

Investigación de métodos compatibles con la agricultura ecológica para el control del “Gusano cabezudo” (*Capnodis tenebrionis* (Linnaeus, 1758))



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN
Y MEDIO AMBIENTE

Madrid, 2012



MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:
<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

NIPO: 280-12-078-6

Coordinación: Subdirección General de Calidad Diferenciada y Agricultura Ecológica,
Dirección General de la Industria Alimentaria (Ministerio de Agricultura, Alimentación y
Medio Ambiente)

PROYECTO: AEG08-021-C4-1

EQUIPO PARTICIPANTE

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

***Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Grupo de
Entomología Agroforestal***
Manuel González Núñez

PERSONAL INVESTIGADOR:

***Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Grupo de
Entomología Agroforestal***
José Rafael Esteban Durán,
Guillermo Cobos Hernández
Ana Cobo Romero

***Junta de Extremadura. Centro de Investigación Agraria. Finca La Orden - Valdesequera
(Badajoz)***

José Del Moral De la Vega
Francisco Pérez Rojas
Modesto Senero Fernández
Jesús De La Cruz Blanco
Antonio Guisado López

Universidad de Jaén. Departamento de Química Inorgánica y Orgánica

Antonio Ortiz Hernández
Francisco Hidalgo Rosales

***Universidad de Córdoba. Laboratorio de Entomología Agroforestal, Departamento de
Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales***

Enrique Vargas Osuna
Hani K. Aldebis
Rafael Ortiz García

Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia. Oficinas Comarcales Agrarias

Javier Melgares de Aguilar Cormenzana
David González Martínez

Centro de Agricultura Ecológica y de Montaña. CAEM. INIA Plasencia (Cáceres)

Ignacio Armendáriz González

ÍNDICE

1. Introducción	5
1.1. Descripción del problema	5
1.2. Posible aplicación de herramientas de prevención y control de <i>C. tenebrionis</i> en fruticultura ecológica	6
2. Objetivos del proyecto	8
3. Actividades realizadas y resultados	9
3.1. Evaluación de barreras físicas y repelentes para la prevención del ataque de <i>C. tenebrionis</i> (grupo INIA)	9
3.1.1. Recogida de adultos en el campo y mantenimiento en el laboratorio	9
3.1.2. Ensayos de evaluación de barreras físicas	10
3.1.3. Ensayos de repelencia/disuasión de superficies tratadas con caolín y/o aceites esenciales	10
3.1.4. Evaluación en laboratorio de la repelencia y/o toxicidad de varios tratamientos sobre la dieta natural y su posible efecto sobre la longevidad y fertilidad de los insectos	12
3.2. Investigación y puesta a punto de entomopatógenos para el control biológico de <i>C. tenebrionis</i> (grupos de Córdoba y Badajoz)	13
3.2.1. Aislamiento de entomopatógenos (grupo deCórdoba).....	13
3.2.2. Obtención de los inóculos (grupo Universidad de Córdoba).....	14
3.2.3. Bioensayos de actividad insecticida de aislados de <i>Beauveria bassiana</i> (grupo Universidad de Córdoba).....	15
3.2.4. Investigación y puesta a punto de entomopatógenos para el control biológico de <i>C. tenebrionis</i> (grupo de Badajoz).....	16
3.3. Investigación de la eficacia de trampas refugio para captura de adultos invernantes de <i>C. tenebrionis</i>. (grupo de Badajoz)	18
3.3.1. Determinación de los refugios de hibernación de los adultos de <i>C. tenebrionis</i> en plantaciones de frutales parasitados por el insecto. Captura de adultos	18
3.3.2. Ensayo para comprobar el poder insecticida de varios insecticidas mediante pulverización y espolvoreo contra adultos de <i>C. tenebrionis</i> (L.)	20
3.3.3. Mejora de la dieta artificial utilizada comúnmente para la alimentación artificial de larvas de <i>C. tenebrionis</i>	22
3.3.4. Ensayo para valorar la eficacia de tres tratamientos contra larvas neonatas de <i>C. tenebrionis</i> en el suelo	22
3.4. Estudio de semioquímicos implicados en el comportamiento de <i>C. tenebrionis</i>. (Universidad de Jaén)	23
3.4.1. Aislamiento e Identificación de componentes volátiles emitidos por hospedantes vivos, con lo que conseguimos un perfil volátil real emitido por especies del género <i>Prunus</i>	23
3.4.2. Bioensayos de compuestos candidatos a inducir un comportamiento determinado entre individuos adultos. Ensayos de arena y/o túnel de viento.....	26

3.4.3. Ensayos de campo con trampas cebadas con distintos compuestos/mezcla	27
3.4.4. Identificación de componentes presentes en distintas partes de los adultos macho y hembra de <i>C. tenebrionis</i>	28
3.4.5. Instalación en campo de distintos componentes y mezclas procedentes de insectos y hospedantes. Uso de distintos diseños de trampas, utilizando la variable cromática como posible punto crítico	31
4. Agradecimientos	32
5. Conclusiones	32
6. Publicaciones y otros trabajos de difusión de los resultados	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción del problema

El coleóptero *Capnodis tenebrionis* (Linnaeus 1758) (Buprestidae), conocido comúnmente como “gusano cabezudo”, constituye una de las plagas más importantes de los frutales de hueso y en menor medida de los frutales de pepita en todo el área mediterránea. En España los daños más considerables se citan en cerezo, albaricoquero, almendro, melocotonero y ciruelo y su incidencia es especialmente importante en las zonas mediterráneas de cultivo (Levante, Baleares y Andalucía), en el Norte de Extremadura y ocasionalmente en Aragón.

El daño lo producen por una parte los escarabajos adultos (Figura 1) en los brotes tiernos principalmente, de los que se alimentan durante todo el periodo activo, royendo la corteza, yemas y peciolo de las hojas, que caen al suelo denunciando su presencia. Aunque en árboles grandes estos daños suelen ser pequeños; en árboles jóvenes la defoliación de los mismos, durante el verano, llega a comprometer seriamente su vida. Pero el daño más importante es el que provocan las larvas (Figura 1) al alimentarse de las raíces y el cuello de los frutales: los adultos hacen la puesta en el suelo en la zona cercana al pié de los árboles y la larva penetra hasta encontrar las partes subterráneas de los árboles, de las que se alimenta formando galerías en la zona subcortical. A veces, según como el insecto vaya destruyendo los haces vasculares del frutal, éste va presentado una anticipada decrepitud, bien lateral o bien total, terminando por morir prematuramente (Figura 1). Hay numerosas citas de plantaciones enteras destruidas por este insecto y la incidencia es mayor en plantaciones de secano, ya que la humedad del suelo es un factor limitante de la plaga al producir la muerte de huevos y larvas neonatas. De hecho es en los años de sequía cuando adquiere mayor importancia la plaga. La aplicación de riegos a manta y las labores de suelo eran consideradas prácticas eficaces para prevenir la plaga. En las modernas plantaciones de riego localizado, donde el suelo permanece seco y sin labrar junto al tronco de los árboles, el problema toma una relevancia importante.



Figura 1. Izquierda: *Capnodis tenebrionis*: adulto (arriba) y larva (abajo). Derecha: síntomas/daños, almendro muerto en plena vegetación.

El periodo de actividad de los adultos se extiende a lo largo de toda la primavera, el verano y el otoño. Las poblaciones de adultos están constituidas por los insectos invernantes y los recién salidos del suelo. Las observaciones realizadas permiten concluir que los adultos invernantes emergen del suelo desde finales de julio hasta mediados de septiembre (según las zonas) y el

periodo de puesta va desde mitad de primavera hasta el final del verano. Las larvas suelen completar el ciclo en dos años.

Los periodos tan largos de actividad y puesta en los adultos y los hábitos endófitos y subterráneos de las larvas hacen que sea extraordinariamente difícil controlar con eficacia esta plaga.

Si los problemas ocasionados por el "Gusano cabezudo" son muy graves para casi la generalidad del sector de cultivadores de frutales de hueso, lo es todavía mucho más en el caso de plantaciones con sistema de producción ecológica, ya que al no estar permitido en este sistema la utilización de insecticidas de síntesis, no hay disponible ninguna estrategia de control.

En la actualidad los métodos disponibles para el manejo de la plaga incluyen:

a) Métodos indirectos o de prevención:

- Quema del material vegetal afectado.
- Uso de láminas de polietileno enterradas en torno a la base de los árboles para impedir la penetración de las larvas.
- Riego a manta de los árboles con riesgo de ataque para evitar la puesta y destruir huevos y larvas.
- En las plantaciones de riego localizado, mantenimiento de la humedad en la base del tronco de los árboles durante el periodo de puesta.

b) Métodos directos de control:

- Tratamientos químicos contra los adultos: consiste en aplicar en pulverización un insecticida sobre la copa de los árboles en las épocas en que éstos acuden a comer del follaje. Se recomiendan dos tratamientos, uno en primavera (mayo, junio), cuando los adultos invernantes acuden a comer antes de hacer la puesta y otro en otoño (septiembre) contra los de la nueva generación. Según la literatura los insecticidas más indicados son los activos por ingestión, principalmente fosforados y carbamatos. La mayoría de estos productos ya no están autorizados, ni siquiera en los sistemas de producción convencional.
- Tratamientos químicos contra las larvas: tratando el suelo en la zona próxima al pie con insecticidas mediante espolvoreo o pulverización. El momento idóneo para esta aplicación es el de la eclosión de las puestas, que suele ser desde principios de julio hasta mediados de agosto. De los productos recomendados en la bibliografía para estos tratamientos (lindano, chlorpyrifos isofenfos + foxim, cipermetrina, fipronil) la mayoría ya están fuera del registro y ninguno de ellos es compatible con la Agricultura Ecológica.

Dada la dimensión del problema y la creciente implantación de sistemas de producción ecológica de frutales, se hace necesario el desarrollo de métodos alternativos al uso de insecticidas de síntesis que controlen con eficacia esta plaga.

1.2. Posible aplicación de herramientas de prevención y control de *C. tenebrionis* en fruticultura ecológica.

Control biológico

Debido a la dificultad de controlar esta especie con insecticidas químicos, se hace necesario el desarrollo de alternativas biológicas. Se han citado algunos parasitoides y depredadores naturales de esta especie, pero parece que su papel es secundario y por si mismos no son capaces de controlar la plaga.

El uso de patógenos es una técnica viable en la lucha contra plagas que está alcanzando cada vez mayor valor por tratarse de medidas de control respetuosas con el medioambiente y que colaboran a la sostenibilidad de los ecosistemas. Debido a que los hongos y los nematodos entomopatógenos penetran en el insecto huésped a través del tegumento y que muchos de ellos utilizan el suelo como sustrato de supervivencia e invasión, ambos grupos pueden ser

capaces de prevenir la colonización de las raíces por las larvas neonatas de *C. tenebrionis* y, por tanto, evitar los daños causados por esta especie.

Uso de semioquímicos

La presencia de compuestos semioquímicos se ha estudiado en numerosas familias de coleópteros. Entre los distintos tipos de feromonas, existen las de agregación, que son emitidas por un sexo (normalmente los machos) y que sirven como señal para sus conspecíficos de ambos sexos induciéndoles un comportamiento agregativo, con la finalidad de protegerse, reproducirse, alimentarse o un conjunto de ellas. Las feromonas sexuales son emitidas por un sexo e indican al otro sexo la localización de potenciales parejas para la cópula. Estas suelen ser emitidas por las hembras, cuando se tratan de corto alcance o contacto (comunes en Cerambícidos). En el caso de las de largo alcance, a veces son emitidas por los machos.

En general, el mecanismo químico de la agregación suele ser mucho más complejo que el que sólo induce un comportamiento sexual; ya que suelen interactuar mezclas multicomponente de metabolitos secundarios procedentes de plantas y los procedentes de los propios insectos.

El uso de estos semioquímicos para manipular el comportamiento de coleópteros ofrece muchas posibilidades en el control de plagas mediante varias estrategias como el trapeo masivo, confusión sexual (*mating disruption*) y programas *Push/Pull*. Estos atrayentes también pueden utilizarse para estudiar los movimientos de plagas hacia zonas de riesgo en el caso de insectos con vuelos de amplio recorrido (*monitoring*).

En especies que se agregan en gran número, como podría ser el caso de *C. tenebrionis*, según observaciones en campo, el trapeo masivo mediante un atrayente efectivo podría tener un gran impacto agronómico pudiendo ser una técnica viable como herramienta para el control de las poblaciones de este buprestido. Esto ya se ha conseguido por ejemplo en escolítidos.

