

## Cultivo en el laboratorio en una dieta artificial del taladro de la madera, *Zeuzera pyrina* L. (*Lepidoptera cossidae*)

F. GARCÍA DEL PINO y A. DE HARO

En este trabajo proponemos una dieta artificial original para la alimentación de las larvas del taladro de la madera, *Zeuzera pyrina* L.

Las larvas de este lepidóptero viven en el interior de los troncos de los árboles y necesitan un año para completar su ciclo biológico, por ello se hace muy difícil un estudio directo de su biología en condiciones naturales.

El cultivo en el laboratorio en esta dieta artificial, permite obtener gran número de individuos en todas sus fases de desarrollo, reduciendo su ciclo biológico en unos tres meses, lo que facilitará el estudio de diferentes aspectos de su biología (desarrollo, etología, métodos de lucha, etc.).

GARCÍA DEL PINO, F., DE HARO, A. Departamento de Zoología. Universidad Autónoma de Barcelona.

### INTRODUCCION

El taladro de la madera, *Zeuzera pyrina* L. (*Lepidoptera, Cossidae*), es uno de los mayores enemigos de los árboles frutales, causando graves daños especialmente al manzano, peral y avellano, si bien es una especie muy polífaga habiéndose encontrado hasta 74 especies susceptibles de ser parasitadas.

Debido a la biología de las larvas de este lepidóptero, que pasa la mayor parte de su vida en el interior de las ramas de los árboles, no es posible conseguir un control total de la plaga a través de la lucha química. Únicamente se obtiene una reducción de la misma utilizando altas concentraciones de insecticidas, lo que provoca un profundo desequilibrio ecológico de la fauna natural de los cultivos, que facilita la proliferación de otros tipos de plagas (p.e. ácaros). Por ello hay que dirigir los estudios hacia la búsqueda e integración de métodos de con-

trol biológico para la reducción de la población de esta plaga, siendo imprescindible su cultivo en el laboratorio en una dieta artificial que permita disponer de suficientes individuos en todas las fases de desarrollo para su estudio.

Únicamente se han realizado dos intentos de cultivo en el laboratorio de este insecto (MOORE, I., NAVÓN, A. 1966 y NAVÓN, A., 1977).

El propósito de este trabajo es el cultivo en el laboratorio de *Zeuzera pyrina* L., mediante una dieta artificial que le aporte todos los componentes nutritivos necesarios para su desarrollo, así como un sustrato idóneo (dureza, textura, hidratación, etc.) para que las larvas puedan realizar sus galerías y así alimentarse.

### MATERIAL Y METODO

El material vivo (larvas y huevos) utilizados para iniciar nuestro cultivo fue recogido

Cuadro nº 1.—Componentes de la dieta artificial para *Zeuzera pyrina* y proporción de los mismos

Componentes:			
Semillas de soja .....	100	g.	6,4 %
Leche en polvo .....	70	g.	4,5 %
Levadura .....	70	g.	4,5 %
Sacarosa .....	40	g.	2,5 %
Acido linoléico .....	3,4	ml.	0,21 %
Vitamina C .....	7	g.	0,45 %
Agar .....	24	g.	1,5 %
Celulosa .....	140	g.	9,0 %
Metil-parahidroxibenzoato	3	g.	0,19 %
L-Cloranfenicol .....	0,25	g.	0,016%

en plantaciones de avellanos (*Corylus avellana*) situadas en el término municipal de Constantí (Tarragona). Estos individuos, así como la primera generación cultivada en el laboratorio, fueron utilizados para los primeros ensayos en la puesta a punto de la dieta artificial, siendo su descendencia utilizada para los estudios posteriores.

### Composición de la dieta

Los componentes de la dieta los podemos ver en el cuadro nº 1.

