

Primeros resultados en el control de larvas de curculiónidos que afectan a plantas de vivero con nematodos entomopatógenos

A. Picoaga, A. Abelleira, J.P. Mansilla, R. Pérez y C. Salinero

Estación Fitopatológica do Areeiro, Subida a la Robleda s/n, E-36153 Pontevedra, España. apicoaga@efa-dip.org

Palabras clave: control biológico, insectos plaga, *Otiorrhynchus*, *Heterorhabditis*, *Steinernema*

Resumen

Los nematodos entomopatógenos (NEP) son un grupo de nematodos parásitos obligados de insectos, que se caracterizan por estar asociados simbióticamente con bacterias que les confieren un elevado potencial como insecticidas biológicos. Estos nematodos pertenecen a los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, y están asociados a bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente. Los nematodos entomopatógenos penetran en la larva del insecto, provocando su muerte en un corto periodo de tiempo, por lo que están siendo utilizados para combatir numerosas plagas que afectan a diversos cultivos. Una de las plagas de insectos más importantes en plantas de vivero son las larvas de curculiónidos, en especial las pertenecientes al género *Otiorrhynchus*. Sus larvas son muy voraces, alimentándose, durante todo su desarrollo larvario, de las raíces, debilitando la planta y en algunos casos provocando su muerte. El control de estas plagas se realiza habitualmente con el empleo de productos químicos, no obstante, la legislación actual tiende a la eliminación de muchas de las materias activas disponibles en el mercado, lo que hace necesaria la búsqueda de métodos de lucha alternativos para combatir estas plagas. En este trabajo, se ha realizado un ensayo de eficacia en laboratorio con larvas de *Curculio elephas* Gyll., para estudiar el comportamiento de cuatro cepas de nematodos entomopatógenos frente a este insecto, a diferentes temperaturas y concentraciones de inóculo, y un ensayo de eficacia en campo mediante la aplicación de NEP de una cepa autóctona de la especie *Heterorhabditis bacteriophora*, para evaluar su efectividad contra larvas de curculionidos en plantas de *Camellia* spp., en dos viveros de nuestra comunidad.

INTRODUCCIÓN

Los curculiónidos (Coleoptera: Curculionidae) son un grupo de insectos fitófagos presentes en numerosos cultivos. Uno de los géneros más importantes, por el daño que ocasiona, es *Otiorrhynchus*, que afecta a plantaciones como la vid, olivo, fresa y a plantas ornamentales de viveros, como *Rhododendron*, *Begonia*, *Cyclamen*, *Taxus*, *Evonymus* y *Camellia* (Bonneimaison, 1976; Mansilla et al., 2002).

Los adultos se alimentan de hojas jóvenes y tiernas, que aparecen con el borde festoneado y pequeñas muescas irregulares. Las larvas se alimentan de raíces, debilitando la planta y en ocasiones causando un estrechamiento del cuello. Este ataque es mucho más grave en vivero, ya que, en el campo, las hembras distribuyen más los huevos y solo algunas raíces se ven afectadas, mientras que en vivero, atacan a casi todo el sistema radicular, pudiendo causar la muerte de la planta (Mansilla et al., 2002).

La lucha contra estos curculiónidos es difícil. El control de los adultos debe hacerse al momento de ser detectados, para evitar en todo lo posible la oviposición. En el registro de productos fitosanitarios del Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, actualmente se permite la aplicación de algunas sustancias activas en viveros para controlar los insectos del suelo. Estos insecticidas se aplican en el suelo, por lo que su eficacia para los adultos es relativa, ya que éstos permanecen durante el día escondidos debajo de macetas y materiales de los viveros.

Otro método de control que se puede utilizar es la colocación de barreras de exclusión con lubricante, para evitar que los adultos accedan a las plantas (Cowles, 1997), además de capturas masivas de adultos o la utilización de plantas resistentes o tolerantes al ataque de la plaga (Morton y García del Pino, 2005).

Entre los métodos de control biológico que se pueden aplicar contra estos insectos del suelo están hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, bacterias como *Bacillus thuringiensis* (Caballero, 2002) y nematodos entomopatógenos (NEP) de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* (Beeding y Miller, 1981; García del Pino, 2002; Ehlers, 2002). Estos últimos tienen una gran efectividad para el control de insectos del suelo ya que son muy móviles y eficaces, buscando de forma activa a sus huéspedes.