En el caso de que *C. tenebrionis* utilizara una feromona sexual, también se podría usar ésta mediante la estrategia de trapeo masivo.

A pesar de los trabajos y estudios realizados en varias familias de Coleópteros, no existían antes de este estudio referencias sobre la existencia y el tipo de posibles feromonas utilizadas por las especies de la familia Buprestidae. Sólo existía una referencia de una feromona emitida por las hembras de *Agrilus planipennis*, aunque también está presente en las emisiones de los machos. Este desconocimiento obligaba a tratar el estudio desde diferentes estrategias para estudiar los distintos tipos posibles de feromonas. Por ello se propuso llevar a cabo dos estudios paralelos para tratar de determinar la existencia de feromonas de contacto (feromonas sexuales de corto alcance), y por otro lado feromonas sexuales o de agregación de largo alcance.

Uso de barreras físicas

El uso de láminas de polietileno enterradas en torno a la base de los árboles había sido propuesto como otra posible forma de prevenir los ataques de las larvas *C. tenebrionis*. Los adultos hacen la puesta, pero las larvas no logran alcanzar la parte subterránea del árbol y mueren. Aunque el coste en mano de obra hace que este método sea difícilmente aplicable en estas plantaciones de secano, como el almendro, donde los márgenes económicos son muy reducidos, si tendría posibilidad en cultivos más rentables como ciruelo, albaricoquero, cerezo y melocotonero. Por ello era de interés estudiar esta estrategia de cara a integrarla en el manejo de la plaga, estudiando la eficacia de distintos materiales hoy disponibles.

Uso de repelentes

El hecho de que *C. tenebrionis* realice la puesta en la base del tronco o en la tierra a poca distancia del mismo, nos hacía pensar en la conveniencia de investigar la eficacia de repelentes o disuasorios para evitar la puesta de las hembras y de esta manera prevenir el ataque de las larvas. Ya Del Cañizo en los años 50 postulaba la utilización de "insectífugos" contra el *C. tenebrionis* mencionando experiencias llevadas a cabo impregnando los troncos con una mezcla de alquitrán, naftalina y cal viva.

En la Agricultura Ecológica está autorizado el uso de una gran gama de productos repelentes de plagas entre los que se incluyen decocciones de hierbas, extractos de plantas y minerales y aunque muchos de ellos se utilizan de forma muy generalizada aún no se ha estudiado suficientemente su eficacia. En el caso de *C. tenebrionis* no existe aún ningún estudio sobre el efecto que sobre ellos pueden tener este tipo de sustancias.

Otro producto autorizado en Agricultura Ecológica e interesante para incluir en estas investigaciones sobre efectos de repelencia en adultos es el caolín, un mineral del tipo de los aluminosilicatos, de color blanco, no poroso, poco abrasivo, de grano fino y con forma de lámina, que se dispersa fácilmente en agua y es químicamente inerte en un amplio rango de pH. Además según la bibliografía no tiene efectos negativos sobre la salud humana ni sobre el medio ambiente y el desarrollo de resistencia en los insectos plaga es poco probable debido a su modo de acción. El mayor éxito en control de plagas se ha conseguido en el caso de homópteros como la psila del peral y las plagas del olivo *Bactrocera oleae* (Gmel.) y *Prays oleae* (Ber.), sobre las que parece demostrar tener un importante efecto disuasorio de la puesta. No se sabe muy bien cuál es su mecanismo de acción: según una hipótesis los insectos son incapaces de reconocer la planta u órgano huésped cuando está cubierto con el caolín, por otro lado se cree que los insectos son repelidos debido a que la superficie tratada les resulta desagradable. El resultado observado es una reducción de la alimentación y la puesta sobre los huéspedes tratados.

Empleo de trampas refugio

Según la bibliografía una de las características de este insecto es su capacidad de refugiarse durante el invierno, para retornar a su actividad en primavera. En general en la naturaleza, los refugios citados se encuentran en el suelo, formados por hierba seca, piedras, pilas de leña seca, fisuras del suelo, hojas secas o cualquier otro sustrato que le pueda dar protección. Esta característica permitía aventurarse al inicio del proyecto por el camino de la determinación de un refugio trampa en la zona de goteo del árbol, tal y como se hace con otros coleópteros.

2. OBJETIVOS DEL PROYECTO

Mediante el presente proyecto se proponía investigar en el desarrollo de diversos métodos de control de la especie compatibles con la Agricultura Ecológica, abordando el problema desde varios frentes que se materializaban en los siguientes objetivos:

- ✘ OBJETIVO 1. Evaluación de barreras físicas y repelentes para la prevención de *C. tenebrionis*.
- ✘ OBJETIVO 2. Investigación y puesta a punto de entomopatógenos para el control biológico de *C. tenebrionis*.
 - Reconocimiento y selección de entomopatógenos autóctonos asociados a las poblaciones de *C. tenebrionis*.
 - Puesta a punto del control biológico mediante entomopatógenos.
- ✘ OBJETIVO 3. Investigación de la eficacia de trampas refugio para captura de adultos invernantes.
- ✘ OBJETIVO 4. Estudio de semioquímicos implicados en el comportamiento de *C. tenebrionis*.
- ✘ OBJETIVO 5. Difusión de los resultados.

La investigación en campos tan diversos ha hecho necesaria la participación coordinada de varios grupos de investigación especializados en las diferentes líneas de investigación. Por ello el proyecto se estructura en 4 subproyectos con objetivos específicos:

Subproyecto 1 (Laboratorio de Entomología Agroforestal, INIA)

- Evaluación de barreras físicas para evitar la penetración de las larvas neonatas de *C. tenebrionis*
- Investigación del uso de repelentes para evitar la puesta de los adultos de *C. tenebrionis*.

Subproyecto 2 (Laboratorio de Entomología Agroforestal, Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales. Universidad de Córdoba)

- Investigación y puesta a punto de entomopatógenos para el control biológico de *C. tenebrionis*.

- Reconocimiento y selección de entomopatógenos autóctonos asociados a las poblaciones de *C. tenebrionis*.
- Puesta a punto del control biológico mediante entomopatógenos (laboratorio).

Subproyecto 3 (Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Centro de Investigación “la Orden” (Badajoz)

- Investigación y puesta a punto de entomopatógenos para el control biológico de *C. tenebrionis*.
 - Prospecciones de entomopatógenos autóctonos en el Comunidad Extremeña.
 - Puesta a punto del control biológico mediante entomopatógenos (evaluación en campo).
- Investigación de la eficacia de trampas refugio para captura de adultos invernantes.

Subproyecto 4 (Departamento de Química Inorgánica y Orgánica, Universidad de Jaén)

- Estudio de semioquímicos implicados en el comportamiento de *C. tenebrionis*.

3. ACTIVIDADES REALIZADAS Y RESULTADOS

3.1. Evaluación de barreras físicas y repelentes para la prevención del ataque de *C. tenebrionis*. (grupo INIA).

3.1.1. Recogida de adultos en el campo y mantenimiento en el laboratorio

A lo largo de los tres años de proyecto se realizaron capturas de adultos de *C. tenebrionis* para llevar a cabo con ellos los ensayos de laboratorio. Los adultos se capturaron en primavera-verano en plantaciones de melocotonero, albaricoquero y cerezo en Murcia y Extremadura. Los individuos traídos del campo se mantenían en cajas ventiladas o jaulones alimentándolos con hojas y brotes de membrillero y almendro, que se cambiaban cada dos o tres días (Figura 2). En el fondo de las cajas o jaulones se colocaba tierra tamizada como sustrato de puesta.. Las cajas se mantuvieron en los insectarios del laboratorio de Entomología del INIA a 25°C y 60%HR, que se modificaban a 30°C y 50%HR cuando se quería activar la oviposición.



Figura 2. Adultos de *Capnodis tenebrionis* en jaulones de cría con ramas de membrillero.

3.1.2. Ensayos de evaluación de barreras físicas

Para la fabricación de una barrera física de fácil instalación en el campo y bajo coste se eligió un material “no tejido” a base de una fibra sintética de polipropileno, “Abfor”, de uso extendido como membrana de cobertura foliar para prevenir daños por escarcha en cultivos hortícolas.

En estos ensayos se llenaban cajitas con tierra tamizada hasta la mitad y la membrana -barrera cubierta por completo por otra capa de tierra. En la superficie de las cajas se depositaban larvas y/o huevos y se estudiaba su capacidad de penetrar la malla durante un periodo de una semana.

En dichos ensayos la fibra “Abfor” colocada en doble capa no permitió el paso de ninguna larva *C. tenebrionis* y por tanto se postula como una posible barrera contra las mismas, enterrándola en los alcorques de los árboles.

Tabla 1. Eficacia de la fibra Abfor como barrera física para las larvas neonatas de *C. tenebrionis*. Ensayo I: partiendo de huevos; ensayo II: partiendo de larvas L1. Los valores de un mismo ensayo seguidos de distinta letra son diferentes significativamente (ANOVA, $\alpha=0,005$)

	Larvas que superan la barrera (%)	
	Ensayo I	Ensayo II
Testigo (gasa)	36,5 ± 13,4 a	47,5 ± 4,3 a
Fibra Abfor simple	49,2 ± 10,6 a	35,0 ± 10,2 a
Fibra Abfor doble	-	0,0 ± 0,0 b

3.1.3. Ensayos de repelencia/disuasión de superficies tratadas con caolín y/o aceites esenciales

En 2009, mediante ensayos de elección y no elección, se estudió el posible efecto repelente y disuasorio sobre la oviposición de diferentes sustancias al ser aplicadas sobre la superficie de puesta. Se ensayaron los siguientes formulados:

Tabla 2. Productos evaluados contra *Capnodis tenebrionis* en ensayos de tratamiento de la superficie

Producto	Dosis
Surround WP® (Caolín)	5 %
Esencia de lavanda	0,3 %
Surround WP® (Caolín) + Esencia de lavanda	5% 0.3%

Ensayos de “elección”

Se ofrecían a los adultos sustratos de tierra tamizada tratados y no tratados (Figura3). El efecto se evaluó mediante el índice de repelencia (IR) y el índice disuasorio de puesta (IDP), según las siguientes fórmulas:

IR: $100 \times ((ANT-AT)/(ANT+AT))$

ANT = Número de adultos en superficie no tratada

AT = Número de adultos en superficie tratada

IDP: $100 \times ((HNT-HT)/(HNT+HT))$

HNT = Número de huevos en sustrato no tratado

HT = Número de huevos en sustrato tratado

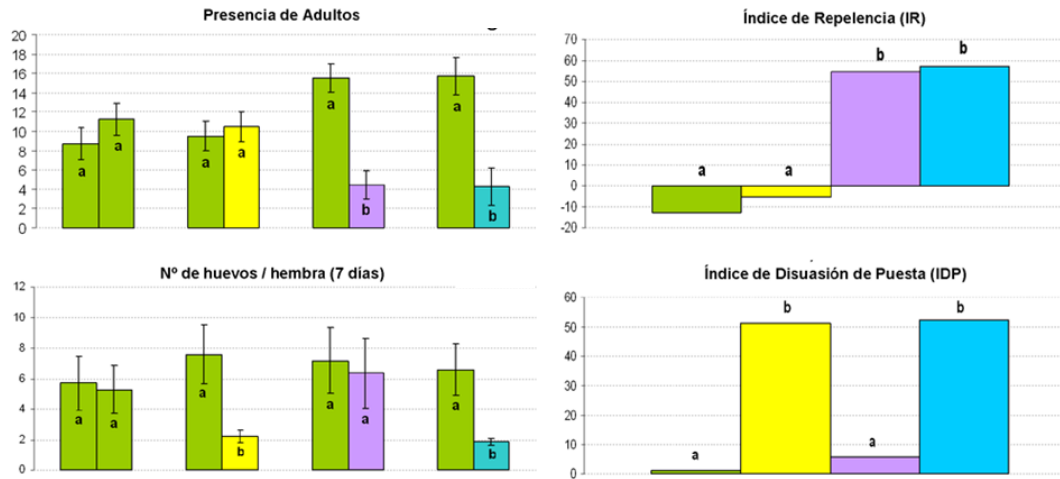


Figura 3. Izquierda: cajas utilizadas en los ensayo de tratamiento de la superficie de puesta. Derecha: huevos de *Capnodis tenebrionis*.

Ensayos de “no elección” :

Se colocaban en la caja de ensayo sustratos de tierra tamizada, todos ellos pulverizados superficialmente con el mismo repelente candidato o con agua destilada en el control.

Ensayos de elección



Ensayo de no elección



Figura 4. Resultados de los ensayos de repelencia/disuasión de superficies tratadas con caolín y/o aceites esenciales.

