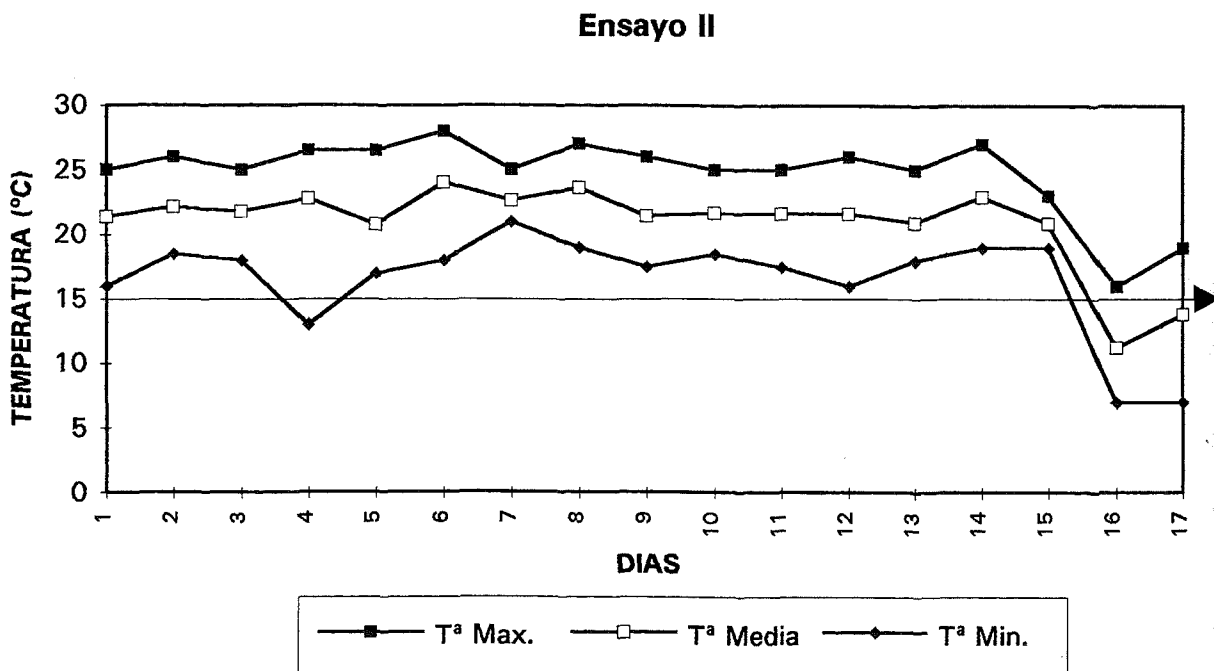


Figura 6.8. Temperaturas registradas durante los días en que se llevó a cabo el Ensayo II.

#### 4) Discusión

A la vista de los resultados obtenidos, podemos afirmar que las larvas del lepidóptero *Acrolepiopsis assectella* son muy susceptibles a la infección con el nematodo *Steinernema feltiae*, tanto en el laboratorio como en condiciones naturales.

Las pruebas realizadas en el laboratorio, donde se han eliminado las posibles barreras naturales que pueden interferir en la eficacia de los nematodos, nos dan una elevadísima mortalidad (90-100%) incluso a bajas concentraciones del nematodo. Estos resultados están de acuerdo con las experiencias realizadas por Laumond et al (1979) en Antibes, donde observó una "fuerte infección" del nematodo *Neoaplectana carpocapsae* (= *Steinernema feltiae*) a las larvas y adultos de *Acrolepia assectella* (= *Acrolepiopsis assectella*).

Las experiencias que hemos realizado en puerros plantados en maceta, en unas condiciones naturales simuladas, pone de manifiesto la gran eficacia que poseen los nematodos entomopatógenos en el control de insectos que se desarrollan en hábitats crípticos (Kaya, 1985), como es el caso de *A. assectella* que se encuentra protegido en galerías entre las imbricadas hojas de los puerros, donde otros productos no pueden acceder.

Los resultados de campo obtenidos en el ensayo I, muestran una moderada mortalidad (59%) de las larvas de *A. assectella* después de la aplicación de los nematodos, significativamente mayor a la obtenida por *Bacillus thuringiensis*. No obstante, la eficacia de los nematodos en esta prueba es significativamente menor a la obtenida, en condiciones más controladas, en la prueba en maceta, por lo que cabría pensar en la existencia de unos factores negativos, presumiblemente condiciones ambientales, que han reducido la eficacia del nematodo. Esta teoría vendría apoyada por la escasa eficacia observada en la aplicación de *Bacillus thuringiensis*, no significativamente diferente a la mortalidad natural obtenida en la serie control.

De los factores ambientales que han podido influir en la reducción de la eficacia del nematodo, destacan dos: la precipitación y la temperatura.

En cuanto a la precipitación, la lluvia caída los días posteriores a la aplicación del nematodo, y en especial los 140 litros/m<sup>2</sup> registrados dos días después del tratamiento, pudo tener un efecto de lavado de los puerros, reduciendo en gran medida la dosis inicial de aplicación del nematodo, lo que pudo provocar una reducción de su eficacia.

Por lo que se refiere a la temperatura cabe señalar que, aunque cada cepa de nematodo está adaptada a la temperatura propia de su lugar de origen, Kaya (1985), Georgis (1987) y Hague et al (1991) sostienen que la temperatura óptima de actuación del nematodo *Steinernema feltiae*, se encuentra entre 22 y 32 °C, mientras que a temperaturas inferiores a los 15 °C puede existir una reducción de la eficacia del nematodo. Como hemos visto en la figura 6.6, las temperaturas durante la realización del ensayo estuvieron, la mayor parte del tiempo, por debajo de estos 15 °C que limitan la eficacia de los nematodos.

En el ensayo II, donde las condiciones climáticas no fueron tan adversas como en el ensayo I, se obtuvo una mayor eficacia con un 70,5% de reducción de la plaga. Estos resultados de campo están en concordancia con los trabajos realizados por Laumond (1972) que, aunque de forma poco concreta, observó una "mortalidad muy elevada" de las larvas de *A. assectella* en el momento de la ninfosis en aplicaciones de campo de los nematodos steinernemátidos.