Seguidamente pasaremos a comentar la importancia de los diferentes componentes:

**Semillas de Soja:** La soja posee proteínas que proporcionan todos los aminoácidos esenciales para la nutrición del insecto. Sin embargo, la soja cruda contiene sustancias tóxicas (MICKELSEN y YANG, 1966) y sus proteínas son pobremente utilizadas. Por ello es necesario un tratamiento por calor que destruya estas sustancias tóxicas y produzca una mejora nutricional. Nosotros sometemos las semillas de soja a un proceso de esterilización por autoclave (20 minutos a 120°C), que, además de prepararlas para su correcta asimilación, evita que puedan ser portadoras de gérmenes que infecten la dieta.

La soja también puede aportar otros nutrientes como glúcidos y grasas, oscilando el contenido de estos según la variedad de la

planta, el sustrato y el clima donde crezca. Así podemos ver como el contenido en proteínas varía entre el 41 y el 51%, los hidratos de carbono entre el 25 y el 34% y las grasas entre el 1,5 y el 21% (WOLF y COWAN, 1971).

**Leche en polvo:** La leche es fuente principal de caseína, proteína ampliamente utilizada en dietas para insectos. La caseína junto con las proteínas de la soja, completan las necesidades de aminoácidos que requieren los insectos para su desarrollo.

Además, de proteínas, la leche aporta otros compuestos nutritivos como grasas, glúcidos y fosfoglicéridos (lecitina), sales minerales, calcio, fósforo, sodio y potasio y puede suministrar cantidades variables de diversas vitaminas.

**Levadura (*Sacharomyces cerevisiae*):** La levadura se usa principalmente para aportar vitaminas del grupo B y vitamina C, así como ciertos factores de crecimiento no determinados, del mismo modo es fuente de proteínas, glúcidos y sales minerales. También posee la propiedad de proteger a las vitaminas durante el proceso de calentamiento (ACKER, 1962).

**Sacarosa:** Es el principal aporte glucídico de la dieta, actuando también como principal nutriente fagoestimulante para los insectos fitófagos (BECK, 1956).

**Acido linoléico:** Es uno de los ácidos grasos polinsaturados necesarios para los insectos. Ha de ser incorporado directamente a la dieta, debido a la imposibilidad de ser sintetizado por los insectos a partir de sus precursores.

**Acido ascórbico (vitamina C):** Nutriente indispensable para los insectos fitófagos, es aportado a las dietas artificiales en una proporción de 0,5%, considerada como satisfactoria para su desarrollo.

**Agar:** El agar es la sustancia aglutinante, encargada de la retención del agua. La concentración utilizada (1,5%), junto con las sustancias estabilizantes, proporciona la dureza

za necesaria que permite a la larva realizar sus galerías.

**Celulosa:** Es la sustancia estabilizante encargada de evitar la presencia de agua libre que podría inundar las galerías. También posee la función de dar una textura adecuada a la dieta.

**Metil-parahidroxibenzoato:** Actúa como fungicida para evitar la proliferación de hongos en la dieta.

**L-Cloranfenicol:** Es utilizado como agente bactericida, evitando el desarrollo de bacterias que pueden alterar la composición de la dieta o provocar la muerte de la larva.

### Preparación de la dieta

Las semillas de soja con 100 ml. de agua destilada, se esterilizan en el autoclave durante 20 minutos. Después de este proceso, se dejan enfriar y se introducen en una licuadora *Osterizer*.

La levadura disuelta en 100 ml. de agua destilada, se calienta hasta la ebullición durante unos 5 minutos, con el fin de provocar su lisis y evitar su fermentación una vez incorporada a la dieta. Posteriormente se introduce la levadura en la licuadora.

La leche en polvo se incorpora directamente y junto con los dos compuestos anteriormente introducidos, se agitan hasta quedar perfectamente mezclados.

En un vaso de precipitados conteniendo 300 ml de agua destilada, se disuelve la sacarosa, el ácido ascórbico, el fungicida y el bactericida y se añaden a la licuadora.