Los resultados de estos ensayos se exponen en la Figura 4. Los más relevantes son los siguientes:

- El aceite de lavanda con jabón potásico se comportó como repelente de *C. tenebrionis* (índice de repelencia del 55.0% a las 2 horas del tratamiento) aunque no produjo una disminución significativa de la puesta.
- El caolín (Surround® WP) no mostró efecto repelente pero sí un importante efecto disuasorio sobre la puesta (índice disuasorio de la puesta del 51,3%).

3.1.4. Evaluación en laboratorio de la repelencia y/o toxicidad de varios tratamientos sobre la dieta natural y su posible efecto sobre la longevidad y fertilidad de los insectos

Se ofrecieron a los adultos ramas y brotes de membrillero pulverizados con los productos a evaluar o con agua. Los productos y dosis utilizados en estos ensayos fueron:

Tabla 3. Productos evaluados aplicados en la dieta de *Capnodis tenebrionis*

Nombe comercial	Principio activo y riqueza	Dosis
Surround WP®	Caolín	5%
Oleatbio To®	Jabón de potasa 50% esencia de Tomillo rojo 50%	0,3%
Align®	Azadiractina 3.2%	0,15%

Los ensayos se realizaron en cajas ventiladas de plástico en las que se introducían los adultos y las ramitas tratadas y en cuyo fondo se colocaba tierra tamizada como sustrato de puesta. Se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la longevidad, la reproducción y la alimentación de los adultos, registrando cada 3-4 días la mortalidad, el número de huevos puestos por hembra y el material vegetal consumido (hojas, peciolo y corteza)



Figura 5. Izquierda: cajas utilizadas en los ensayo de tratamiento de la dieta. Derecha: adultos sobre ramas de membrillero.

En los ensayos de “no elección” la alimentación con ramitas tratadas con caolín (Surround) o con azadiractina (Align) causó la muerte anticipada de los insectos. A los 10 días de iniciado el tratamiento habían muerto la totalidad de los tratados con caolín, y a los 25 los tratados con azadiractina. En cambio, la mortalidad en los tratados con Oleatbio no difirió de la del control sin tratar, que fue de tan solo el 20% a lo largo de todo el ensayo. También caolín y azadiractina produjeron una reducción muy significativa del número de huevos puestos por las hembras, y la azadiractina disminuyó la cantidad de alimento ingerido por los insectos.

En los ensayos de “elección” también se observó una disminución de la longevidad de los insectos alimentados con ramitas tratadas con caolín (Surround) y aún mucho más acusada en el caso de los tratados con azadiractina (Align). En estos ensayos no se observó un claro efecto disuasorio de la alimentación por parte de estos productos. Se desprende de estos resultados que el efecto de la azadiractina y el caolín sobre los adultos de *C. tenebrionis* no es repelente sino tóxico o disuasorio de la alimentación.

En otros ensayos efectuados para estudiar la reversibilidad del efecto tóxico de la azadiractina y de una mezcla de ésta con caolín se observó, que a pesar de haber interrumpido la alimentación con ramitas tratadas tras seis de tratamiento, los adultos siguieron muriendo prematuramente, aunque sobrevivieron algunos de ellos (<10%). La alimentación de los insectos tratados disminuyó hasta los 15-20 días tras el tratamiento, pero los pocos insectos que habían sobrevivido volvieron a alimentarse.

3.2. Investigación y puesta a punto de entomopatógenos para el control biológico de *C. tenebrionis*. (Grupos de Córdoba y Badajoz)

3.2.1. Aislamiento de entomopatógenos (Grupo de Córdoba)

A partir de muestras de suelo

Para la búsqueda de patógenos que puedan ser eficaces para el control de *C. tenebrionis*, se tomaron muestras de suelo en diferentes localidades del norte de la provincia de Córdoba. Bajo la copa de cada árbol seleccionado se recogía aproximadamente 1 kg de suelo tomando 250 g en cada una de las cuatro orientaciones. Las muestras se tomaron limpiando primero la superficie de hierbas y piedras y recogiendo después con una paleta metálica el suelo de los primeros 10 cm. Las muestras se introdujeron en bolsas de plástico transparente y se llevaron al laboratorio en donde se mantuvieron en cámara frigorífica a 4°C hasta que se procedió al aislamiento de los hongos mediante la trampa *Galleria*. Para ello en el Laboratorio de Entomología Agroforestal se estableció una población de la especie *Galleria mellonella* que se cría de forma continuada en condiciones de insectario mediante una modificación del método descrito por Dutky *et al.* (1962).

Para la obtención de entomopatógenos con la trampa *Galleria* se siguió el método propuesto por Zimmermann (1986) con algunas modificaciones. El procedimiento fue el siguiente:

- Las muestras de suelo se extienden sobre papel de filtro y se homogeneizaron, eliminando piedras, raíces y elementos gruesos.
- El suelo se criba en tamiz de 5 mm de luz.
- De cada muestra se toma una cantidad de entre 600-800 g que se introduce en un bote de plástico de 15 cm de altura y 11 cm de diámetro con tapa perforada para permitir la aireación.
- En cada bote se introducen 25 larvas de *G. mellonella* que se encuentran al final de su desarrollo.
- Los botes se cierran y se llevan al insectario (temperatura: 24-26°C; 60-65% de humedad relativa y fotoperiodo de 16 horas de luz, 8 de oscuridad) donde se mantienen 8 días.
- Cada día, los botes son volteados con el fin de que las larvas, que tienden a subir a la superficie, se muevan constantemente a través del suelo, aumentando así la posibilidad de quedar infectadas por organismos patógenos que se encuentren en el suelo.
- Terminado el periodo de 8 días, las larvas se recogen de los botes, apareciendo muchas de ellas muertas.
- Las larvas son transferidas a una cámara húmeda durante 8 días a temperatura de 28-30°C para acelerar el desarrollo de los hongos entomopatógenos que estén infectando a las larvas.

Con las larvas que aparecían muertas y momificadas por los hongos se procedió al aislamiento del patógeno utilizando el medio de cultivo adaptado por Kessler et al. (2003) con algunas modificaciones.

Se han obtenido mediante este procedimiento un total de 43 aislados de hongos entomopatógenos: 27 de *Beauveria bassiana*, 14 de *Metarrhizium anisopliae* y 2 de *Paecilomyces* spp. (Figura 13).

También se han encontrado nematodos entomopatógenos en algunas de las muestras de suelo recogidas. Los nematodos han sido multiplicados en el laboratorio sobre larvas de *G. mellonella* siguiendo la técnica de Woodring y Kaya (1988).

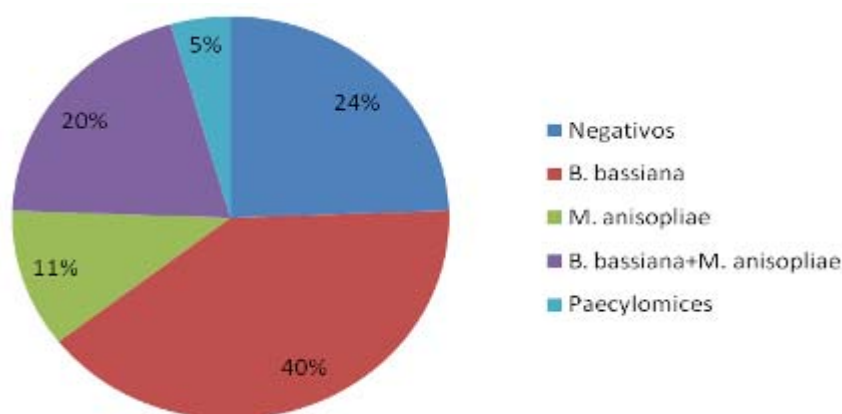


Figura 13. Porcentajes de muestras de suelo con presencia de los distintos hongos aislados con la trampa *Galleria* a partir de muestras de suelo de dehesas del norte de la provincia de Córdoba.

A partir de muestras de *Capnodis tenebrionis*.

Se examinaron adultos muertos (machos y hembras) de *C. tenebrionis*, enviados por el grupo del INIA. Dichos ejemplares fueron desinfectados previamente sumergiéndolos en una solución de hipoclorito sódico al 1% durante 5 minutos, posteriormente se lavaron en agua destilada y se introdujeron en una cámara húmeda durante 8 días. Transcurrido este tiempo se observaron los ejemplares para detectar presencia de crecimiento de estructuras fúngicas. De los 237 adultos de *C. tenebrionis* procesados no se obtuvo ningún aislado.

3.2.2. Obtención de los inóculos purificados para la realización de ensayos (Universidad de Córdoba)

Los aislados de *B. bassiana* procedentes de las muestras de suelo se multiplicaron con objeto de obtener suspensiones acuosas de conidias para usar en los bioensayos de actividad insecticida.

La multiplicación se realizó mediante cultivo en placas a 28°C en Sabraud Malta Agar (SMA) enriquecido con levadura al 2%. Las conidias resultantes se recogen mediante raspado de las placas con agua destilada estéril y mojante (Tween 80) al 0,1%. La suspensión se centrifuga dos veces durante 15 minutos a 5000 rpm para eliminar posibles exotoxinas. El precipitado resultante se resuspende con una mínima cantidad de agua destilada estéril y se guarda en cámara frigorífica a 4 °C. La concentración de conidias por unidad de volumen, se determina mediante recuento en un hematocímetro o cámara de Neubauer utilizando el microscopio óptico.

Adicionalmente, para almacenamiento a largo plazo de los aislados, las suspensiones acuosas de conidias se depositaron en tubos con arena fina esterilizada.

Todos los aislados se han añadido a la Colección de aislados de hongos entomopatógenos del Laboratorio de Entomología Agroforestal, lo que significa disponer de una amplia diversidad de genotipos con objeto de seleccionar con éxito los más infectivos.

3.2.3. Bioensayos de actividad insecticida de aislados de *Beauveria bassiana* (Grupo Universidad de Córdoba)

Durante 2010 y 2011 se han realizado los experimentos con aislados de *B. bassiana*, pertenecientes a la Colección de entomopatógenos del Laboratorio de Entomología Agroforestal. Estas pruebas se realizaron sobre lepidópteros y coleópteros, con el fin de detectar los aislados de mayor potencial insecticida.

Los bioensayos se llevaron a cabo en las condiciones de insectario.

En primer lugar se realizaron pruebas de infectividad que consistieron en la aplicación tópica sobre el insecto de una suspensión de conidias. Todos los aislados se aplicaron a la misma concentración (5×10^7 conidias/ml) para poder compararlos entre sí. Para cada aislado y especie se dispusieron grupos de 15-30 larvas o adultos (según la especie) en cajas individuales de 3 cm de diámetro y 1,5 cm de altura. La aplicación del inóculo se realizó depositando con una micropipeta una gota de volumen conocido en el dorso de cada individuo. A los testigos se les aplicó una mezcla de agua destilada con mojante. Transcurridos unos minutos, se les alimentó introduciendo dieta en cada una de las cajas, que se cerraban con tapadera sin perforar para mantener una humedad propicia para el desarrollo del hongo. Los ensayos se revisaron diariamente, añadiendo alimento fresco y llevando un control del número de individuos muertos y la fecha de mortalidad. Los ejemplares muertos se transfirieron a cámaras húmedas para favorecer el desarrollo del hongo. Transcurridos 4-8 días los individuos muertos por la infección del hongo aparecen cubiertos del micelio blanco característico. Finalmente, se confirmaba que la muerte de la larva fue causada por *B. bassiana*, mediante la observación al microscopio de las estructuras fúngicas que recubrían el cuerpo del insecto.

En lepidópteros.

Con un total de 12 aislados se han realizado ensayos sobre larvas de *G. mellonella* (procedentes de la población de cría en insectario). Paralelamente se realizaron ensayos sobre otros lepidópteros: larvas de *Catocala* spp., *Dryobotodes* spp., *Dryobota labecula* y *Cydia splendana*.

De los resultados de los tratamientos con 12 aislados seleccionados, se concluye que todos ellos fueron infectivos en las especies de lepidópteros utilizadas, pero con importantes diferencias para una misma especie hospedadora. El orden de actividad de los aislados en larvas de *G. mellonella* se correspondió bastante bien con la actividad sobre las otras especies de lepidópteros. En particular, las pruebas sobre *G. mellonella* permite detectar tanto los aislados que van a presentar mayor infectividad como los de infectividad muy baja.

En coleópteros.