Otro aspecto a considerar es la persistencia de los nematodos después de su aplicación en el campo. Como vimos en un apartado anterior, las aplicaciones de nematodos entomopatógenos en la superficie foliácea dan lugar a una corta persistencia de estos nematodos. Glazer y Navon (1990) determinaron un periodo de supervivencia de 8 horas para las formas infectivas de *S. carpocapsae* sobre hojas de judía, mientras que Yamanaka et al (1986) observaron como en condiciones de elevada humedad y moderada o baja temperatura formas infectivas de *S. carpocapsae* aplicadas sobre las hojas de cerezo tenían una supervivencia entre 11 y 40 horas. La aplicación de estos nematodos sobre lugares más crípticos de los vegetales (grietas, galerías, etc.) arrojan una persistencia mayor. Agudelo-Silva et al (1987) comprobaron una persistencia de más de 9 días de las formas infectivas de *S. carpocapsae* aplicadas sobre grietas en el tronco de los almendros.

En el presente trabajo sobre *A. assectella*, a pesar de tratarse de una aplicación foliácea, debido a la particular disposición imbricada de las hojas de los puerros, los nematodos pueden refugiarse entre las mismas en condiciones de elevadísima humedad y protegidos de la radiación solar. Por ello los resultados obtenidos sobre la persistencia de *S. feltiae* en la aplicación contra *A. assectella*, aunque parciales, nos muestran unos periodos mínimos observados de 20 días en las hojas de la planta y 34 días en el suelo de las parcelas del ensayo.

Esta elevada persistencia de los nematodos entre las hojas del puerro después de su aplicación, conjuntamente con su potencial de reciclado mediante su multiplicación en el insecto y su elevada eficacia, permiten a los nematodos mantener un dilatado periodo de protección del cultivo. Por este motivo, los nematodos podrían ser utilizados no únicamente en "acciones de choque" mediante la aplicación masiva de nematodos, sino también, aplicando un menor número de nematodos, en "acciones de inoculación" sobre las poblaciones de este insecto, aspecto que no hemos considerado en estos ensayos pero que merecería ser tomado en cuenta para próximas experiencias.





#### 6.2.4. UTILIZACIÓN DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DEL GUSANO CABEZUDO, *Capnodis tenebrionis* L. (Coleoptera: Buprestidae).

El gusano cabezudo, *Capnodis tenebrionis* L. (Coleóptera, Buprestidae) es uno de los insectos que pueden ocasionar un mayor daño en los árboles frutales de hueso (cerezo, albaricoquero, melocotonero, almendro, ciruelo) y excepcionalmente en frutales de pepita como manzano y peral. Balachowsky (1962) afirma que este insecto es una especie propia de los países del Mediterráneo, sin embargo su presencia ha sido señalada en varias regiones de la Europa continental. En España se ha comprobado su presencia en las comunidades autónomas de Cataluña, Andalucía, Extremadura, Murcia, Valencia, Aragón, Baleares y en Castilla la Mancha ocasionando graves daños en los frutales de hueso de muchas de sus provincias (Domínguez, 1989; Garrido, 1984).

Según ha descrito Garrido (1984), el ciclo biológico de este insecto comienza con la salida de los adultos de sus refugios hibernales a principios de la primavera. Inmediatamente los adultos se dirigen a las plantaciones de frutales en las que se alimentan de sus partes aéreas, peciolos de hojas o cortezas de las ramas de la última brotación. A los dos meses de la emergencia de los primeros invernantes, y previo acoplamiento de los sexos, se inicia la oviposición que se realiza preferentemente en el suelo en un radio de 60 cm alrededor de los árboles quedando los huevos enterrados entre 3 y 12 mm de profundidad. Los huevos suelen eclosionar a los 13 días de su puesta a una temperatura de entre 23 y 26 °C. Las larvas neonatas se dirigen a las raíces o tallos. Cuando éstas logran alcanzar un lugar donde nutrirse se instalan y comienzan a alimentarse en el interior de galerías donde pasarán todo su estado larvario y ninfal. A mediados de julio comienzan a realizar las cámaras pupales en el interior del árbol, a finales de agosto se produce la emergencia de los adultos que comienzan a alimentarse de las partes aéreas de los frutales y a finales de septiembre se dirigen a los refugios hibernales de donde saldrán al año siguiente para completar su ciclo. Existen larvas que no pueden llegar a completar su desarrollo en un sólo año y pasan el invierno en estado de larvas en el interior del tronco de los árboles. Por ello el ciclo tiene una duración de uno o dos

años en función de factores climáticos y/o alimenticios.

Los daños que ocasionan los adultos de este insecto son defoliaciones del árbol, que si bien no tienen excesiva importancia en plantaciones que están en producción, pueden ocasionar graves daños en plantaciones jóvenes o en viveros. Sin embargo los verdaderos daños al árbol vienen dados por las larvas. Las larvas del gusano cabezudo realizan grandes galerías ascendentes o descendentes en las raíces o en la zona del cuello del árbol, lo cual, y en función del grado de ataque que presente el árbol, puede ocasionar su muerte.

Dado el hábitat críptico en que se desarrollan las larvas de este insecto resulta muy difícil combatirlos. La utilización de diversos insecticidas químicos para su aplicación en el suelo no consiguen controlar esta plaga, por lo que Garrido et al (1990) indican la necesidad de efectuar intervenciones químicas únicamente contra los adultos.

Ante la dificultad que presenta la lucha contra este insecto y la importancia económica de sus daños, se hace necesario la búsqueda de métodos de control alternativos. En este sentido planteamos la utilización de nematodos entomopatógenos para la lucha contra el gusano cabezudo.

Los nematodos entomopatógenos han sido utilizados con gran eficacia en la lucha contra numerosos coleópteros que se desarrollan en el suelo o en galerías en el interior de las plantas (Klein, 1990). Sin embargo hasta el momento no existe ninguna referencia de la utilización de nematodos entomopatógenos contra el gusano cabezudo *Capnodis tenebrionis*. Del mismo modo, y a pesar de los numerosos trabajos realizados sobre la susceptibilidad de diferentes insectos a los nematodos entomopatógenos (Turco et al. 1970, Benham y Poinar 1973, Laumond et al. 1979, Wassink y Poinar 1984, Morris 1985), hasta el momento no se ha realizado ningún estudio para determinar la susceptibilidad de este insecto a estos nematodos.

En este estudio realizaremos dos ensayos encaminados a valorar la potencialidad de los nematodos entomopatógenos en la lucha contra *Capnodis tenebrionis*. El primer ensayo pretende determinar la susceptibilidad de las larvas de esta especie a los nematodos entomopatógenos, mientras que en el segundo ensayo valoraremos la utilización de estos nematodos en la lucha contra las larvas neonatas de *Capnodis*.

#### 6.2.4.1. SUSCEPTIBILIDAD DE LAS LARVAS DE ÚLTIMOS ESTADIOS DE *Capnodis tenebrionis* L. AL NEMATODO ENTOMOPATÓGENO *Steinernema feltiae*.