El ácido linoléico es incorporado a la mezcla, siendo ésta batida en la licuadora durante unos 4 minutos, hasta alcanzar una perfecta homogenización de todos los componentes.

La celulosa se mezcla, a mano en un cristizador, con la solución que hemos preparado en la licuadora.

El agar se disuelve en 600 ml. de agua destilada y se calienta hasta la ebullición

para su completa fusión. Este se deja enfriar, hasta alcanzar una temperatura de unos 75°C, y se mezcla a mano con todos los demás componentes. La dieta así formada se introduce en una estufa a 60°C, para evitar su gelificación, hasta el momento de su distribución en los tubos.

### Técnica de cultivo

La dieta es distribuida en tubos de vidrio de 20 mm. de diámetro y 60 mm. de altura, con unos 13 g. de dieta cada uno.

Las larvas son colocadas en la dieta de forma individual. También se intentó la introducción de dos o tres larvas por tubo, pudiendo comprobar como no existía ningún efecto negativo en su desarrollo, estando únicamente limitado el espacio físico del tubo. En ningún caso se observó canibalismo entre las larvas, pero para tener un mayor control de éstas, se decidió colocarlas individualmente.

Los tubos son tapados con algodón cubierto por una película de *parafilm* ligeramente perforada para permitir la entrada de aire. Así se evita la excesiva deshidratación de la dieta que se produce cuando los tubos son tapados únicamente con algodón.

La dieta es sustituida cada mes por otra nueva, hasta alcanzar el completo desarrollo de las larvas.

Las crisálidas son extraídas de la dieta y transferidas a unos pequeños bloques de *poroexpand* de 3x5 cm., en los que se practica un orificio donde es colocada la crisálida. Esta situación ayudará a la emergencia del adulto.

Para mantener las condiciones ambientales necesarias para el cultivo continuado de insectos, utilizamos dos cámaras de cultivo diferentes. Los primeros trabajos, hasta el desarrollo de la segunda generación, se realizaron en una cámara de cultivo de 1,27 m<sup>3</sup> que mantenía una temperatura de 25±3°C, una humedad relativa del aire entre 50-60% y

un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Las larvas de la tercera generación se desarrollaron en otra cámara de cultivo de mayores dimensiones (15 m<sup>3</sup>) que mantiene una temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , una humedad del 60-70% HR y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

## RESULTADOS

### Biología

*La puesta:* Los huevos de *Zeuzera pyrina*, que son habitualmente depositados de forma agrupada, poseen una forma oval de 1,3

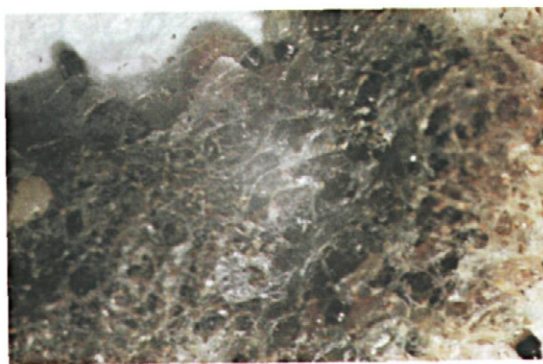


Fig. 2.—Nido de seda realizado por las larvas neonatas de *Zeuzera pyrina*.

milímetros de largo por 1 mm. de ancho. Tienen una coloración anaranjada (fig. 1),



Fig. 1.—Huevos de *Zeuzera pyrina* L.



Fig. 3.—Larva madura de *Zeuzera pyrina* en el interior de su galería en la dieta artificial.

aunque algunas puestas pueden poseer un color amarillo claro, no habiéndose observado ninguna relación entre el color de la puesta y la posibilidad de estar o no fecundada.

Los períodos de incubación oscilan entre 8 y 12 días desde la puesta de los huevos hasta la salida de las larvas neonatas.