En 2010 se estableció una población de *Tenebrio molitor* que ha sido mantenida con salvado de trigo siguiendo la metodología descrita por Weaver y McFarlane (1990). A partir de esta población se han realizado bioensayos de patogenicidad sobre larvas y adultos de esta especie. Paralelamente se realizaron ensayos con otros coleópteros: *Curculio elephas* y *Gallerucella luteolla*, procedentes de muestreos en poblaciones de campo.

La actividad de los aislados sobre coleópteros mostró mucha más baja infectividad que sobre lepidópteros, con solo 4 aislados con efecto insecticida significativo. Estos aislados fueron dos procedentes de muestras de suelo (Refs. 14 y 31), uno de *Rhynchophorus ferrugineus* (Ref. Rf) y el otro de *Curculio elephas* (Ref. C1).

En *Capnodis tenebrionis*

Los resultados anteriores han servido para seleccionar un grupo de aislados con mayor poder insecticida, los cuales se están probando mediante bioensayos de actividad biológica sobre *C. tenebrionis*.

Se han realizado bioensayos de infectividad sobre los adultos de *C. tenebrionis* procedentes de plantaciones frutales de la localidad de Palma del Río (Córdoba) en los meses de Julio, Agosto y Septiembre. Se han llevado a cabo dos tipos de bioensayos:

- 1) Comparación de la infectividad entre aislados, utilizando la metodología ya indicada para los ensayos con las otras especies.

- 2) Bioensayos de actividad insecticida de los aislados con mayor infectividad. La metodología en este último caso es similar, con la diferencia de que en cada bioensayo se utiliza un solo aislado a diferentes (un mínimo de cuatro) concentraciones de conidias/ml.

La infectividad de los aislados seleccionados sobre adultos de *C. tenebrionis* dio como resultado una alta mortalidad (más del 80% de los adultos tratados) de dos aislados: uno procedente de muestras de suelo (14) y el de *R. ferrugineus* (Rf) (Tabla 4).

Tabla 4. Infectividad de aislados de *B. bassiana* sobre adultos de *C. tenebrionis* a la dosis de 5×10^7 conidias/ml

Referencia	Nº adultos	% Mortalidad
Rf	20	100,00
C1	20	70,00
14	20	90,00
31	20	30,00
Testigo	20	20,00

La actividad insecticida del aislado 14 se reflejan en la Tabla 5. La mortalidad de los adultos por el hongo se inició a los 5 días del tratamiento y se prolongó hasta 18 días.

Tabla 5. Actividad biológica de un aislado de *B. bassiana* (Ref 14) sobre adultos de *C. tenebrionis*

Concentración conidias/ml	Nº adultos	Días después del tratamiento			% Mortalidad
		Nº de muertos por <i>B. bassiana</i> 5	13	18	
5×10^4	20	0	1	1	10,0
5×10^5	20	0	2	3	25,0
5×10^6	20	4	5	2	55,0
5×10^7	20	5	13	0	90,0
Testigo	20	0	1	0	5,0

Con los resultados obtenidos, podemos concluir que se están seleccionando aislados del hongo *B. bassiana* con alto efecto insecticida, que son candidatos para la elaboración de formulaciones insecticidas dirigidas al control de las poblaciones de adultos de *C. tenebrionis* en campo.

3.2.4. Investigación y puesta a punto de entomopatógenos para el control biológico de *C. tenebrionis* (Grupo Finca “La Orden”. Badajoz)

Recogida de muestras de suelo en diversas comarcas de Extremadura

Durante el año 2009 se obtuvieron muestras de tierra en plantaciones frutales de la zona de Las Hurdes, para el aislamiento de nematodos entomopatógenos de las mismas, mediante la utilización de trampas biológicas de *Galleria mellonella*.

Las muestras fueron tomadas en el periodo horario del día que comprende desde las once de la mañana a las tres de la tarde. Para ello con la ayuda de una azada se separan los primeros 2-3 cm de superficie de suelo, profundizando hasta los 15-20 cm. Del orificio creado se toman entre 1,5 y 2 Kg. de suelo, los cuales se depositan en una bolsa, la cual se rotula, se sella y se colocan en el coche para tenerlas el menor tiempo posible expuestas a los rayos del sol.

El itinerario seguido se determinó previamente, eligiendo las zonas recomendadas por los especialistas del Servicio de Sanidad Vegetal de la Junta de Extremadura, que normalmente

trabajan en la zona y los cuales conocen las zonas con mayor incidencia de plaga de *Capnodis tenebrionis*. Así, se decidió tomar muestras a distancias equitativas siguiendo las vías de comunicación públicas que comunican las localidades de Torre de Don Miguel, Santibáñez El Alto, Hernán-Pérez, Torrecilla de Los Ángeles, Pinofranqueado y Casar de Palomero.

Desde el mes de enero hasta el mes de octubre de 2010 se tomaron también muestras de tierra en la zona de Burguillos, Zafra, Jerez de los Caballeros, Fregenal y Tentudía para proceder al aislamiento de nematodos entomopatógenos.

Puesta a punto del control biológico mediante entomopatógenos y evaluación en campo.

Las larvas de *C. tenebrionis* mantenidas en dietas se trasladaron a placas de Petri para ser infestadas con nematodos aislados; asimismo se infestaron larvas de diversas edades obtenidas directamente de las raíces de árboles en plantaciones de frutales de fincas colaboradoras.

El ensayo se planteó sobre un total de 500 larvas (100/producto y testigo) de *C. tenebrionis* de distintas edades, obtenidas directamente de las raíces de árboles frutales.

Los entomopatógenos ensayados corresponden a 3 aislados de nematodos conferibles a *Steinernema feltiae* e identificados por las siglas 002MC, 004MC y B025.

El grupo de larvas, correspondiente al testigo, no se trató con ningún producto biológico, ni químico.

Como control positivo se eligió el imidacloprid por ser el insecticida más usado por los agricultores contra el parásito en frutales de hueso.

La mortalidad entre las larvas, en los distintos tratamientos, se valoró a partir de la semana de siembra. Los resultados obtenidos son los expuestos en la Figura 14.

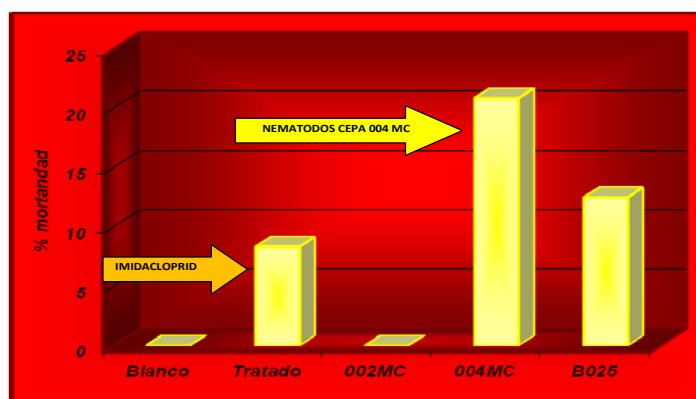


Figura 14. Porcentaje de mortalidad en larvas de *C. tenebrionis* según los distintos tratamientos aplicados.

Es de destacar el efecto encontrado sobre las larvas, de las cepas de nematodos 002MC y B025, superior incluso al del insecticida Imidacloprid, conocido por su alta actividad sobre la mayoría los insectos.

Para comprobar la eficacia en campo del aislado 004MC contra larvas neonatas de *C. tenebrionis* se ha desarrollado un experimento en una plantación de frutales (ciruelo, variedad Red Beauty) de 1 hectárea de superficie (Figura 15). La parcela está dividida en tres zonas, una para el producto insecticida de referencia (cipermetrina + clorpirifos), otra para el entomopatógeno y una zona testigo.



Figura 15. Aplicación de nematodos entomopatógenos en suelo con larvas de *C. tenebrionis*.

3.3. Investigación de la eficacia de trampas refugio para la captura de adultos invernantes de *C. tenebrionis*. (grupo de Badajoz)

3.3.1. Determinación de los refugios de hibernación de los adultos de *C. tenebrionis* en plantaciones de frutales parasitados por el insecto. Captura de adultos

Desde el mes de marzo de 2010 y hasta finales de octubre se realizaron salidas a fincas colaboradoras con alto grado de parasitismo por esta plaga, situadas en las localidades de Valdelacalzada, Guadajira y Talavera la Real. En este periodo se recogieron insectos adultos de *C. tenebrionis* de ambos sexos para ser mantenidos en insectario en condiciones de temperatura y humedad controladas, procediéndose a su alimentación a base de hojas y brotes frescos de frutales (nectarina y ciruelo), recogidos de las mismas plantaciones semanalmente.

La técnica utilizada para la captura de los adultos del coleóptero fue, en algunos casos, recogida directa, a mano, sobre ramas de frutales, y en otras ocasiones recolección después de percutir las ramas principales con un martillo de goma, utilizando un plástico para recoger los insectos caídos (Figura 16). Estas operaciones se realizaron a primera hora de la mañana antes de que *C. tenebrionis* se activara lo suficiente, mediante el calor del día, para poder volar, lo cual dificulta su captura.



Figura 16. La recogida de adultos se hace por la mañana, golpeando el tronco de los árboles parasitados con un mazo de goma y reuniéndolos en un plástico.

Se capturaron un total de 800 adultos, con los cuales se desarrolló un ensayo en insectario para determinar el posible poder de atracción, como refugio, de los siguientes materiales: tejas de barro, ladrillos de barro, piedras naturales y pequeñas pacas de avena con fundas oscuras (Figura 17). Los insectos estaban sobre plantones de ciruelo y, a su alrededor, en círculos concéntricos a 0'5, 1 y 2 m., repetidos 5 veces, al azar, cada una de las variables (materiales refugio).

En campo, en una finca colaboradora situada en Talavera la Real, altamente parasitada por *C. tenebrionis*, se realizó un ensayo para determinar el posible poder de atracción de los mismos materiales citados anteriormente (tejas de barro, ladrillos de barro, piedras naturales y pequeñas pacas de avena con fundas oscuras).

Los refugios se colocaron en la base de los árboles. Cada variable estaba situada, al azar, en 5 filas de árboles (bloques).



Figura 17. Tejas y pacas de paja de avena utilizadas como posible refugio de adultos de *C. tenebrionis*.

Dado que ninguno de los materiales ensayados en insectario y campo para determinar su valor como refugio de los adultos del insecto dieron resultado, se hicieron observaciones en el suelo del pie de árboles parasitados, no pudiéndose encontrar ningún adulto, mientras que, por el contrario, estos podían verse en las ramas, razón por la cual, desde el 19 de noviembre de 2010 y hasta el 01 de abril de 2011, semanalmente, a las 9:30 de la mañana, se observaron 70 ciruelos de la variedad Red Beauty, revisándose siempre los mismos árboles.

Los resultados obtenidos (Tabla 6.) muestran que, al menos una parte de la población del insecto, inverna en forma de adulto en las ramas de los árboles. Este fenómeno, que no aparece citado en la bibliografía consultada sobre la biología de *C. tenebrionis*, podría ser una de las causas que explicara la exaltación de esta plaga en España a partir de los últimos quince años, época desde la que se han dejado de realizar los tratamientos invernales con insecticidas debido a la prohibición de los aceites de invierno y primavera con distintas materias activas.

Tabla 6. Adultos de *C. tenebrionis* capturados en los árboles

Fecha de captura	Nº de adultos capturado
19/11/2010	11
26/11/2010	9
03/12/2010	9
16/12/2010	9
29/12/2010	7
05/01/2011	7
10/01/2011	7
17/01/2011	10
27/01/2011	12
04/02/2011	8
11/02/2011	6
17/02/2011	8
23/02/2011	11
28/02/2011	14
18/03/2011	20 (16 viejos / 4 nuevos)
25/03/2011	36 (7viejos / 29 nuevos)
01/04/2011	17 (9 viejos / 8 nuevos)

3.3.2. Ensayo para comprobar el poder insecticida de varios insecticidas autorizados en contra adultos de *C. tenebrionis* (L.)