##### 1) Introducción

Durante una prospección de larvas de gusano cabezudo en una plantación de melocotoneros en Sant Sadurní d'Anoia nos encontramos una larva muerta con síntomas de estar parasitada por nematodos. Una vez en el laboratorio comprobamos la presencia del nematodo y determinamos la especie, confirmando que se trataba del nematodo entomopatógeno *Steinernema feltiae* (García del Pino, datos no publicados).

Este hecho nos alentó a iniciar el estudio de la susceptibilidad de las larvas de *Capnodis tenebrionis* a este nematodo.

##### 2) Materiales y Métodos

La cepa del nematodo *Steinernema feltiae* utilizada en estos ensayos, fue encontrada en una larva de gusano cabezudo parasitada de forma natural en el campo. Para la obtención de las formas infectivas necesarias para las pruebas, se realizó la producción *in vivo* del nematodo sobre larvas de *Galleria mellonella* siguiendo la técnica de Dutky et al (1964). Las formas infectivas del nematodo así obtenidas fueron guardadas en disolución acuosa al 0,1% de formol a una temperatura entre 7 y 10°C hasta el momento de su utilización. La viabilidad de los nematodos después de su almacenamiento fue comprobada antes de su aplicación.

Las larvas de *Capnodis tenebrionis* utilizadas en los ensayos fueron recogidas en un campo de melocotoneros del término municipal de Sant Sadurní d'Anoia (Alt Penedès) e inmediatamente llevadas al laboratorio para ser sometidas a las pruebas de susceptibilidad al nematodo. Estas pruebas se llevaban a cabo en cámaras de infección

consistentes en placas de Petri de 7 cm de diámetro con dos piezas de papel de filtro esterilizado donde se pipeteaba 1,5 ml de suspensión acuosa de nematodos. Las concentraciones utilizadas de nematodos fueron: 0.45, 0.9, 2.3, 4.1, 9.7, 20, 30, 40 y 90 nematodos/cm<sup>2</sup>. La serie testigo sólo contenía 1,5 ml de disolución acuosa de formol al 0,1%. En cada cámara de infección se introducían dos larvas de *Capnodis* de últimos estadios. Las placas se guardaban en una cámara climatizada que mantenía una temperatura de  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , una humedad relativa del aire entre 60-70% y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. A partir del segundo día de la infección y de forma diaria se controlaba la posible muerte de las larvas, comprobando a partir del décimo día la presencia de nematodos en su interior o la salida de las nuevas formas infectivas.

### 3) Resultados

Las larvas de últimos estadios de *Capnodis tenebrionis* han resultado ser muy susceptibles al nematodo *Steinernema feltiae*. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.9. Como se puede ver en la tabla, hemos detectado un 100% de parasitismo en todas las concentraciones ensayadas excepto en las dos concentraciones inferiores (9 y 18 nematodos por larva) donde se ha alcanzado el 50% de larvas infectadas por el nematodo. Estos elevados porcentajes de infección nos indican que los nematodos no presentan ninguna dificultad física o comportamental de penetrar en el interior de las larvas de últimos estadios del gusano cabezudo, ni existe ninguna respuesta inmunológica por parte de la larva que evite el desarrollo de los nematodos.

Tabla 6.9. Susceptibilidad de las larvas de últimos estadios de *Capnodis tenebrionis* a diferentes concentraciones del nematodo *S. feltiae* en el laboratorio.

CONCENTRACIÓN Nematodos/cm <sup>2</sup>	CONCENTRACIÓN Nematodos/larva	Nº LARVAS ENSAYADAS	Nº LARVAS PARASITADAS	% PARASITISMO
TESTIGO	0	6	0	-
0.45	9	2	1	50
0.9	18	2	1	50
2.3	45	2	2	100
4.1	80	4	4	100
9.7	190	4	4	100
20	380	10	10	100
30	600	2	2	100
40	770	2	2	100
90	1750	2	2	100

## 6.2.4.2. SUSCEPTIBILIDAD DE LAS LARVAS NEONATAS DE *Capnodis tenebrionis* L. A DIVERSOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS.

### 1) Introducción

La elevada susceptibilidad de las larvas de *Capnodis* a los nematodos entomopatógenos observada en el ensayo anterior, nos alentó a evaluar su eficacia en condiciones más naturales para su posible utilización en el control biológico de este insecto.

El primer aspecto a considerar era determinar el estadio de la vida del insecto sobre el cual dirigiríamos la lucha con nematodos entomopatógenos. Revisando la biología de este coleóptero nos pareció interesante intentar controlar al insecto en su primer estadio, antes de que penetrase en el interior del árbol y por lo tanto pudiera ser menos accesible para los nematodos.

Las larvas neonatas del gusano cabezudo tienen un tamaño medio de 3,5 mm de longitud y presentan una gran movilidad en sus desplazamientos por los intersticios del suelo para alcanzar las raíces del árbol. En este estado de "vida libre" la larva permanece durante dos o tres días hasta que logra penetrar en el interior del árbol (Garrido, 1984). Es precisamente en este periodo de migración por el suelo cuando podrían actuar los nematodos provocando la muerte de la larva neonata.

Aunque en el ensayo anterior hemos analizado la susceptibilidad de las larvas de *Capnodis* a estos nematodos, en el presente ensayo debemos comprobar la capacidad de infección de los nematodos sobre las larvas neonatas en condiciones naturales, ya que una excesiva movilidad o un reducido tamaño del hospedador pueden dificultar la infección de los nematodos (Georgis, 1987). Al mismo tiempo compararemos la eficacia de cinco nematodos entomopatógenos diferentes para determinar la especie o cepa de nematodo más idónea para la lucha contra este estadio del insecto.

## 2) Material y Métodos

Los nematodos utilizados en estos ensayos son los siguientes:

ESPECIE	CEPA	LUGAR DE ORIGEN
<i>Steinernema carpocapsae</i>	M137	Cataluña.
<i>Steinernema carpocapsae</i>	25	Ciba-Geigy <sup>(1)</sup>
<i>Steinernema feltiae</i>	S6	Salamanca.
<i>Steinernema anomali</i>	S2	Salamanca.
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	P4	Cataluña.

(1) Nematodo producido por Biosys (EEUU).

Todas las cepas ensayadas excepto *S. carpocapsae* (25), que se trata de una cepa comercial (EXHIBIT, Ciba-Geigy), fueron aisladas por nosotros mediante la técnica de "trampa de *Galleria*" en suelos del lugar de origen que refleja la tabla.