*Larvas neonatas:* La eclosión de las larvas se produce de forma bastante sincrónica en toda la puesta. Hemos encontrado una altísima proporción de eclosión en los huevos de las puestas fecundadas (90-100%). Después de la eclosión estas larvas neonatas, que poseen un tamaño de 2,5 mm. de longitud, no se dispersan, sino que permanecen junto



Fig. 4.—Larva madura del último estadio de *Zeuzera pyrina*, tapizando las paredes de la galería, antes de transformarse en crisálida.



Fig. 5.—Crisálida de *Zeuzera pyrina* en el interior de la dieta artificial.

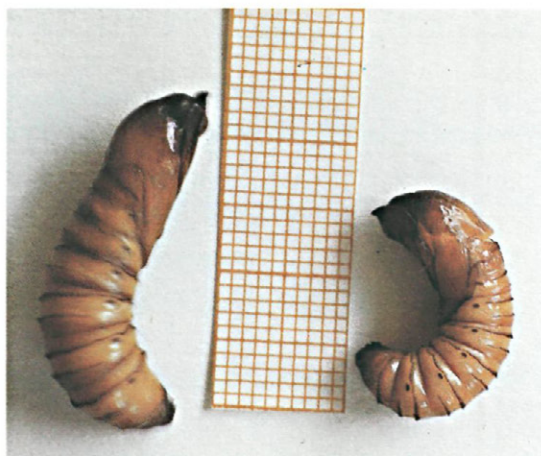


Fig. 6.—Crisálida hembra de *Zeuzera pyrina* (izquierda), apreciablemente mayor que el macho (derecha).

a sus hermanas formando entre todas un nido de seda que las recubre (fig. 2). Así permanecen durante uno o dos días, alimentándose de las cubiertas de los huevos, esperando que se den ciertas condiciones aún no determinadas (temperatura, humedad, iluminación, etc.), que producen su dispersión.

En este estado gregario es posible conservar las larvas neonatas en la nevera entre 8-10°C, evitando su dispersión hasta un máximo de 3-4 semanas.

**Larvas:** La larva se desarrolla en el interior de las galerías que realizan en la dieta artificial (fig. 3), hasta alcanzar un tamaño de unos 35-40 mm. (algo mayor en las hembras que en los machos) transformándose en



Fig. 7.—Adulto (hembra) de *Zeuzera pyrina*.

crisálida en el interior de las mismas (figuras 4, 5).

**Crisálida:** Poseen un tamaño de unos 30 mm. de largo por 7 mm. de ancho en las hembras, siendo algo menor en los machos (figura 6).

Las crisálidas poseen un dimorfismo sexual en la base de la antena que facilita su sexado: así, mientras las hembras poseen unas antenas filiformes, los machos las poseen bipinnadas en la base.

En este estado de crisálida, también es posible detener el metabolismo de las mismas, sometiéndolas a una temperatura de 9°C. Con este sistema se consigue sincronizar la emergencia de los adultos de diferente sexo y así conseguir un mayor número de acoplamientos.

**Adultos:** Las mariposas de *Zeuzera pyrina* cultivadas en el laboratorio, miden entre 25-28 mm. de longitud las hembras y entre 20-22 mm. los machos (fig. 7).

El número medio de huevos puestos por una hembra cultivada en el laboratorio es de 670. En condiciones naturales, este número varía según los autores, así mientras CARTER



Fig. 8.—Disección de una hembra de *Zeuzera pyrina*, donde se aprecia la bolsa copulatrix repleta por el espermatóforo del macho.

(1984) cita entre 100 y 800 huevos, BALACHOWSKY y MESNIL (1935), y DELLA BEFFA (1949) indican una capacidad máxima de 800 huevos. AUDEMARD (1967) señala una media de puesta de más de 1.000 huevos por hembra.

En cuanto a la anatomía interna del aparato reproductor de las hembras, la observación de la bolsa copulatriz nos es de gran ayuda para comprobar la posible fecundación de la hembra. Así una bolsa copulatriz repleta con el espermátforo, es señal inequívoca de su fecundación (fig. 8). Dicha observación se realiza en todas las hembras después de su muerte, lo que nos permite conocer si los huevos depositados por ella deben ser guardados para su incubación.