Los nematodos entomopatógenos son parásitos obligados de insectos y se caracterizan por estar asociados simbióticamente a bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*. Presentan un único estadio de vida libre en el suelo (tercer estadio juvenil resistente o infectivo), que es el que porta la bacteria simbiote, y es la forma infectiva que penetra en el interior de la larva del insecto, matándola en un corto periodo de tiempo.

La aplicación de estos nematodos para el control de plagas de insectos del suelo ha sido estudiada por numerosos autores y se ha visto que el género *Heterorhabditis* es más efectivo para el control de curculiónidos que el género *Steinernema* (Clausi y Vinciguerra, 2005).

En este trabajo se ha estudiado la efectividad de *Heterorhabditis bacteriophora* para el control de larvas de curculiónidos en vivero, y se ha evaluado la eficacia, en laboratorio, de dos cepas autóctonas de nematodos entomopatógenos, una de *Steinernema feltiae* y otra de *Heterorhabditis bacteriophora*, comparándolas con cepas comerciales, para el control del curculiónido *Curculio elephas* Gyll.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ensayo de eficacia en laboratorio

Se recogieron larvas de *Curculio elephas* y se dispusieron aisladas en recipientes cerrados con tierra estéril. Se diseñó un ensayo para estudiar la efectividad de los juveniles infectivos (IJ) de cuatro cepas de NEP en el control de *C. elephas* a dos temperaturas (24 y 12 °C) y dos concentraciones iniciales de inóculo (500 IJ/larva y 250 IJ/larva).

Las cepas de nematodos entomopatógenos utilizadas fueron: *Steinernema feltiae* (S1), aislada de suelo de pradera en Arteixo, A Coruña (Picoaga, 2005), *S. feltiae* comercial (S2) (Steinernema-System®, Biobest), *Heterorhabditis bacteriophora* (H1), aislada de suelo de viña (O Salnés, Pontevedra) y *H. bacteriophora* comercial (H2) (Larvanem®, Koppert).

Para cada combinación de temperatura y concentración de inóculo, se inocularon 20 larvas del curculiónido con cada cepa de NEP; en el control las 20 larvas

correspondientes recibieron agua destilada. Cada larva de curculiónido se colocó en un frasco de PVC de 100 ml con 15 g de tierra estéril. Después de 24 h se añadieron los juveniles infectivos en 5 ml de agua destilada con concentraciones de 500 IJ/larva y 250 IJ/larva. Los recipientes se mantuvieron en estufa a 24 y 12 °C, en total oscuridad.

Los ensayos se revisaron cada 2 días para registrar el número de larvas muertas por nematodos entomopatógenos. Estas se diseccionaron para comprobar la presencia de juveniles infectivos en su interior.

Se calcularon los porcentajes de eficacia de los distintos tratamientos, dividiendo el número de larvas de *Curculio* muertas por NEP entre el total de larvas inoculadas con cada una de las cepas.

Ensayo de eficacia en campo

Se utilizaron plantas de *Camellia* en maceta, mantenidas en dos viveros de Galicia (NO España), uno en Pontevedra y otro en A Coruña, en las que se habían observado síntomas de ataque de curculiónidos y presencia de larvas en el sustrato, y se inocularon con NEP de la cepa *H. bacteriophora* (H1).

En el vivero de Pontevedra, se inocularon 100 IJ/cm² diluidos en agua destilada en 24 macetas de 1,6 L y en 12 macetas de 0,4 L, que mantenían plantas de *Camellia* de aproximadamente 10 cm de altura. Se aplicaron 10 mL por maceta con una jeringuilla regando superficialmente la tierra, y se mantuvieron en el exterior a temperatura ambiente, con riego diario mediante nebulización.

Después de 24 días se revisaron las macetas, registrando el número de larvas de curculiónido presentes. Las larvas muertas se diseccionaron en el laboratorio para confirmar la muerte por NEP. Se realizó una comprobación de la persistencia y viabilidad de los juveniles infectivos aplicados, mediante la técnica de extracción de nematodos del suelo de Beeding y Akhurst (1975), utilizando 2 trampas-cebo con 10 larvas de *Galleria mellonella* L. cada una, y con tierra de las macetas donde se inocularon los juveniles infectivos.