Los nematodos utilizados (a excepción de la cepa 25 de *S. carpocapsae*) fueron reproducidos en el laboratorio sobre larvas del lepidóptero *Galleria mellonella* siguiendo la técnica de Dutky et al (1964). Las formas infectivas así obtenidas fueron guardadas a una temperatura entre 7 y 10°C en disolución de 0,1% de formol o en esponja hasta el momento de su utilización. La viabilidad de los nematodos después de su almacenamiento fue comprobada antes de su aplicación.

Para la obtención de larvas neonatas de *Capnodis tenebrionis* se utilizó una variante del método de obtención de huevos desarrollado por Garrido et al. (1987). Esta técnica consistía en la captura en el campo de adultos del gusano cabezudo los cuales eran mantenidos en unos pequeños insectarios de 50x50x50 cm. En cada insectario se introducían seis parejas de adultos y se les suministraba ramas frescas del árbol como alimento y un recipiente con arena, previamente tamizada por un tamiz de 0,8 mm de luz, donde se realizaba la oviposición. Los huevos eran obtenidos mediante un nuevo tamizado de la arena y posteriormente mantenidos en cámaras de incubación a una temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  hasta el momento de la eclosión. Las larvas neonatas emergidas, eran inmediatamente sometidas a las pruebas de susceptibilidad a los nematodos.

En las pruebas de susceptibilidad se intentó reproducir las condiciones naturales en las que se encuentran las larvas neonatas de este insecto. Estas pruebas se realizaban en cámaras de infección consistentes en pequeños tubos de 2,5 cm de altura y 2 cm de diámetro en cuyo fondo se colocaba una larva neonata del gusano cabezudo y se cubría con 2,5cc de arena previamente esterilizada. En la superficie de la arena se introducía la suspensión acuosa de nematodos y se cubría con un trozo de parafilm para evitar su desecación.

Se han realizado dos ensayos con dos concentraciones de nematodos: 10 y 150 nematodos por larva. En el primer ensayo la concentración de nematodos (10 nematodos por larva) se calculó mediante su cómputo individual, mientras que en el segundo ensayo (150 nematodos por larva) se realizó mediante métodos volumétricos. Para cada cepa y concentración de nematodos se realizaron 24 repeticiones al igual que en la serie testigo donde únicamente se añadió agua. Las cámaras de infección se mantuvieron a una temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y en completa oscuridad.

Para evaluar la eficacia de cada cepa de nematodo, en el ensayo de 150 nematodos por larva, se controlaba diariamente la presencia de larvas parasitadas, comprobando mediante disección de las larvas encontradas muertas la presencia de nematodos en su interior. En la concentración menor de nematodos (10 nematodos por larva) no se realizaba este control diario para no modificar la estructura del sustrato (arena) y así evitar interferir el proceso de búsqueda de la larva por parte de los nematodos. En este caso se desenterraron las larvas al sexto día de su puesta en contacto con los nematodos comprobando la presencia de nematodos en su interior y determinando el número y sexo de los nematodos que habían logrado penetrar en cada larva.

#### **- Análisis estadísticos.**

Las diferencias entre el porcentaje de parasitismo en función de la cepa de nematodo utilizada en las dos concentraciones ensayadas fueron analizadas mediante la prueba  $X^2$  (CROSSTABS, SPSS-PC).

Las diferencias entre las medias de los parámetros estudiados para cada cepa de nematodo ensayada se contrastó con un Análisis de la Varianza (ONEWAY. SPSS-PC) y sus medias fueron separadas por el test de rango múltiple de Duncan.



### 3) Resultados

Las larvas neonatas de *Capnodis tenebrionis* han resultado ser susceptibles al parasitismo de los nematodos entomopatógenos. Las formas infectivas de todas las especies y cepas de nematodos estudiadas han podido penetrar y reproducirse en el interior de las larvas neonatas, a pesar de su reducido tamaño. En observaciones realizadas a las pocas horas de su puesta en contacto con los nematodos, hemos detectado la presencia de las primeras formas infectivas en el interior de la región cefálica de las larvas, lo que nos indica que la vía principal de entrada de las formas infectivas de los nematodos en las larvas neonatas de *Capnodis* es la boca.

En la prueba realizada con una concentración de 150 nematodos por larva, cuyos resultados se muestran en la tabla 6.10, destaca el elevado porcentaje de parasitismo conseguido a los cinco días por todas las cepas, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las cepas ensayadas ( $X^2$ ,  $p > 0,05$ ). Cabe señalar que el porcentaje de infección alcanza el 100 % en todos los casos excepto en aquellos en que una larva ha muerto por efecto de la manipulación antes de que los nematodos pudieran entrar en contacto con ella y por lo tanto no fue parasitada.

Las larvas neonatas de la serie testigo no sufrieron mortalidad hasta el cuarto día del ensayo con un 4,76% de larvas muertas y un 95,24% de larvas vivas. A los siete días de iniciado el ensayo únicamente existió un 36% de mortalidad de larvas de la serie testigo.

La velocidad de infección de las distintas cepas de nematodos, sin embargo, es diferente. En la figura 6.9 podemos apreciar como las dos cepas de *S. carpocapsae* (Exhibit y M137) presentan una mayor rapidez en parasitar y matar a sus hospedadores. A los dos días de su puesta en contacto con las larvas neonatas de *Capnodis* encontramos un 86 y 75% de infestación respectivamente frente al 32% de *S. anomali*, el 12,5% de *H. bacteriophora* o el 4% de *S. feltiae*. Sin embargo, y como hemos señalado anteriormente, al final del cuarto día se igualan los porcentajes de infección de todas las cepas.