Para alcanzar el objetivo propuesto se desarrolló un ensayo a fin de comparar el poder insecticida contra adultos de *C. tenebrionis* de dos formulados de piretrinas naturales, autorizados en Agricultura Ecológica, comparando su eficacia con algunos insecticidas de síntesis convencionales:

Tabla 7. Productos evaluados contra adultos de *Capnodis tenebrionis*

CASA COMERCIAL	PRODUCTO COMERCIAL	MATERIA ACTIVA	DOSIS USADA	CLAVE
MASSO	GRANET	0,2% piretrinas naturales	50 kg/ha, espolvoreo	A
CEQUISA	CEKUMETRIN 10 EC + PANDA 48 LE	cipermetrina 10% + clorpirifos 48%	50-100 cc /HI 150 – 200 cc / HI	C
BAYERN	DECIS EXPERT 10%	deltametrina	0,125 L/ha	D
CEQUISA	SADITRINA ESPER	cipermetrin 0.5%	30 Kg / Ha espolvoreo	I
CEQUISA	PANDA 48 LE	clorpirifos 48%	150 – 200 cc / HI líquido	L
BAYER CROPSCIENCE	MESUROL 50 WP	metiocarb 50%	100-200 G / HI polvo mojable	N
PROBELTE	CLORIFOS 3 PE	clorpirifos 3%	20-30 Kg / Ha espolvoreo	O
MASSÓ DIVISIÓN AGRO	PELITRE HORT	piretrinas naturales 4%	200 cc /100 litros emulsionable	P
TESTIGO	-----	-----	-----	T
CEQUISA	CIPERZUFRE FAE	azufre 40% cipermetrin 0.5%	15-25 Kg / Ha espolvoreo	V
BAYER CROPSCIENCE	CONFIDOR 20 LS	imidacloprid 20%	50 cc / HI, líquido	X

Cada uno de los productos fue ensayado sobre un lote de 30 adultos, y los insecticidas fueron aplicados mediante un pulverizador o espolvoreador, según el tipo de formulado.

La dosis de cada insecticida fue la recomendada por cada uno de los fabricantes de los mismos.

El gasto del producto, para pulverizaciones, fue el equivalente a 1000 cc/árbol (para imidacloprid se utilizó el equivalente a 500 cc/ha); para espolvoreo se empleó el equivalente a 30 gr/árbol.

Cada uno de los 30 insectos de las unidades experimentales fueron marcados con un rotulador permanente y colocados en el interior de una caja de Petri (265,9 cm²), donde fueron tratados con la dosis y cantidad de producto calculado para cada formulado (Figura 18).

Una vez tratados todos los insectos, fueron introducidos dentro de una jaula de plástico con suficiente ventilación, en la cual se introdujeron ramas de frutales para la alimentación de los insectos.

Los insectos fueron observados diariamente durante una semana, y catalogados, uno a uno, como sanos, afectados ligeramente, y muertos o agonizantes.



Figura 18. Izquierda: adultos de *C. tenebrionis* marcados a fin de seguir la evolución de cada uno de ellos. Derecha: adulto mostrando extensión de las alas por efecto del tratamiento insecticida.

Los resultados obtenidos fueron analizados matemáticamente mediante la comparación, dos a dos, de muestras binomiales con varianzas desconocidas y no necesariamente iguales, y utilizando como error tipo $\alpha=0,05$.

De los productos utilizables en Agricultura Ecológica, las piretrinas naturales emulsionables han mostrado una buena eficacia insecticida. La deltametrina, la cipermetrina + aceite de verano, la cipermetrina + azufre y el clorpirifos en espolvoreo también han evidenciado un buen poder insecticida.

Tabla 8. Eficacia insecticida de los distintos productos ensayados contra *Capnodis tenebrionis*

PRODUCTO COMERCIAL	MATERIA ACTIVA	Muertos o en mal estado (%)
GRANET	0,2% piretrinas naturales	10,0 B
CEKUMETRIN 10 EC + PANDA 48 LE	cipermetrina 10% + clorpirifos 48%	100,0 A
DECIS EXPERT 10%	deltametrina	26,7 B
SADITRINA ESPER	cipermetrin 0.5%	100,0 A
PANDA 48 LE	clorpirifos 48%	33,3 B
MESUROL 50 WP	metiocarb 50%	0,0 B
CLORIFOS 3 PE	clorpirifos 3%	30,0 B
PELITRE HORT	piretrinas naturales 4%	93,3 A
TESTIGO	- - - -	0,0 B
CIPERZUFRE FAE	azufre 40% cipermetrin 0.5%	0,0 B
CONFIDOR 20 LS	imidacloprid 20%	100,0 A

(*) Los productos con la misma letra no muestran diferencia significativa entre sí

3.3.3. Mejora de la dieta artificial utilizada comúnmente para la alimentación artificial de larvas de *Capnodis tenebrionis*

Con 300 larvas capturadas en explotaciones de frutales en las que se procedió al arrancado de los árboles (15 de febrero de 2011) se ha realizado un ensayo con tres tipos distintos de dieta artificial formuladas con serrín de diversas especies de frutales –serrín de raíz de ciruelo (A), serrín de almendro (B) y serrín de ciruelo(C)– y basadas en la composición descrita por GINDIN et al. (2009), realizando variantes basadas en las proporciones propuestas por VIEDMA et al. (1983) para la cría de coleópteros xilófagos. La dieta con las larvas se mantuvo en estufas a una temperatura constante de 25 °C y una humedad del 90%.

Los mejores resultados se obtuvieron con la dieta tipo A, a base de serrín de raíz de ciruelo (Tabla 9) y evidencian que este material es un componente recomendable para elaborar dietas de alimentación artificial de larvas de *C. tenebrionis*.

Tabla 9. Supervivencia de larvas de *Capnodis tenebrionis* mediante tres tipos de dieta artificial

	Dieta A	Dieta B	Dieta C
% supervivencia	33%	0%	13%
Tiempo medio de reposo y metamorfosis	7 días	x	14 días
Tiempo medio de endurecimiento quitinoso	31 días	x	28 días

3.3.4. Ensayo para valorar la eficacia de tres tratamientos contra larvas neonatas de *Capnodis tenebrionis* en el suelo.

Se estudió la eficacia sobre larvas de *C. tenebrionis* de dos productos autorizados en Agricultura Ecológica (alpechín y piretrinas naturales) cuando se aplican al suelo, comparando su eficacia con la del tratamiento insecticida convencional cipermetrina + clorpirifos. El experimento se realizó en macetas de 10 x 10 cm llenas de arena cribada mediante un tamiz de 1 mm de luz. La arena de cada maceta se trató con alpechín (residuo líquido resultante de la molturación de la aceituna), cipermetrina + clorpirifos y piretrina natural a la dosis de 50.000 l /Ha en los alpechines y 3000 l /Ha en los productos comerciales (piretrinas y clorpirifos); se incluyó un testigo sin tratamiento. Cada tratamiento constó de tres repeticiones; en total se utilizaron 12 macetas con 30 larvas cada una. En cada maceta se introdujeron 30 larvas neonatas de *C. tenebrionis* (Figura 19) a unos 2 cm de profundidad. Las lecturas de los ensayos se realizaban cada dos días, observando la viabilidad de las larvas y valorando la efectividad en el tiempo de cada tratamiento.

La dosis elegida de alpechín fue la que actualmente utilizan muchos agricultores como fertilizante. Los insecticidas de referencia elegidos no están autorizados para aplicar al suelo de estos cultivos, y se carece de experiencia para usar una dosis determinada, por lo cual, y dado que las materias activas sufren una degradación o fijación en contacto con el suelo, se decidió subir las dosis que habitualmente se emplean para aplicar en pulverizaciones aéreas.



Figura 19. Larva neonata utilizada en ensayos para determinar el poder insecticida de diversos productos aplicados al suelo.

Los resultados de este ensayo se proporcionan en la Tabla 10.

Tabla 10. Mortalidad de larvas de *Capnodis tenebrionis* en los tratamientos del suelo

Variables	Bloques			Total	Significación
	I	II	III		
	Larvas muertas (%)				
Alpechín	27	30	30	87	A
Piretrinas naturales	30	30	30	90	A
Cipermetrina + clorpirifos	24	27	30	81	A
Testigo	3	6	3	12	B
Total	84	93	93	270	

3.4. Estudio de semioquímicos implicados en el comportamiento de *C. tenebrionis*. (Universidad de Jaén)

3.4.1. Aislamiento e Identificación de componentes volátiles emitidos por hospedantes vivos, con lo que conseguimos un perfil volátil real emitido por especies del género *Prunus*

Todas las plantas emiten compuestos químicos volátiles que en el marco de la coevolución y la selección natural, actúan como señales para otros organismos vivos. En muchos casos, algunos de estos componentes volátiles están implicados en la comunicación interespecífica insecto-planta (atracción primaria) y rigen las relaciones bióticas de la entomofauna huésped con una especie vegetal. Los atrayentes primarios determinan en los insectos objetivo, comportamientos tales como identificación del hospedante, la localización de zona de puesta o como refugio. Los insectos fitófagos, seleccionan al hospedante entre un grupo de especies que coexisten en el ecosistema, de ahí que suelen utilizar especies químicas para su identificación. En este contexto, se decidió estudiar el perfil volátil de especies hospedantes del bupréstido monófago *Capnodis tenebrionis*. La fuente de candidatos a participar en la atracción primaria de *C. tenebrionis* fueron los componentes volátiles comunes presentes en 5 especies del género *Prunus*: *armeniaca*, *amygdalus*, *avium*, *domestica* y *persica*.

Utilizando plantas vivas de tres especies hospedantes (ciruelo, melocotonero y almendro) identificamos el perfil volátil y lo comparamos con el estudiado en campañas anteriores. Para ello se embolsaron árboles de pequeño porte (1-2 m) con film y una composición de bolsas para alimentación (utilizadas para microondas) cuya característica fundamental es que no provocan migración de plastificantes, material polimérico o compuestos ajenos al material vegetal. Se introdujo mediante una bomba un flujo de (18 l aire/min) para mantener el volumen y todos los volátiles eran absorbidos en diferentes matrices tales como TENAX GC, Chromosorb,... El objeto de este estudio ha sido aproximarnos más a la emisión real de componentes volátiles procedentes de hospedante vivo, con su flujo vascular intacto, en condiciones controladas de laboratorio.

Mediante técnicas de recolección de compuestos volátiles, tales como hidrodestilación modificada, microextracción en fase sólida (SPME) o colección dinámica de espacios de cabeza (DHS) se aislaron los volátiles difundidos por estas especies arbóreas. La aplicación de técnicas cromatográficas y espectroscópicas (GC-MS, GC-HRMS) han permitido identificar 52 compuestos volátiles presentes en cinco especies de plantas hospedantes de *C. tenebrionis* del género *Prunus*.

La siguiente tabla (Tabla 11) muestra los resultados indicándonos que no existe una variación cualitativa de componentes significativa, si bien cuantitativamente si hay una elevada variación.

Tabla 11. Compuestos volátiles aislados mediante técnica de espacio de cabeza DHS y presentes en árbol intacto de tres especies del género *Prunus*

nº	T _R	compuesto		almendro	ciruelo	melocotonero
1	3,14	hexanal	a	0,86	tr	tr
2	4,60	E-2-hexenal / Z-3-hexenol *	a	tr	1,28	tr
3	7,38	benzaldehido	a	tr	tr	1,3
4	9,30	Z-3-hexenil acetato	a	15,73	31,55	52,43
5	9,35	hexil acetato	a	-	-	0,03
6	9,49	E-2-hexenil acetato	a	-	1,35	0,08
7	10,00	limoneno	a	tr	1,46	2,07
8	10,25	(E)-2-hexenol	a	2,8	3,13	2,45
9	10,94	E,â- ocimeno	a	3,22	2,76	8,57
10	12,86	metil benzoato	a	-	-	0,31
11	13,15	hexanol	a	2,71	1,53	1,04
12	13,31	nonanal	a	0,41	0,33	tr
13	13,87	DMNT	b	0,20	----	1,8
14	14,70	fenil acetónitrilo	b	-	-	0,27
15	15,07	Z-3-hexenil isobutanoato	a	-	-	-
16	16,03	bencil acetato	a	-	-	0,11
17	16,31	etil benzoato	a	1,91	1,14	1,38
18	16,66	naftaleno	a	-	0,85	-
19	17,10	Z3-hexyl butanoato	a	1,42	3,54	1,61
20	17,18	metil salicilato	a	0,26	tr	0,13
21	17,20	dodeceno	a	-	0,97	-
22	17,33	E-2-hexenil butanoato	a	-	0,8	0,24
23	17,68	dodecano	a	0,7	0,13	-
24	17,90	decanal	a	tr	0,46	0,27
25	19,15	Z-3-hexenil 2-metilbutanoato	a	1,43	0,73	0,2
26	19,29	Z-3-hexenil 3-metilbutanoato	b	-	0,16	-
27	20,83	etil salicilato	a	tr	-	-
28	21,93	tridecano	a	-	0,65	-
29	23,30	Z-3-hexenil tiglato	a	-	0,7	0,08
30	24,30	undecanol	a	-	0,21	-
31	25,49	â-copaeno	a	0,76	-	-
32	25,83	Z-3-hexenil lactato	b	-	0,7	-
33	26,02	â-bourboneno	a	14,23	-	-
34	26,26	â-elemento	a	0,63	-	-
35	26,33	1-tetradeceno	a	0,62	1,9	-
36	26,89	tetradecano	a	19,59	1,72	0,06
37	27,46	E,â-cariofileno	a	8,24	0,94	0,2
38	27,88	â-gurjuneno	a	2,17	1,05	0,14
39	28,14	E,â-bergamoteno	a	0,28	-	-
40	28,46	â-humuleno	a	1,21	0,35	0,09
41	29,09	E,â-farneseno	a	-	0,25	0,63
42	2,16	allo-aromdendreno	a	2,21	-	-
43	29,39	sesquiterpeno	b	0,54	0,32	-
44	30,18	germacreno D	a	13,26	1,47	-
45	30,69	Z,E, farneseno	b	0,98	0,56	0,17
46	30,75	pentadecano	a	-	0,55	-
47	31,36	E,E,â- farneseno	a	6,26	26,25	8,34
48	31,43	2,5-di-tert-butil fenol	b	-	0,6	-
49	33,76	Z-3-hexenil benzoato	a	0,3	0,67	0,13
50	34,37	sesquiterpeno	b	-	0,51	-
51	34,61	hexadeceno	a	0,77	1,78	-
52	34,80	hexadecano	a	-	0,57	-