En el vivero de A Coruña se aplicaron juveniles infectivos de *H. bacteriophora* (H1) en suelo y en macetas de 0,4 L, con plantas de *Camellia*, mediante pulverización. La dosis de nematodos fue inferior a la recomendada de 100 IJ/cm².

Al cabo de 30 días se revisaron cuatro de las macetas inoculadas y siete muestras de suelo de varios puntos, tomados al azar. Se comprobó la presencia de IJs mediante trampas-cebo con larvas de *G. mellonella*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de eficacia en laboratorio

Los porcentajes de eficacia de los distintos tratamientos se muestran en la Tabla 1. A 24 °C, la cepa autóctona H1 fue la más eficaz, alcanzando un 50% de mortalidad y superando a la cepa comercial. Las cepas de *S. feltiae* registraron un máximo de 20% de mortalidad. A 12 °C, por el contrario, la especie *H. bacteriophora* fue la que obtuvo los porcentajes de eficacia más bajos, destacando el 15% de mortalidad de H2. La cepa autóctona S1 presentó unos porcentajes de mortalidad superiores a los de la cepa comercial y mantuvo un comportamiento similar en ambos ensayos.

En cuanto a las concentraciones de inóculo, *H. bacteriophora* fue menos eficaz a menor concentración de inóculo, mientras que *S. feltiae* mantuvo unos porcentajes de mortalidad similares.

Las diferencias observadas, en relación a la temperatura, entre las dos especies de NEP, pueden ser debidas a que los juveniles de *H. bacteriophora* disminuyen su efectividad con temperaturas inferiores a 20°C (Georgis et al., 2006), mientras que los de *Steinernema* están adaptados a temperaturas entre 3-14°C, aunque estos rangos pueden variar significativamente dependiendo de la especie (Barbercheck, 1992). El comportamiento uniforme de la cepa S1 en las condiciones 2, 3 y 4, sugiere que, a pesar de estar adaptada a temperaturas más bajas, la menor afinidad hacia las larvas del insecto plaga puede tener una mayor influencia en su comportamiento.

Las cepas H1 y H2 presentaron mayor afinidad con las larvas de *C. elephas* que S1 y S2. Esto coincide con los resultados obtenidos por Clausi y Vinciguerra (2005), quienes concluyeron que los heterorhabdítidos presentan una mayor afinidad por las larvas de curculiónidos que los steinernemátidos. La mayor efectividad de la cepa H1 respecto a H2 puede ser debida a que H1 es una cepa autóctona que está adaptada a las condiciones físicas del suelo. Factores físicos como la granulometría y pH afectan notablemente a la eficacia de los juveniles infectivos (Barbercheck, 1992).

Ensayo de eficacia en campo

En el ensayo realizado en el vivero de Pontevedra se recogieron muy pocas larvas de curculiónido, a pesar de que antes de la aplicación se habían observado síntomas de daño en las plantas. En las 36 macetas revisadas se registraron seis larvas de curculiónido, cinco muertas por *H. bacteriophora* y una pupa. Con las trampas-cebo para comprobar la viabilidad de los juveniles infectivos, se ratificó la presencia de estos nematodos en las macetas inoculadas, obteniendo el 55% de mortalidad de las larvas de *G. mellonella*.

En las tierras del vivero de A Coruña no se registró presencia de larvas de curculiónidos. La comprobación de la permanencia de los nematodos en el suelo inoculado fue satisfactoria, recuperando, en todos los casos, juveniles infectivos.

Estos resultados no son muy concluyentes debido al bajo número de larvas recuperadas, pero, considerando que normalmente no se conoce la cantidad inicial de larvas de insecto presentes en las macetas tratadas en un vivero y que, en la tierra, las larvas parasitadas se descomponen rápidamente, haciendo más difícil su recuperación (Backhaus, 1994), se puede decir que la cepa H1 fue efectiva en el control de las larvas de curculiónidos. Estudios realizados por Beeding y Miller (1981) y Backhaus (1994) muestran también esta eficacia de los heterorhabdítidos para controlar larvas de curculiónidos en plantas de vivero.