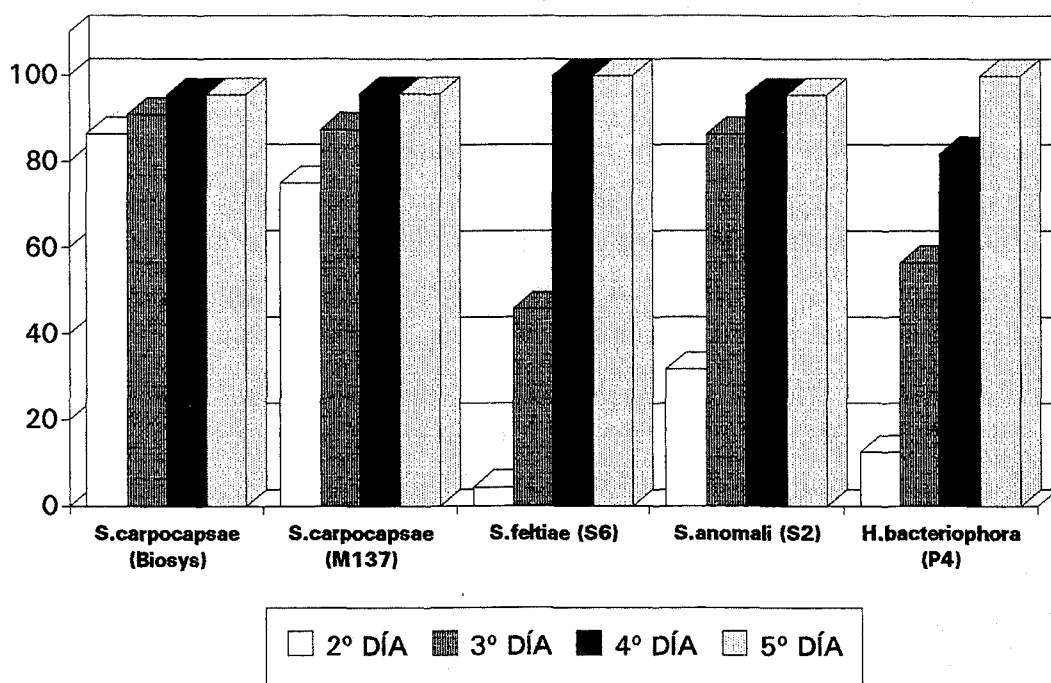


Figura 6.9. Evolución de la infección de las larvas neonatas de *Capnodis* por las distintas cepas de nematodos a una concentración del inóculo de 150 formas infectivas por larva.

Tabla 6.10. Eficacia de las diferentes especies y cepas de nematodos contra las larvas neonatas de *Capnodis*. Concentración utilizada: 150 formas infectivas por larva.

	<i>S.carpocapsae</i> Biosys	<i>S.carpocapsae</i> M137	<i>S.feltiae</i> S6	<i>S.anomali</i> S2	<i>H.bacteriophora</i> P4
<b>2 DIAS</b>	86.36% (19 de 22)	75% (18 de 24)	4.35% (1 de 23)	31.82% (7 de 22)	12.50% (3 de 24)
<b>3 DIAS</b>	90.91% (20 de 22)	87.50% (21 de 24)	45.83% (11 de 24)	86.36% (19 de 22)	56.52% (13 de 23)
<b>4 DIAS</b>	95.45% (21 de 22)	95.83% (23 de 24)	100% (22 de 22)	95.45% (21 de 22)	81.82% (18 de 22)
<b>5 DIAS</b>	95.45% (21 de 22)	95.83% (23 de 24)	100% (22 de 22)	95.45% (21 de 22)	100% (22 de 22)

En los ensayos en que utilizamos una concentración menor de nematodos (10 nematodos por larva) se pueden observar diferencias en cuanto a la capacidad de infección de las diferentes cepas ensayadas. Estas diferencias vienen referidas tanto a la mortalidad de las larvas, como a los demás parámetros considerados: 1) número de nematodos que han conseguido penetrar en el interior de la larva, 2) porcentaje de larvas parasitadas en que se podían encontrar en su interior nematodos de ambos sexos y 3) proporción de sexos de los nematodos encontrados en el interior de las larvas. (tabla 6.11).

Por lo que respecta a la mortalidad de las larvas neonatas de *Capnodis* detectamos un mayor porcentaje de parasitismo en aquellas larvas tratadas con *S. anomali* (90,91%) que con las demás cepas de nematodos ensayadas (fig. 6.10). Si bien esta diferencia únicamente es estadísticamente significativa frente al porcentaje de parasitismo de *S. carpocapsae* (59,10%) ( $X^2$ ,  $p > 0,05$ ), la mortalidad conseguida por *S. anomali* (90,91%) es considerablemente mayor a la obtenida por *S. feltiae* (76,19%) y *H. bacteriophora* (76,19%).

El número medio de nematodos que consiguen entrar en una larva neonata de *Capnodis* presenta diferencias estadísticamente significativas en función de la especie de nematodo de que se trate (Análisis de la varianza,  $p < 0,05$ ). Este número es significativamente mayor en el caso

de *S. anomali* (3,6 nematodos/larva) frente a *S. carpocapsae* (2,07 nematodos/larva) y *S. feltiae* (2,31 nematodos/larva) (Duncan,  $p < 0,05$ ) (fig. 6.11).

Tabla 6.11. Valoración de la capacidad de infección de diversas cepas de nematodos entomopatógenos a una concentración de 10 formas infectivas por larva neonata de *Capnodis*.

	DOSIS NEMATO./ LARVA	INFECCION <sup>(1)</sup>	Nº NEMATODOS INTERIOR LARVA (MIN-MAX)	ENCUENTRO DE SEXOS	PROPORCIÓN DE SEXOS
<i>S. carpocapsae</i>	10	59.10 % a (13 de 22)	2.07 ± 1.38 (1 - 6)	43.75 %	51.85% H 48.15% M
<i>S. feltiae</i>	10	76.19 % ab (16 de 21)	2.31 ± 1.08 (1 - 5)	30.77 %	72.97% H 27.03% M
<i>S. anomali</i>	10	90.91 % b (20 de 22)	3.60 ± 1.70 (2 - 9)	45 %	26.39% H 47.22% M 26.39% ju
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	10	79.19 % ab (16 de 21)	3.06 ± 1.98 (1 - 7)	100 % Hermafroditas	100% H Hermafroditas

(1) Porcentajes seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas para  $P < 0,05$ .

En cuanto a la probabilidad de que se encuentren nematodos de ambos sexos en el interior de una larva infectada, y por lo tanto exista la posibilidad de reproducirse, no hemos detectado diferencias entre las tres especies de *Steinernema* analizadas, oscilando esta probabilidad entre un 31% y un 45% de las larvas parasitadas. Únicamente existen diferencias con respecto a *H. bacteriophora* al tratarse ésta de una especie hermafrodita, por lo que la entrada de un único nematodo podrá dar lugar a su reproducción en el interior de la larva parasitada