**DESARROLLO**

El cuadro nº 2, muestra los diferentes parámetros considerados en el desarrollo larvario de la segunda y tercera generación cultivada en laboratorio. Observamos como el período larvario es de alrededor de 100 días, frente a los 10-11 meses que dura en condiciones naturales cuando el ciclo se desarrolla en un año o los 22-23 meses cuando se desarrolla en dos años (5-15% de la población larvaria).

Cuadro nº 2.—Parámetros considerados en el desarrollo larvario de *Zeuzera pyrina* en la segunda y tercera generación (X media, SD desviación típica)

	Segunda generación		Tercera generación	
	X	SD	X	SD
Período larvario (días)	126,07±19,37		101,75±10,02	
Período pupal (días)	20,80± 4,47		17,25± 1,40	
Tamaño placa protorácica últ. muda (mm.)	2,35± 0,22		2,59± 0,26	
Peso crisálida (g.)	0,354±0,09		0,470±0,15	
Proporción de sexos	1♀: 1,3♂		1♀: 1,3♂	
	(65% de machos)		(65% de machos)	

Sobre la proporción de sexos, encontramos un 65% de machos, lo que se corresponde con la proporción de machos observada por AUDEMARD (1967) en condiciones naturales, que oscila entre el 60 y el 68%.

El cuadro nº 3, muestra la diferenciación sexual en el desarrollo. Como podemos ver en dicha tabla, el período larvario de los machos es menor que el de las hembras, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en la tercera generación (T-test p=0,013). Sin embargo, en el período pupal ocurre lo contrario, el de las hembras es menor que el de los machos, siendo también esta diferencia significativa en la tercera generación larvaria (T-test p=0,036).

Cuadro nº 3.—Diferenciación sexual en el desarrollo larvario de *Zeuzera pyrina* durante la segunda y tercera generación (X media, SD desviación típica, \*T-test significativo p<0,05)

	Segunda Generación			Tercera Generación		
	X	SD	T-test	X	SD	T-test
Período larvario (días)	125,71±19,3		0,869	99,14±10,0		0,013*
	126,35±19,6			105,74± 8,7		
Período pupal (días)	21,00± 3,8		0,762	17,60± 1,5		0,036*
	20,70± 4,9			16,73± 1,1		
Período larvario y pupal (días)	146,31±15,7		0,371	116,25±10,9		0,104
	149,62±16,4			121,36± 9,4		
Tamaño placa protorácica últ. muda (mm)	2,24± 0,1		0,0001*	2,42± 0,1		0,0001*
	2,44± 0,2			2,84± 0,2		
Peso crisálida (g)	0,29± 0,05		0,0001*	0,38± 0,07		0,0001*
	0,40± 0,07			0,62± 0,1		

Teniendo en cuenta ambos períodos, observamos cómo el tiempo necesario para alcanzar el estado de imago sigue siendo menor, aunque no significativamente menor (T-test  $p=0,104$ ), en los machos que en las hembras, existiendo una diferencia de unos 5 días.

Tanto el tamaño de la placa protorácica de la última muda como el peso de las crisálidas es mayor en las hembras que en los machos, lo que confirma el mayor tamaño de las mariposas hembras.

## CONCLUSIONES

EL período larvario de *Zeuzera pyrina*, que en condiciones naturales es de 10-11 meses, en condiciones de laboratorio y alimentándose con dieta artificial, se ha podido reducir a 3 meses.