Los datos más relevantes con respecto a estudios de campañas anteriores, en los que no se utilizaron plantas vivas con respecto al perfil volátil son:

1. La mayoría de los metabolitos identificados son producidos por muchas especies vegetales y son productos de las distintas rutas biosintéticas comunes a otras especies.
2. Las condiciones fisiológicas del hospedante y su procesado en el laboratorio determinan en un elevado porcentaje, la composición cuantitativa de los volátiles emitidos por la planta. Así en condiciones de estrés o decaimiento de la planta, así como, cuando utilizamos material vegetal recolectado en condiciones exsitu, generamos un perfil más rico en aldehídos de cadena corta (nonanal, decanal,...) volátiles generados por la vía de los ácidos grasos/lipooxigenasa.
3. Un dato significativo es la emisión del fenil-derivado benzaldehído que está fuertemente condicionada por el estado fisiológico de la planta y cuya concentración aumenta con el estado de decaimiento o inicio de la necrosis de algún tejido del material vegetal. Igual conclusión podemos sacar del DMNT o salicilato de metilo
4. Los componentes mayoritarios, comunes a las distintas especies estudiadas, son volátiles de hojas verdes (GLV) tales como el *E2*-hexenol, *Z3*-hexenyl acetato, *E*-ocimeno, *Z3*-hexenyl acetato, *n*-hexyl acetato y 1-hexanol. En general, todos estos compuestos son liberados cuando las hojas están sometidas a daños mecánicos o por acción de microorganismos.
5. Metabolitos derivados de la vía biosintética del mevalonato, en concreto sesquiterpenos tales como el β -cariofileno, α -muroleno o *E,E*-farneseno son comunes a las especies estudiadas. Hay gran número de referencias que indican que estos compuestos participan en mecanismos de defensa de la planta frente a microorganismos, inhibidores de germinación o repelentes de fitófagos.

Una vez determinado el perfil volátil, el siguiente paso consistió en desarrollar una serie de bioensayos en los que se determinarían la actividad o no de los distintos compuestos aislados e identificados. Para ello se propuso dos tipos de ensayos de laboratorio: ensayos de electroantenografía, mediante los cuales podemos determinar, cuáles de ellos son detectados por *C. tenebrionis* y son candidatos a participar en la comunicación química de esta especie.

Las experiencias de EAG fueron realizadas con un sistema electroantenográfico comercial (Syntech, Hilversum, Holanda) que consiste en una sonda con un electrodo metálico dual (Syntech MTP-4) para fijar la antena conectado a un amplificador de corriente alterna/continua (Syntech UN-06) y un módulo controlador de los estímulos (Syntech CS-05) que consta de una bomba con regulador de flujo y un módulo para la adquisición de datos Autospike IDAC (Figura 20).

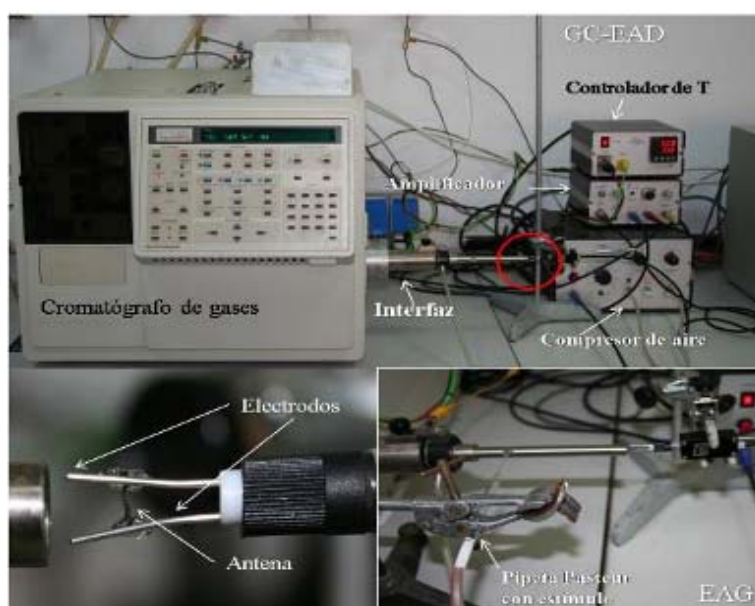


Figura 20. Montaje EAG y GC-EAD utilizado en los estudios.

De ellos se ha determinado cuáles de los compuestos identificados son activos a nivel de la antena de *C. tenebrionis* en electroantenografía (EAG) y se ha estudiado el efecto de la cantidad y posibles diferencias entre sexos (Figura 21)

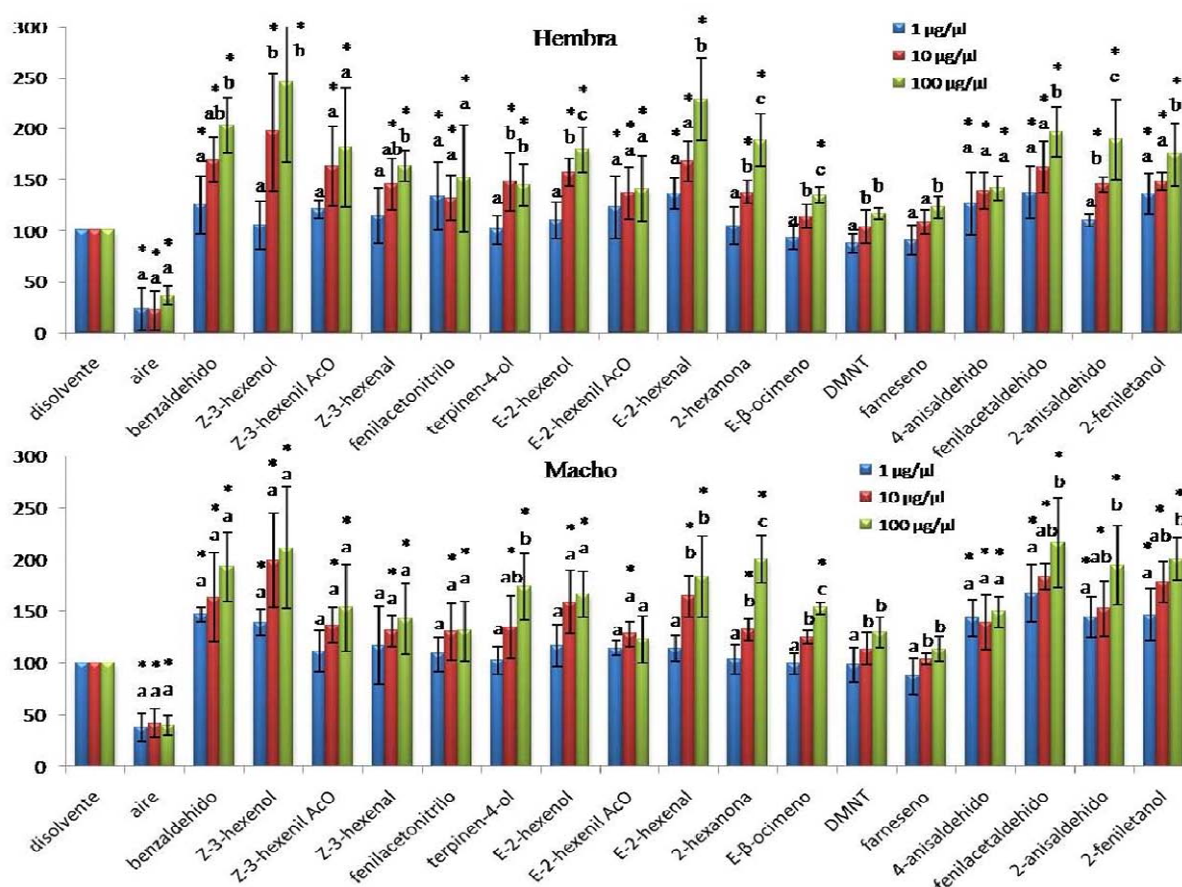


Figura 21. Respuesta relativa a 1µl de disolvente (hexano) en EAG en antenas de *C. tenebrionis* de volátiles detectados en *Prunus*.

1. Compuestos fenil-derivados tales como: fenil acetaldehído, 2-feniletanol o 2-anisaldehído son significativamente activos en las antenas tanto de adultos hembras como en machos. Mostrando una actividad significativa en la recepción de la señal.
2. Volátiles de hojas verdes tales como (*Z*)-3-hexenol, 2-hexanona; (*E*)-2-hexenal presentan actividad EAG sobre las antenas.
3. Ninguno de los mono, hemi o sesquiterpenos comunes a todas las especies estudiadas, presenta actividad electroantenográfica alguna, de ahí que su función biológica de actividad como inductores de comportamiento de *C. tenebrionis* queda descartada en las condiciones estudiadas.

A partir de los datos de EAG, se inicia un protocolo de trabajo de bioensayos en túnel de viento y arena, para tratar de discernir, cuáles de los compuestos activos en electroantenografía inducen un comportamiento atractivo, repelente o agregativo para los adultos de *C. tenebrionis*.

3.4.2. Bioensayos de compuestos candidatos a inducir un comportamiento determinado entre individuos adultos. Ensayos de arena y/o túnel de viento.

El túnel de viento utilizado (Figura 22) fue una urna de cristal de 150 cm x 40 cm x 40 cm unido por las aristas con placas de aluminio. La urna consta de una tapa móvil de cristal por donde se introducen los insectos. Un extractor se colocó en uno de los fondos, contrario al fondo donde se situó el estímulo. Así, los insectos se colocaron en el lado del extractor y se movieron en

dirección al estímulo a contracorriente. El extractor se reguló de forma que en el interior se producía un flujo de 10-15 cm/s. En la entrada y salida de aire se colocó una malla metálica para impedir que los insectos escaparan por los orificios. Se hacen cinco zonas idénticas en orden decreciente de flujo de aire, que se numeran del 1-5 correspondiendo la zona 5 la más próxima a la fuente de emisión del compuesto a ensayo.

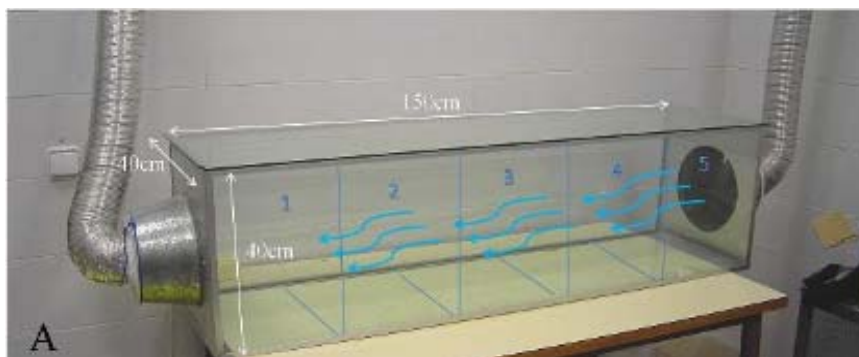


Figura 22. Túnel de viento usado en los bioensayos con volátiles.

En los ensayos de arena se empleó un Túnel en Y de metacrilato, con caudal controlado de aire en condiciones controladas de luminosidad, temperatura y humedad. Túnel de viento de vidrio (170x60x60 cm) con salida y entrada al exterior y prefiltro de carbón activo. Los bioensayos permiten cuantificar la atracción de los compuestos ensayados frente al control.