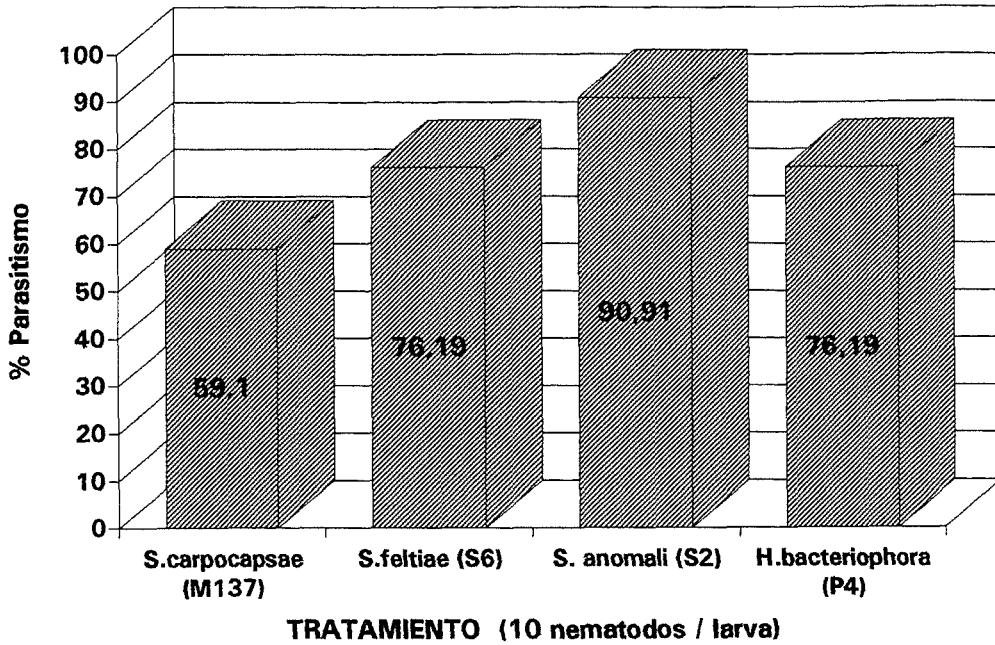


Figura 6.10. Infectabilidad de las larvas neonatas de *Capnodis* con una concentración de 10 formas infectivas por larva.

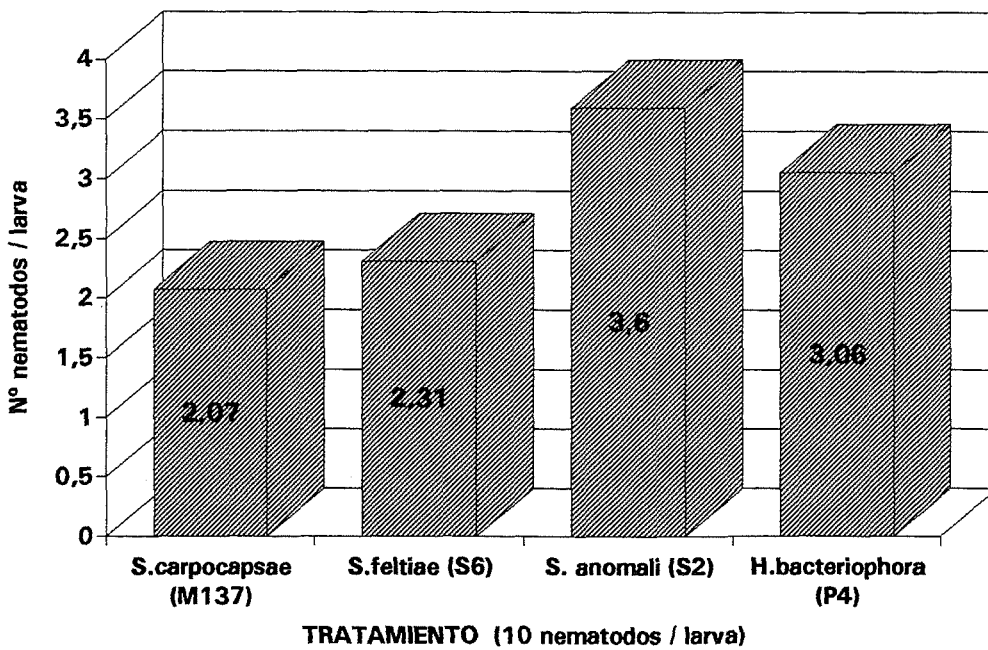


Figura 6.11. Capacidad de penetración de las formas infectivas de varias especies y cepas de nematodos en el interior de las larvas neonatas de *Capnodis*.

La proporción de sexos encontrada en las especies de *Steinernema* analizadas varía según la especie, *S. carpocapsae* presenta una proporción de sexos cercana al 50%, en *S. feltiae* encontramos una mayor proporción de hembras que de machos (2,7 H : 1 M), mientras que en *S. anomali* existe una mayor proporción de machos que de hembras ( 1 H : 1,8 M).

#### 4) Discusión

Las larvas neonatas del gusano cabezudo han resultado ser muy susceptibles a los nematodos entomopatógenos cuando se encuentran enterradas en el suelo que es su hábitat natural. La mayor velocidad en provocar la muerte de las larvas por parte de *S. carpocapsae* (tanto la cepa comercial como la cepa autóctona) a grandes concentraciones (150 nematodos/larva) nos indica la mayor capacidad de esta especie en penetrar y causar la muerte del insecto, quizás por su menor tamaño.

Sin embargo, cuando existen bajas concentraciones de nematodos (10 nematodos/larva) la probabilidad de encontrar al insecto disminuye, por lo que es necesario que se desarrolle el comportamiento de búsqueda de las formas infectivas de los nematodos. En estas condiciones *S. carpocapsae* ya no es tan efectiva (59%). Según han comprobado Lewis et al (1992) esta especie presenta un comportamiento de "emboscada" en la búsqueda del hospedador, adoptando una estrategia de "sentarse y esperar" a que aparezca el insecto. La adquisición de esta estrategia hace que *S. carpocapsae* tenga una menor respuesta de atracción hacia los diferentes productos de excreción de los insectos (Jackson y Brooks 1989, Gaugler et al. 1990, Georgis y Gaugler 1991, Lewis et al. 1993) así como una menor movilidad en el medio, prefiriendo buscar al hospedador en las proximidades de la superficie del suelo cerca de su lugar de aplicación (Moyle y Kaya, 1981, Georgis y Poinar, 1983, Molyneux y Bedding, 1984, Alatorre-Rosas y Kaya, 1990).

Por el contrario *S. anomali* ha resultado ser mucho más efectiva (91%) contra las larvas neonatas de *Capnodis* en estas condiciones de baja concentración de nematodos donde se precisa una mayor actividad de búsqueda del hospedador. Las formas infectivas de *S. anomali* pertenecerían al grupo de los nematodos entomopatógenos con un

comportamiento de "crucero", siendo especies que realizan grandes desplazamientos en la búsqueda del hospedador. Este comportamiento ha sido observado por Lewis et al. (1992) en *S. glaseri* (una especie muy próxima a *S. anomali*). Estos nematodos son fuertemente atraídos por todos los productos de excreción de los insectos, en particular por todos aquellos que contienen dióxido de carbono (Lewis et al. 1992, 1993), lo que les da una gran movilidad en el medio y una mayor eficacia en la búsqueda del hospedador. Al mismo tiempo tanto *S. glaseri* como *S. anomali* presentan unas formas infectivas de gran tamaño (llegando a duplicar el tamaño de *S. carpocapsae*) lo que les proporciona una mayor cantidad de reservas para sus desplazamientos (Kaya. 1990).