Sería necesario realizar más estudios, partiendo de un número conocido de larvas del insecto, para así calcular con mayor exactitud el porcentaje de efectividad de la cepa testada.

Observando los resultados obtenidos en este trabajo, tanto en los ensayos de campo como en los de laboratorio, se podría considerar a los nematodos entomopatógenos de la especie *H. bacteriophora* como una buena alternativa a los métodos de control utilizados hasta el momento para combatir larvas de curculiónidos en viveros.

Referencias

- Backhaus, G.F. 1994. Biological control of *Otiorynchus sulcatus* F. by use of entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis*. Acta Hort. 364:131-142.
- Barbercheck, M.E. 1992. Effects of soil physical factors on biological control agents of soil insect pest. Florida Entomologist 75: 539-548.

- Bedding, R.A. and Akhurst R.J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21: 109-116.
- Beeding, R.A. and Miller, L.A. 1981. Use of a nematode, *Heterorhabditis heliothidis*, to control black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, in potted plants. *Ann. Appl. Biol.* 99: 211-216.
- Bonnemaison, L. 1976. Enemigos naturales de las plantas cultivadas y forestales (Tomo II). Oikos-Tau, Barcelona.
- Caballero, P. 2002. Los principales organismos entomopatógenos y su potencial como insecticidas microbianos. *Phytoma España* 144: 13-19.
- Clausi, M. e Vinciguerra, M.T. 2005. I nematodi entomopatogeni in un progetto per lo sviluppo sostenibile dei castagneti. *Nematol. Medit.* 33: 91-94.
- Cowles, R.S. 1997. Several methods reduce insecticida use in control of black vine weevils. *Front. Plant Sci.* 49: 2-4.
- Ehlers, R.U. 2002. Nematodos entomopatógenos para el control de insectos. *Phytoma España* 144: 77-81.
- García del Pino, F. 2002. Características de los nematodos entomopatógenos como bioinsecticidas. Selección de especies y ensayos de eficacia. *Phytoma España* 144: 63-74.
- Georgis, R., Koppenhöfer, A.M., Lacey, L.A., Belair, G., Duncan, L.W., Grewal, P.S., Samish, M., Tan, L., Torr, P. and van Tol, R.W.H.M. 2006. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. *Biol. Control* 38: 103-123.
- Kepenekci, I., Gokce, A. and Gaugler, R. 2004. Virulence of three species of entomopathogenic nematodes to chestnut weevil, *Curculio elephas* (Coleoptera: curculionidae). *Nematropica* 34: 199-204.
- Mansilla JP., Salinero, C., Pérez, R. and Pintos, C. 2002. Plagas, enfermedades y fisiopatías de la camelia. Xunta de Galicia, Santiago de Compostela.
- Morton, A. y García del Pino, F. 2005. Susceptibilidad de *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) a nematodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae). *Bol. San. Veg. Plagas* 31: 243-251.
- Picoaga, A. 2005. Puesta a punto de la cría de nematodos entomopatógenos en Galicia. Trabajo de investigación tutelado - Tercer ciclo. Universidad de Santiago de Compostela.

Tabla 1. Porcentajes de mortalidad de *Curculio elephas* por NEP, tras la aplicación de cuatro cepas de nematodos a diferente temperatura y concentración de inóculo, en laboratorio.

Condiciones	Control	H. bacteriophora (H1)	H. bacteriophora® (H2)	S. feltiae (S1)	S. feltiae® (S2)
1 (24 °C - 500 IJ)	0%	50%	35%	10%	10%
2 (24 °C - 250 IJ)	0%	30%	30%	20%	0%
3 (12 °C - 500 IJ)	0%	0%	15%	20%	5%
4 (12 °C - 250 IJ)	0%	5%	5%	20%	5%



Fig. 1. Larvas de *Curculio*, la de la derecha infectada con *H.bacteriophora*



Fig. 2. Galleria de *Steinernema feltiae*



Fig. 3. *Endotokia matricida*



Fig. 4. Tercer estadio juvenil (ij3)

Primeros resultados en el control de larvas de curculiónidos que afectan a plantas de vivero con nematodos entomopatógenos

A. Picoaga, A. Abelleira, J.P. Mansilla, R. Pérez y C. Salinero