Para estos ensayos se utilizaron un 72 adultos capturados directamente de parcelas de cerezo (*Prunus avium*) durante los meses de Mayo a Agosto con un índice de infestación bajo (<10%), ubicadas en el término municipal de Chilluevar (P.N. Sierra de Cazorla) en el Noreste de Andalucía. Se trasladaron al laboratorio, separaron por sexos en cajas, manteniendo unas condiciones de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, $40\pm 10\%$ R.H. bajo fotoperiodo natural. Se alimentaron fundamentalmente con brotes jóvenes de almendro (*P. amygdalus* Batsch). Los insectos seleccionados para ensayos electroantenográficos se seleccionaron según un criterio de buen estado de tarsos y mandíbulas según datos bibliográficos (Ben-Yehuda and Mendel 2001).

Todos los compuestos a ensayo fueron suministrados por distintas fuentes comerciales excepto algunos ésteres y el hemiterpeno DMNT que fue sintetizado acorde con la bibliografía. Todos los compuestos presentaban una pureza superior al 90%. Se preparan disoluciones entre 100 ng a 10 μg como estímulo en túnel de viento. Los compuestos ensayados son los fenilderivados benzoato de etilo, salicilato de metilo, benzaldehído, alcohol bencilico y fenilacetoniitrilo, los volátiles de hojas verdes (*Z*)-3-hexenol, *E*-2-hexenal, (*Z*)-3-hexenol, acetato de (*Z*)-3-hexenilo, 3 - metil-butanoato de (*Z*)-3-hexenilo. Durante los bioensayos se han estudiado la atracción hacia la fuente de emisión de componentes individuales, tanto de individuos macho como hembra. También se utilizaron extractos, distintas concentraciones de compuestos de síntesis y mezclas de ellos. Los resultados muestran que las dosis más activa es de 10 μg en los significativamente hay mayor atracción.

Los datos más relevantes con respecto a estudios de túnel de viento son:

1. El benzaldehído es el componente que presenta la mayor actividad en el bioensayo permaneciendo el 17% del tiempo en la zona 1 y el 62% en la zona5+contacto.
2. De los denominados volátiles de hojas verdes, el *E*-2-hexenal induce una permanencia de sólo el 27% en la zona5+contacto y de 58% en la zona. (*Z*)-3-hexenol significativamente atrae más que el blanco.
3. No hay diferencias significativas entre la atracción del macho y hembra. La dosis óptima para ensayos es de 10 μg .

3.4.3. Ensayos de campo con trampas cebadas con distintos compuestos/mezcla

El área experimental está situada en el término municipal de Chilluevar, en el Parque Natural de Cazorla, Segura y las Villas. La parcela de ensayo consistió en una plantación irregular de 1,3

Has con 82 cerezos (*Prunus avium*) con un moderado historial de infestación por *C. tenebrionis*. Se utilizaron viales de 4 ml de PE como difusores, cebados con componentes individuales o mezclas de compuestos volátiles identificados en la trampa huésped. En el caso de extractos se utilizaron viales de PP con 1ml de capacidad (Bohlender GmbH y Deltalab). Se utilizaron también viales de 1 ml de PE con tapón de caucho (Semiotrap), en el caso de aplicación de extractos de insectos. Se utilizaron trampas laminares con pegamento permanente (Syngenta) amarillas ó purpura y funnel (Semiotrap) y delta (Nutesca). Los conteos fueron semanales, diferenciando las capturas de machos y hembras según el tipo de trampa y cebo utilizado. La cantidad de mezcla total de componentes o compuestos individuales fue de 1000 mg en el caso de componentes volátiles (N=8) y 5 equivalente de adulto en el caso de extractos de *C. tenebrionis* (N=4).

Las mezclas de componentes volátiles identificados y con actividad electroantenográfica, así como los extractos hexánicos de adultos macho, no presentaron capturas significativas en ningún tipo de las trampas ensayadas con respecto al control (trampa y difusor idénticos, cebado con disolvente).

Las trampas cromáticas púrpura con extracto hexánico de hembras presentaron unas capturas reducidas (1,2 adultos/trampa y semana), pero difieren significativamente de los controles correspondientes.

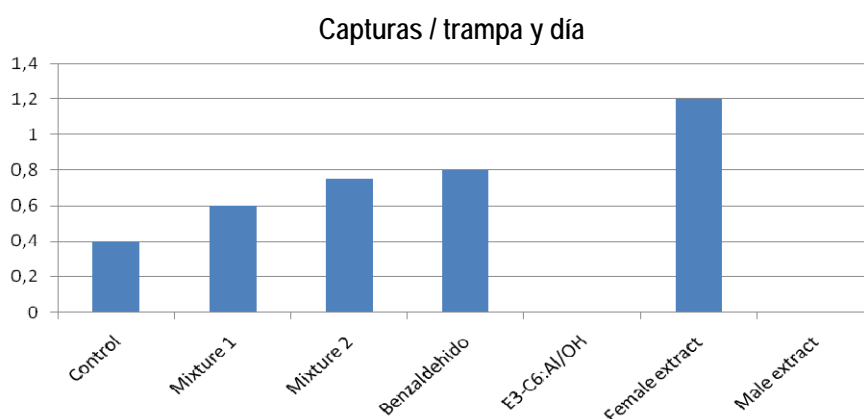


Figura 23. Capturas de *C. tenebrionis* en trampas cromáticas con distintos cebos. (N=3) en los ensayos de 2010.

3.4.4. Identificación de componentes presentes en distintas partes de los adultos macho y hembra de *C. tenebrionis*

Las feromonas son compuestos químicos que inducen comportamiento entre individuos de la misma especie. A pesar de los trabajos y estudios realizados en varias familias de coleópteros, no existen apenas referencias sobre la existencia y el tipo de posibles feromonas utilizadas por las especies de la familia Buprestidae. Ello nos obliga a tratar el estudio desde diferentes estrategias para estudiar los distintos tipos posibles de feromonas. Se inicio el estudio para determinar la existencia de feromonas de contacto, que suelen ser compuestos alifáticos ramificados poco volátiles (>C₂₀) y por otro lado feromonas sexuales o de agregación (de largo alcance) que suelen ser compuestos volátiles C₆-C₁₀. En muchos casos, los volátiles del hospedante estimulan la producción de feromonas, de ahí que se opta por recoger compuestos en presencia de la planta hospedante.

Para ello, hembras fueron introducidas vivas en un congelador a -10°C durante 30-40 min hasta su muerte y luego expuestas a la temperatura del laboratorio durante 15 min hasta que recuperaron la temperatura de trabajo. En las mismas condiciones hembras lavadas con hexano fueron congeladas y después lavadas en hexano durante 5 min con 5 ml de hexano en un vial de 10 ml. Se dejó secar durante 40-50min el disolvente a temperatura ambiente antes de presentar las hembras lavadas a los insectos.

En 2010 se identificaron más de 40 componentes en extractos cuticulares pero no aparecieron (Figura 24) diferencias cualitativas en la composición de los extractos entre machos y hembras, presentando un perfil volátil similar, formado fundamentalmente por hidrocarburos lineales (C₂₅ a C₂₉). En búsqueda de feromona de contacto, los extractos cuticulares, no muestran un

comportamiento en arena que induzca un reconocimiento del sexo opuesto. Estos datos previos, nos inducen a proponer la inexistencia de una feromona de contacto entre individuos de sexo opuesto.

Entre los extractos (tubo digestivo, genitalia, protórax, heces,...) sólo el extracto hexánico de la genitalia de las hembras presenta actividad EAG en las antenas de los machos. Los resultados preliminares parecen indicar la presencia de 2-metil-butanol y su homólogo aldehído como componentes que presentan de forma significativa mayor actividad en las antenas de los machos. Aunque estos compuestos no son mayoritarios en el extracto de hexano de la genitalia pero no hemos podido detectarlo en volátiles emitidos por insectos vivos, de ahí que fuera necesario introducir este punto en los objetivos de último año como preferencial en la conjunción de recolección de componentes volátiles de hembras vivas mediante técnicas de SPME ó DHS, para confirmar su posible implicación en la comunicación interespecífica de los adultos de *C. tenebrionis*.

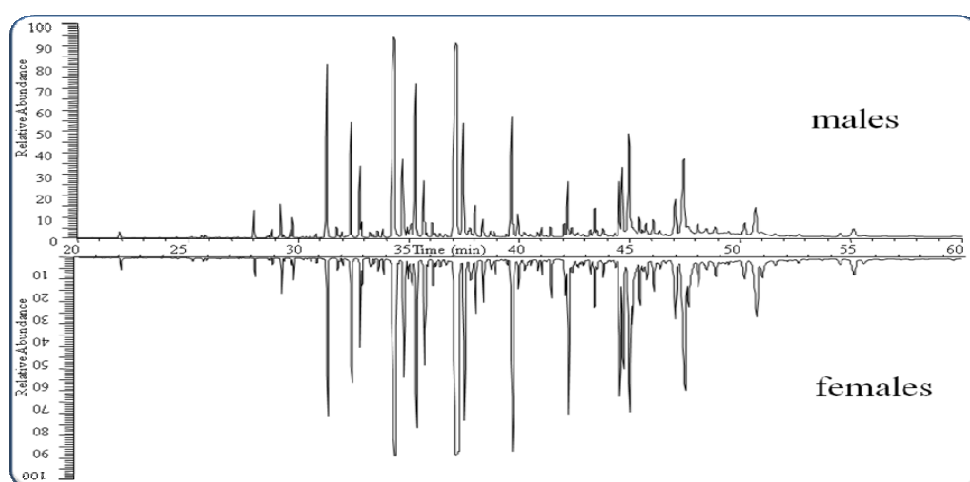


Figura 24. Perfil volátil (GC-MS) de extractos cuticulares de *C. tenebrionis* hembra y macho

En 2011 también se ha estudiado en ensayos de arena el comportamiento de cortejo y precópula en busca de posibles feromonas de contacto que puedan estar implicados.

En la mayoría de las ocasiones se ha visto como mientras que la hembra permanece inmóvil, ésta extrae una parte de su genitalia y realiza una serie de leves movimientos de vaivén con esta parte. Tras esto el macho agita las antenas enérgicamente y con posterioridad se produce la cópula. Este comportamiento sugiere que la hembra manda algún tipo de señal hacia el macho tras la cual éste comienza el acercamiento.

Tabla 12. Respuesta de machos de *C. tenebrionis* hacia hembras en placa Petri

	nº machos	% machos sin respuesta	% machos en cada paso secuencial ^a			
			paso 1	paso 2	paso 3	paso 4
Hembra viva	24	33	100	100	94	50
Hembra muerta	20	30	100	100	93	0
Hembra lavada con hexano	20	15	100	82	82	0

^a: paso1: orientación; paso2: alineación; paso3: monta sobre hembra; paso 4: intento cópula
 *: significativamente diferentes a nivel de P=0,05 con respecto a la respuesta con hembras vivas

Mientras que un 50% de los machos que respondieron intentaron copular con las hembras vivas, con las hembras muertas ninguno intentó copular y lógicamente tampoco intentó copular ninguno tras lavar las hembras con hexano, lo cual sugiere que en el caso de *C. tenebrionis* la hembra tienen un papel importante en el ritual del acoplamiento que es indispensable para que éste se

lleve a cabo. Esto podría explicar el comportamiento que muestra la hembra antes del apareamiento descrito en este estudio.

Como conclusión, los ensayos en placa de Petri, junto a con el análisis de hidrocarburos de la cutícula de adultos, sugieren que no existe feromona de contacto en esta especie. No existen diferencias significativas entre los hidrocarburos cuticulares de ambos sexos.

Estudios anteriores tampoco muestran actividad de tipo sexual en la atracción entre adultos de *C. tenebrionis*.

Con respecto a la posible existencia de feromona de largo alcance, se realizaron recolecciones mediante la técnica recolección dinámica de volátiles a grupos de insectos separados por sexos, aislados o conjuntamente con tejido vegetal de sus plantas hospedantes. Comparando la composición de los volátiles presentes en la atmósfera dentro de la cápsula de recolección, entre machos y hembras, y entre tejido vegetal sin insectos y con insectos se podría identificar algún o algunos compuestos determinados emitidos por los insectos y no por la planta o emitidos por un sexo y no por otro.

Gran parte de los compuestos extraídos son hidrocarburos cuticulares y compuestos procedentes del material vegetal utilizado en su dieta. El conjunto de los datos obtenidos en EAG y GC-MS de los extractos de las distintas partes internas son indicativos de la ausencia de semioquímicos propios de los individuos adultos sintetizados *de novo*, o a partir de compuestos ingeridos en el alimento ni en hembras, ni en machos, que sean responsables de la actividad electroantegráfica demostrada por parte de algunos extractos; lo que no demuestra la producción de algún tipo de feromonas de largo alcance detectables en EAG a la cantidad estudiada, que fue de 2 equivalentes (cantidad equivalente a la presente en 2 adultos).