*H. bacteriophora* y *S. feltiae* han conseguido una considerable eficacia (76,2%) en nuestros ensayos a baja concentración (10 nematodos por larva) presentando un comportamiento parasitario intermedio entre *S. carpocapsae* y *S. anomali*.

*H. bacteriophora* está considerada como una especie adaptada a buscar sus hospedadores en las zonas profundas del suelo (Choo et al. 1989), por lo que puede ser incluida entre las especies con un comportamiento de búsqueda de "crucero".

Estas diferencias en el comportamiento de búsqueda de las diferentes especies de nematodos, tiene su influencia en el número de nematodos que logran encontrar al hospedador y por lo tanto también en el número de nematodos que encontramos en el interior del insecto. Así especies "crucero" como *S. anomali* o *H. bacteriophora* presentan un mayor porcentaje de formas infectivas que invaden el hospedador (eficacia en la invasión) con un 36% y 31% respectivamente, mientras que *S. feltiae* presenta un 23% y especies claramente de "emboscada" como *S. carpocapsae* presentan una menor eficacia de invasión con un 21% de las formas infectivas que se inocularon. Fan y Hominick (1991) y Epsky y Capinera (1993) afirman que la eficacia de invasión es un índice más sensible que la mortalidad del hospedador para determinar la actividad del nematodo, y estos últimos autores observaron como en el caso de *S. carpocapsae*, esta eficacia de invasión esta relacionada positivamente con el tiempo de exposición nematodo-insecto y el número de hospedadores por cámara de infección, y relacionado negativamente con el incremento del área de superficie de arena por hospedador de la

cámara de infección. Este último aspecto indica, como hemos visto en nuestro ensayo, la relación existente entre el comportamiento de búsqueda ("emboscada"/"crucero") y la eficacia de invasión.

La proporción de sexos en las diferentes especies de nematodos que hemos observado en el interior de las larvas neonatas de *Capnodis* es similar a la encontrada por Grewal et al. (1993) en diferentes especies de *Steinernema* que se desarrollaban sobre larvas de *Galleria mellonella* con una proporción de machos entre el 38-42%. Este ligero predominio de las hembras también ha sido observado por Gaugler et al (1990) en varias cepas de *S. carpocapsae* con un 54% de hembras, y por Bednarek et al (1986) en una cepa polaca de *S. carpocapsae* con un 57% de hembras. En nuestro trabajo, únicamente *S. anomali* presenta una proporción de sexos diferentes a las demás especies con un mayor número de machos (64%) que de hembras (36%). Sin embargo, es de destacar que en esta especie existe una elevada proporción de estados juveniles (26,4%) debido a que las formas infectivas entran de forma escalonada por lo que al cabo de los seis días del ensayo no han tenido tiempo a desarrollarse en adultos. Cuando estas formas juveniles pasen a adultos es de esperar que se desarrollen en hembras, ya que como han visto Grewal et al. (1993) en los nematodos entomopatógenos (steinernemátidos) las formas infectivas que dan lugar a machos se dispersan más rápidamente que las hembras y colonizan los insectos antes que ellas. Por ello, las primeras formas infectivas que invadieron las larvas neonatas de *Capnodis* se desarrollaron en machos dando este elevado número de machos, pero es de suponer que esta proporción quede equilibrada cuando estas formas juveniles alcancen el estado adulto.

Para finalizar, comentaremos que la elevada susceptibilidad encontrada en las larvas neonatas de *Capnodis tenebrionis* a las dos concentraciones ensayadas; 10 nematodos por cámara de infección, equivalente a una concentración de campo de 36.000 nematodos en un radio de 60 cm alrededor del árbol, y de 150 nematodos por cámara de infección, equivalente a una aplicación de campo de 500.000 nematodos/árbol, hacen prever excelentes resultados en una futura aplicación en el campo. Sin embargo, y a pesar de que en estos ensayos de laboratorio hemos intentado imitar las condiciones naturales en que se encuentra el insecto, existen factores ambientales y bióticos que pueden



limitar la eficacia de los nematodos en el campo. Estos factores se han evitado en los ensayos de laboratorio mediante el control de humedad y temperatura o la eliminación de posibles patógenos o depredadores mediante la esterilización de la arena utilizada en las cámaras de infección, pero pueden tener una importancia que no podemos despreciar. No obstante si consideramos una aplicación en el campo de estos nematodos, es posible reducir al máximo los factores limitantes ambientales mediante la formulación de los nematodos (protectores de UV, antidesecantes, etc.) o la metodología de aplicación (Georgis. 1990, Glazer 1991). Por lo que se refiere al efecto de los antagonistas como patógenos (virus, bacterias y hongos) y depredadores (ácaros, colémbolos, dorylaimidos) se podría minimizar al máximo mediante la utilización de una concentración de nematodos en donde la reducción por parte de los antagonistas no significara un descenso en la eficacia final de los mismos. En este sentido cabe señalar que la concentración utilizada en nuestro ensayo de 150 nematodos por cámara de infección (que correspondería a una aplicación de campo de 500.000 nematodos/árbol) donde hemos obtenido un 100 % de mortalidad en todas las cepas ensayadas, es la mitad de la concentración mínima (1.000.000 nematodos/árbol) recomendada en el campo contra diversas plagas del suelo.

Todos los aspectos considerados en el presente trabajo nos llevan a afirmar que los nematodos entomopatógenos pueden jugar un papel importante en el control de las larvas neonatas de *Capnodis tenebrionis*.

## **7.- CONCLUSIONES GENERALES**

1.- Los nematodos entomopatógenos están ampliamente distribuidos por Cataluña, con una frecuencia de aparición del 23,3% de las áreas muestreadas.

2.- Se ha detectado una mayor presencia de nematodos entomopatógenos en suelos situados a una mayor altitud, con menor temperatura media anual, y mayor precipitación. Aunque no se han detectado diferencias significativas en cuanto a su aparición en los tres hábitats analizados (bosque, prado natural y suelo cultivado), sin embargo, se ha observado una mayor abundancia de nematodos en los suelos cultivados. Es probable que este hábitat, a pesar de ser muy poco estable, tenga un mayor aporte de insectos que condicione la mayor abundancia de nematodos observada. Consideramos que el equilibrio entre las condiciones físico-ambientales y existencia de hospedadores, es el factor que determina la presencia o no de nematodos entomopatógenos en un determinado hábitat.