La protandria que hemos encontrado en *Zeuzera pyrina*, ya era conocida por AUDEMARD (1967), siendo confirmada en España y en condiciones naturales por ARIAS y NIETO (1980), los cuales también encontraron una diferencia de 5 días en la emergencia de los

machos con respecto a las hembras. Este fenómeno de la protandria puede tener varias interpretaciones:

- Evitaría el apareamiento entre individuos de la misma puesta.
- La presencia de una población de machos antes de la emergencia de las hembras, haría que se produjese una rápida fecundación de éstas, evitando la puesta de huevos no fecundados.
- Podría incrementar el proceso de selección en la población de machos, eliminando los machos menos aptos.

Igualmente la proporción de sexos encontrada en los individuos cultivados en el laboratorio (65% de machos), coincide con la encontrada en condiciones naturales por otros autores (AUDEMARD, 1967).

Finalmente, podemos decir que la dieta artificial original propuesta para la alimentación de las larvas de *Zeuzera pyrina*, proporciona un 86% de supervivencia larval, un 85% de formación de las crisálidas y un 63% de emergencia de los adultos. Esto nos permite disponer de suficientes individuos en todas sus fases de desarrollo para el estudio de diferentes aspectos de su biología.

## ABSTRACTS

F. GARCÍA DEL PINO y A. DE HARO. Cultivo en el laboratorio en una dieta artificial del taladro de la madera, *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera cossidae). *Bol. Serv. Plagas*, 12: 281-289.

In this paper, we propose an original artificial diet for the Leopard Moth (*Zeuzera pyrina* L.) larvae feeding.

The larva of this lepidopter liver within the tree trunks and needs one year to complete its biological cycle, for this reason a direct study of its biology in natural conditions becomes very difficult.

The laboratory rearing in this artificial diet allows not only obtaining great quantities of individuals in each development phase, but also reducing its biological cycle to only three months, which will facilitate the study of its biology in its different aspects (development, behaviour, fighting methods, etc.).

## REFERENCIAS

ACKER, L., 1962: Enzymic reactions in foods of low moisture content. *Advan. Food Res.*, 11. pp. 263-330.  
 ARIAS, A., NIETO, J. 1980: Eficacia comparativa de calendarios de tratamiento (1974) y de materias acti-

vas (1979) frente a *Zeuzera pyrina* L. y nuevos datos sobre su biología en las Vegas del Guadiana (Badajoz). *Bol. Serv. Def. contra Plagas*, vol. 6, nº 1. pp. 31-47.



- AUDEMARD, H., 1967: Contribution a l'etude de la Zeuzere (*Zeuzera pyrina* L.) (Lep. Cossidae) dans la Basse Vallée du Rhone, cycle et particularités biologiques des différents stades. *Revue de Zoologie Agricola et Appliquée* (1967), n. 7-9, pp. 65-91.
- BALACHOWSKY, A. S., MESNIL, L., 1935: Les insectes nuisibles aux plantes cultivées. Lechevalier édit., Paris, pp. 119-123.
- BECK, S. D., 1956: Nutrition of the European corn borer, *Pyrausta nubilalis* Hbn. IV Feeding reactions of first instar larvae. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 49, pp. 399-405.
- CARTER, D. J., 1984: Pest Lepidoptera of Europe with special reference to the British Isles. Dr. W. Junk Publishers. Boston, 431 pp.
- DELLA BEFFA, G., 1949: Gli insetti dannosi all'agricoltura. Hoepli édit., Milan, pp. 370-373.
- MICKELSEN, O., YANG, M. G., 1966: Naturally occurring toxicants in foods. *Fed. Proc.*, 25, pp. 104-123.
- MOORE, I., NAVON, A., 1966: The rearing and some bionomics of the Leopard Moth, *Zeuzera pyrina* L., on an artificial medium. *Entomophaga*, II (3), pp. 285-296.
- NAVON, A., 1977: Rearing of the Leopard Moth *Zeuzera pyrina* L., on an improved diet. *Phytoparasitica*, 5 (1), pp. 38-40.
- WOLF, W. J., COWAN, J. C., 1971: Soybeans as a food source. *CRC Crit. Rev. Food Technol.*, 2, pp. 81-158.