Tabla 13. Volátiles identificados en espacio de cabeza de extractos con MeOH en diferentes tejidos de *C. tenebrionis* alimentados con peciolo del género *Prunus*

Nº	compuesto	% área					
		Apsex macho	Apsex hembra	Restos macho	Restos hembra	Tubo macho	Tubo hembra
1	benzaldehído	-	tr	3,49	4,51	14,77	28,67
2	E3-hexenal	-	-	-	-	-	6,11
3	fenol	-	-	-	-	19,78	9,7
4	octanal	10,17	1,22	-	-	-	-
5	limoneno	-	2,64	5,23	-	-	-
6	n-HC ₁₁	36,51	60,29	47,04	39,75	14,36	***
7	metil benzoato	-	**	14,2	**	**	29,88
8		35,23	17,71	12	37,41	9,95	2,79
9	silano derivado	-	1,6	3,17	3,11	-	-
10	No identificado	-	-	-	-	15,01	3,27
11	E-2-decenal	-	-	-	-	9,13	2,96
12	No identificado	-	-	-	-	3,13	0,76
13	No identificado	3,19	-	-	3,15	-	0,31
14	Hidrocarburo C ₁₂	-	2,85	-	-	-	-
15	Hidrocarburo C ₁₅	-	2,53	8,91	12,08	-	0,47
16	No identificado	-	1,01				
17	silano derivado	-	-	0,64	-	-	6,94
	área benzaldehído *	no detectado	62959	116277	68351	746208	4116554

Los resultados obtenidos hacen plantearse nuevas estrategias más efectivas en determinar si los adultos de *C. tenebrionis* tienen algún tipo de tejido interno dedicado a la producción o almacenamiento de feromonas de largo alcance (volátiles) y a su vez proponer la hipótesis de que señales de tipo químico procedente de insectos vivos no intervienen de forma significativa en el comportamiento de adultos *C. tenebrionis*.

3.4.5. Instalación en campo de distintos componentes y mezclas procedentes de insectos y hospedantes. Uso de distintos diseños de trampas, utilizando la variable cromática como posible punto crítico

Los ensayos de campo se realizaron en dos parcelas de aprox. 2 Has cada una, situadas en la pedanía de Guadalimar, término municipal de Lupión (Jaén). Predominaban especies de *Prunus* con pies aislados de otras especies. La parcela 1, con plantación de ciruelos y albaricoques, presenta una extensión aproximada de 1,1 has y la parcela 2 tiene una extensión aprox. de 0,8 has en la que predominan los melocotoneros.

Como atrayente utilizamos compuestos individuales o mezclas de Z3-hexenol, E2-hexenol, Z3-hexenyl acetato, E-ocimeno, Z3-hexenyl acetato, n-hexyl acetato y 1-hexano utilizando hexano o etanol absoluto como disolvente. Las cantidades empleadas estuvieron comprendidas entre 10 y 100 mg/difusor y se utilizaron difusores formulados por Semiotrap SL (<http://www.semiotrap.com/>) con LDPE y films de distintos grosores y porosidades.

Las trampas fueron también suministradas por Semiotrap y abarcan distintos modelos utilizados con coleópteros, tales como multifunel, tipo prisma, placas engomadas, trampas delta,.....

Se colgaron las trampas a una altura aproximada de 2 m y se desplegaron un total de 30 trampas (15 por parcela), doce de ellas cebadas con distintos cebos y 3 como blanco.

El estudio se inició en Julio de 2011 ya que la anormales temperaturas de este año, fresca respecto años anteriores, provocaban una muy baja presencia de adultos de *C. tenebrionis* en ambas parcelas.

La mayoría de las capturas se han conseguido entre las semanas 4ª y 6ª correspondiente a finales Julio-2 semana de Agosto en placas engomadas cruzadas de color morado y con una mezcla tricompente de alcoholes y acetatos monoinsaturados con etanol como disolvente.

Tabla 14. Capturas de adultos de *Capnodis tenebrionis* mediante distintos tipos de trampa

Tipo trampa	Insectos/trampa Julio	Insectos/trampa Agosto	Insectos/trampa Septiembre	Insectos/trampa Octubre
Prisma	0,3	0,8	0,5	
Funnel	0	0	0	
Placa engomada cruzada	0,7	1,5	1,0	
Trampa delta	0,3	0,1	0	
Trampa multiembudo	0	0	0	

Los datos recogidos en la Tabla 14 sugieren:

1. Las trampas de color púrpura capturan mayor número de individuos que las de otros colores tales como el blanco o verde. A partir de ensayos en Julio, todas las trampas utilizadas tenían azul-morado como color uniforme.
2. Las placas engomadas cruzadas presentan el mayor número de capturas, pero hay que hacer una modificación (añadir una base), ya que se observan en suelo y proximidades adultos impregnados de pegamento. Es necesaria la utilización de un pegamento de gran persistencia y mayor fluidez del utilizado.
3. Difusores cebados con mezclas 10 mg de **E2-hexenol**, **Z3-hexenol**, **Z3-hexenyl acetato** y etanol como disolvente presentan el mayor índice de capturas.

4. AGRADECIMIENTOS

El equipo de investigación agradece la financiación de este estudio al Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación que en 2008 suscribió con el INIA la “Encomienda de Gestión para la Realización de Proyectos de Investigación en el Ámbito de la Agricultura Ecológica”. Agradecemos también a los agricultores su colaboración proporcionando las fincas de ensayo y capturando insectos adultos para los ensayos.

5. CONCLUSIONES

Como se ha visto en los apartados anteriores la información obtenida en este proyecto es muy abundante. Las conclusiones más relevantes desde un punto de vista práctico son las siguientes:

- La fibra sintética “Abfor” no permite el paso de las larva neonatas de *C. tenebrionis* cuando se coloca en forma de doble capa y podría ser un buen material para usarse como barrera física, enterrándola alrededor de los pies de los árboles. De esta se forma impediría a las larvas llegar a las raíces de las plantas.
- El caolín (Surround® WP) aplicado a la superficie de puesta (suelo o tronco) puede reducir la puesta de las hembras.
- La pulverización del follaje de los árboles con caolín o azadiractina (Align) parece una herramienta muy prometedora para combatir preventivamente esta plaga cuando acuden a comer a los brotes en primavera.
- Hasta el momento, con los datos que disponemos, dos aislados de *B. bassiana* presentan buen poder insecticida para su desarrollo como materias activas de insecticidas microbianos contra *C. tenebrionis*.
- Se a encontrado un aislado autóctono del nematodo *Steinernema feltiae*, procedente de suelos extremeños, designado 004MC, que ha demostrado tener una virulencia sobre *C. tenebrionis* superior a la actividad insecticida por contacto del producto insecticida Imidacloprid.
- Se ha descubierto que toda o una parte de la población de adultos invernantes se encuentra –en contra de lo que la bibliografía establece–, en las ramas de los árboles, razón por la cual el tratamiento de los mismos durante el invierno es una medida muy recomendable, ya que de esta forma se pueden eliminar a los primeros adultos que comienzan su actividad parasitaria en la primavera.
- Las piretrinas naturales emulsionables, han mostrado ser una poderosa herramienta a utilizar en el control de *C. tenebrionis* en plantaciones ecológicas de frutales.
- La utilización de serrín de raíz de ciruelo ha demostrado ser muy eficaz para su inclusión en la dieta artificial para la alimentación de larvas de *C. tenebrionis*.
- Se ha realizado un profundo estudio de los semioquímicos de *C. tenebrionis* y su posible aplicación al seguimiento y control de la plaga. Aunque por el momento no se ha conseguido identificar compuestos feromonales emitidos por los adultos, estudios electrofisiológicos indican una elevada actividad sobre los mismos de gran número de compuestos volátiles procedentes de los árboles hospedantes. Dichos compuestos podrían tener utilidad en condiciones de campo con un diseño de trampa y difusor óptimos pero, por el momento, las trampas y compuestos semioquímicos ensayados han mostrado un reducido número de capturas, si bien las trampas engomadas cruzadas de color morado presentan el mayor número de capturas de adultos.

6. PUBLICACIONES Y OTROS TRABAJOS DE DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Evaluación en laboratorio de repelentes/disuasorios para el control de *Capnodis tenebrionis* (Linnaeus) (Coleoptera: Buprestidae). Cobos, G.; Esteban Durán, J.R.; Melgares De Aguilar, J.; González Martínez, D.; González-Núñez, M.. VI Congreso Nacional de Entomología Aplicada. Palma de Mallorca. 19/10/2009. Poster.

Potencial del caolín como barrera física en el control del gusano cabezudo en plantaciones frutales. Cobos Hernández, G.; Melgares De Aguilar, J.; González Martínez, D.; Cobo, A.; González Núñez, M. IX Congreso de SEAE "Calidad y seguridad alimentaria" Lleida 6-8/10/2010. Poster.

Efecto del caolín y la azadiractina sobre adultos de *Capnodis tenebrionis* (L.). Cobos, G.; Cobo, A.; Melgares De Aguilar, J.; González Martínez, D.; Sánchez-Ramos, I.; González-Núñez, M. VII Congreso Nacional de Entomología Aplicada. Baeza (Jaén) 24-28/10/2011. Poster.

Aportaciones al control de la plaga de *Capnodis tenebrionis* en Extremadura. Del Moral, J. et al. Congreso Nacional de Entomología Aplicada VII Congreso Nacional de Entomología Aplicada. Baeza (Jaén) 24-28/10/2011. Poster.

Selección de aislados de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin para el control de lepidópteros defoliadores de la encina. Ortega García, M.D.; Vargas Osuna, E.; Aldebis, H.K.. VII Congreso Nacional de Entomología Aplicada. Baeza (Jaén) 24-28/10/2011. Comunicación oral.

Potencial del caolín como barrera física en el control del gusano cabezudo en plantaciones frutales. Cobos Hernández, G.; Melgares De Aguilar, J.; González Martínez, D.; Cobo, A.; González Núñez, M. (2011). *Vida Rural*, Nº 329, págs. 28-33.

Evaluación del caolín como herramienta de control de plagas en cultivos mediterráneos ecológicos González-Núñez, M.; Sánchez-Ramos, I.; Cobos, G.; Marcotegui, A.; Cobo, A.; Pascual, S.. XI Simposio Internacional y VI Congreso Nacional de Agricultura Sostenible. San Luis de Potosí (México) 7-12/11/2011. Poster

- Se ha acordado con el Centro de Publicaciones del MARM la edición de una monografía, dentro de la serie Hojas divulgadoras, sobre "**Las plagas del Gusano cabezudo (*Capnodis tenebrionis* L.) en los frutales de hueso y medidas recomendables para su control**"
- ***Capnodis tenebrionis* L. electrophysiology responses to volatiles from *Prunus* host plant species and behavioural activity to some compounds.** Ortiz et al. (en preparación). *J. Chem. Ecol.*
- **Effects of kaolin and azadiractin on adults of *Capnodis tenebrionis*.** Cobos et al. (en preparación).

Otros trabajos de difusión de resultados

- Seminario "*Capnodis tenebrionis* (Linneo, 1735). Programa de transferencia tecnológica Finca la Orden-Valdesequera 2009.
- Seminario "Una alternativa biológica al uso de agroquímicos para el control de plagas" Programa de transferencia tecnológica Finca la Orden-Valdesequera 2010.
- Seminario: "Control biológico del gusano cabezudo (*Capnodis tenebrionis*) mediante nematodos entomopatógenos. Semana cultural de Guadajira 08-10-2010.
- Conferencia: "Entomopatógenos: una alternativa biológica al uso de agroquímicos para el control de plagas" Escuela de Ingenierías Agrarias de Badajoz 25-02-2010.

- Conferencia: “Entomopatógenos: una alternativa biológica al uso de agroquímicos para el control de plagas” Escuela de Ingenierías Agrarias de Almedralejo 04-11-2010.
- Reunión técnica con Formuladores Agroquímicos Extremeños S.A.L., dedicada a la posible elaboración industrial de entomopatógenos como productos fitosanitarios 23 -03-2011.

Trabajo Fin de Máster

CARO DE LA BARRERA, S. (2011). Actividad insecticida de aislados de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera, Buprestidae). Trabajo Fin de Máster. Máster de Producción, Protección y Mejora Vegetal. Universidad de Córdoba. Pendiente de Lectura.