3.- La escasa presencia de nematodos entomopatógenos en los suelos de cultivos hortícolas del Baix Llobregat, y sobre todo del Maresme, viene determinada por la estrecha relación existente entre la aparición de estos nematodos y el uso indiscriminado de algunos productos fitosanitarios.

4.- En los campos de cultivos hortícolas analizados hemos detectado nematodos entomopatógenos en suelos preferentemente francos y franco limosos. Sin embargo, estos suelos presentan una elevada proporción de materia orgánica que configura la estructura de porosidad, permeabilidad y aireación que posibilita la presencia de nematodos entomopatógenos.

La elevada salinidad de los suelos muestreados, conjuntamente con las características climáticas de la zona (elevada temperatura, y clima litoral), condicionan la presencia mayoritaria de nematodos heterorhabdítidos frente a steinernemátidos.

Los demás parámetros considerados (pH, P, K) no parecen determinar la presencia de nematodos entomopatógenos en estos suelos.

5.- El estudio de la dinámica de las poblaciones naturales de nematodos entomopatógenos en suelos de cultivos hortícolas, muestra una clara estacionalidad en la aparición de estos nematodos, con una disminución

en los meses de julio y agosto, debido principalmente al aumento de la temperatura.

6.- La presencia del cultivo en el campo y de las labores culturales, no parecen influir en la aparición y persistencia de los nematodos entomopatógenos. La continuada presencia de estos nematodos en los campos analizados, indica la existencia de mecanismos adaptativos (mayor tolerancia hídrica y de temperatura, periodos de diapausa o quiescencia anhidrobiótica, etc.), que permiten la persistencia de las poblaciones naturales en las condiciones adversas y fluctuantes que presentan los campos cultivados.

Por ello, cuando se analiza la utilización de nematodos entomopatógenos en la lucha contra plagas de insectos, deben considerarse las poblaciones naturales presentes en la zona de estudio. Estas poblaciones presentarán una mayor persistencia, y por lo tanto, una mayor eficacia que aquellas introducidas artificialmente, no adaptadas a las condiciones propias del lugar de aplicación.

7.- Se han caracterizado un total de 35 cepas de nematodos entomopatógenos de la familia Steinernematidae pertenecientes a cinco especies:

- Se han descrito 24 cepas de la especie *Steinernema feltiae*, que corresponde al 69,5% de los nematodos de esta familia aislados en el presente estudio. La presencia de *S. feltiae*, que es la especie más frecuente, supone su primera cita para la Península Ibérica.

- Se han determinado cuatro cepas de *Steinernema carpocapsae* (8,3% de los steinernemátidos), siendo la primera cita de esta especie para la Península Ibérica.

- La especie *Steinernema intermedia* ha estado representada en el presente estudio por tres cepas que corresponden al 8,3% del total de steinernemátidos encontrados. Su presencia en Cataluña supone la primera cita para el continente europeo.

- El aislamiento de una cepa de *Steinernema affinis* (2,8% de los steinernemátidos) constituye la primera cita de esta especie para la Península Ibérica y el Sur de Europa.

- Se presenta una nueva especie del género *Steinernema*.

8.- Se han aislado un total de 9 cepas de nematodos entomopatógenos de la familia Heterorhabditidae, pertenecientes todas ellas a la especie *Heterorhabditis bacteriophora*. La presencia de esta especie en Cataluña supone la primera cita para la Península Ibérica.

9.- Hemos observado una eleva susceptibilidad en el laboratorio de las larvas del taladro de la madera, *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera: Cossidae) al nematodo *Steinernema feltiae*. Los resultados obtenidos en las pruebas de campo nos indican que la utilización de nematodos entomopatógenos para el control biológico de *Z. pyrina* mediante su introducción en las galerías realizadas por este insecto, es una alternativa rápida y eficaz a la introducción de alambres o insecticidas de elevada toxicidad.

10.- El taladro de la alcachofa *Gortyna xanthenes* (Lepidoptera: Noctuidae), ha resultado ser un excelente hospedador para el nematodo *Steinernema carpocapsae*. El estudio de los diversos parámetros considerados para evaluar la susceptibilidad de las larvas de este insecto en el laboratorio a diferentes concentraciones de nematodos arroja los siguientes resultados: 1) las larvas de *G. xanthenes* son muy susceptibles a pequeñas concentraciones de nematodos. 2) la dosis de infección no influye en el tiempo que tardan en morir las larvas infectadas ni en el número total de nuevas formas infectivas producidas por larva, y 3) la dosis de infección determina el tiempo que tardan en salir las primeras formas infectivas del cadáver de las larvas parasitadas.

Las pruebas de campo nos indican que la utilización de los nematodos entomopatógenos para el control biológico de *Gortyna xanthenes*, puede ser eficaz en las plantaciones bianuales de alcachofas contra las larvas de últimos estadios que permanecen en la parte inferior de la planta después la cosecha.

11.- Las larvas de la polilla del puerro *Acrolepiopsis assectella* (Lepidoptera: Plutellidae) son muy susceptibles a la infección con el nematodo *S. feltiae* tanto en las cámaras de infección en el laboratorio como en condiciones naturales en el interior de la planta.

La utilización de estos nematodos en el campo contra este insecto, ha alcanzado unos niveles de eficacia del 70% de reducción de la plaga.

La elevada persistencia de los nematodos observada entre las hojas del puerro, conjuntamente con su potencial de reciclado mediante su multiplicación en el insecto, permite mantener un dilatado periodo de protección de la planta, siendo por tanto un eficaz método de control de este insecto.

**12.-** Las larvas de últimos estadios del gusano cabezudo *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae) son muy susceptibles en el laboratorio a la infección del nematodo *Steinernema feltiae*.

Las larvas neonatas de este coleóptero que se encuentran en el suelo antes de penetrar en el árbol, han resultado ser muy susceptibles a las diferentes especies de nematodos entomopatógenos ensayadas.

Las especies con una estrategia de búsqueda del hospedador de "emboscada" y menor tamaño, como *Steinernema carpocapsae*, presentan una mayor rapidez en provocar la muerte de las larvas neonatas de este insecto, en aplicaciones con elevadas concentraciones de nematodos. Sin embargo, al final del ensayo los niveles de infección son similares al resto de las especies de nematodos utilizadas. En aplicaciones de nematodos a pequeñas concentraciones, las especies que realizan mayores desplazamientos, con una estrategia de búsqueda del hospedador de "crucero" y un mayor tamaño, como *Steinernema anomali*, obtienen una mayor eficacia.

Los resultados que se desprenden de estos ensayos indican que los nematodos entomopatógenos pueden ser un excelente método de control biológico de las larvas neonatas del gusano cabezudo, *Capnodis tenebrionis*.