

## Ciclo biológico de *Cirrospilus* próximo a *lyncus*, parasitoide autóctono del minador de las hojas de los cítricos

A. URBANEJA, E. LLÁCER, J. JACAS y A. GARRIDO

*Cirrospilus* próximo a *lyncus* Walker (Hym.:Eulophidae) es un parasitoide autóctono del minador de las hojas de los cítricos, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lep.: Gracillariidae). En este trabajo se han estudiado algunos aspectos de la biología de este ectoparasitoide en laboratorio (temperatura: 20 °C; fotoperiodo: 16:8). La duración total del ciclo biológico fue de 17 días, dividido en 1,2 días para el periodo embrionario, 6,2 días para el periodo larval y 9,6 días para el periodo pupal. La longevidad de los adultos fue superior a 50 días, durante los cuales las hembras pusieron una media de 235,2 huevos, con una fertilidad del 96 % y una proporción de sexos de 1:5,6 (hembras:machos). Las picaduras alimenticias representaron casi un 20% de la mortalidad total provocada (parasitismo+picaduras). Finalmente, se constató que este parasitoide presenta partenogénesis arrenotoca.

A. URBANEJA, E. LLÁCER, J. JACAS y A. GARRIDO: Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Ctra. de Montcada a Nàquera km 5. 46113. Montcada. Valencia

**Palabras clave:** *Cirrospilus* sp, *Phyllocnistis citrella*, parasitoide, ciclo biológico.

### INTRODUCCIÓN

El minador de las hojas de los cítricos, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lep.: Gracillariidae), es un microlepidóptero originario del sudeste asiático, que durante su periodo larval se alimenta de células epidérmicas de hojas en crecimiento y, ocasionalmente, de brotes y frutos (NUCIFORA y NUCIFORA, 1997), causando daños en la mayoría de especies de cítricos de todo el mundo (HEPPNER, 1993; JACAS *et al.*, 1997). A pesar de la espectacularidad de sus daños, su influencia en la producción de árboles adultos parece negligible (GONZÁLEZ, 1997), quedando el daño económico restringido a plantaciones jóvenes e injertadas.

Desde que en 1993 *P. citrella* apareció en España (GARRIDO y GARCÍA, 1994), han sido diversos los parasitoides autóctonos que se han citado sobre este nuevo fitófago (GARCÍA

MARÍ *et al.*, 1997; GARRIDO y DEL BUSTO, 1994; GONZÁLEZ *et al.*, 1996; URBANEJA *et al.*, 1997; VERCHER *et al.*, 1995 y VERDÚ, 1996). De todos ellos han destacado por su abundancia *Pnigalio pectinicornis* L. y *Cirrospilus* próximo a *lyncus* (Hym.:Eulophidae) (GARCÍA MARÍ *et al.*, 1997; URBANEJA *et al.*, 1997). Dada la importancia que ha adquirido *Cirrospilus* próximo a *lyncus* (*Cirrospilus* sp. de ahora en adelante), a finales de 1996, en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, IVIA, se decidió empezar a estudiar la biología de este parasitoide autóctono.

*Cirrospilus* sp. es un ectoparasitoide solitario, gregario facultativo, idiobionte e hiperparasitoide facultativo, cuyos huéspedes son larvas de estadios avanzados y pupas de insectos holometábolos de distintos órdenes como lepidópteros y dípteros. Su acción benéfica no se centra solamente en el para-

sitismo, sino también en las picaduras alimenticias que las hembras realizan sobre el huésped, provocándole la muerte.

Debido al importante papel que puede desempeñar este parasitoide en el control biológico del minador, el objetivo de este estudio fue conocer su biología en condiciones de laboratorio. Concretamente se estudió la longevidad de los adultos, la duración y descripción de su ciclo biológico, la reproducción, la oviposición y las picaduras alimenticias.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El material biológico utilizado en estas experiencias (*P. citrella* y *Cirrospilus* sp.), provino de las crías continuas montadas en el I.V.I.A. (URBANEJA et al., 1998). Las pruebas se realizaron en una cámara incubadora a una temperatura constante de 20 °C y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

### Descripción de estados inmaduros y ciclo biológico

Para el cálculo de la duración del ciclo biológico se utilizó plantas de naranjo amargo de 4-5 meses de edad, que presentaban hojas receptivas a la puesta de minador, es decir, con menos de 3,5 mm de tamaño (GARRIDO y GASCÓN, 1995). Después de haberse introducido durante un día en una cría continua de minador para conseguir puesta, las plantas permanecieron 6-7 días en una cámara climática a 22-23 °C, tiempo tras el cual se consiguió disponer de plantas con larvas de tercer estadio larvario del minador. Llegado este momento las plantas se introdujeron en la cría de *Cirrospilus* sp. para conseguir la puesta del parasitoide. Con el fin de detectar con más precisión el momento de las puesta, dichas plantas permanecieron un máximo de 5 horas en el interior de la cría.

Tras detectar, bajo lupa estereoscópica, la puesta de *Cirrospilus* sp., las plantas permanecieron en la cámara incubadora, y se revisaron diariamente y se anotó el estado/io en que se encontraba. Cuando las pupas de los parasitoides alcanzaron su quinto día de vida, se separó de la planta la hoja sobre la que se estaban desarrollando y se colocó en una placa Petri de 90 mm de diámetro, con una fina capa de Agar al 2%. Simultáneamente se anotó las características de cada estadio, para poder describir cada periodo evolutivo.

De 23 repeticiones utilizadas se calculó la duración de cada estado/io, la duración total del ciclo, la fertilidad, la proporción de sexos y la supervivencia de inmaduros.

### Longevidad adultos

Para estimar la longevidad de los adultos se utilizaron 24 individuos de cada sexo recién emergidos (con menos de 24 horas de vida), que eran introducidos individualmente en tubos de ensayo, tapados con algodón. A la mitad de los adultos no se les suministró alimentación y al resto se les suministró miel y polen en forma de pequeñas gotas adheridas a las paredes de los tubos. La revisión de los tubos fue diaria.

### Oviposición y picaduras

Se utilizaron 11 parejas recién emergidas, obtenidas a partir de pupas aisladas. Cada pareja se introdujo en una placa Petri de 120 mm de diámetro, con una fina capa de Agar al 2%, con el fin de poder mantener la hoja turgente (Fig. 1). A cada pareja se les suministró cada 2 días, 12 larvas de tercer estadio del minador. Después de cada cambio la placa se selló con Parafilm®, para evitar que los adultos escapasen. La alimentación se les suministró en forma de pequeñas gotas de miel y polen que se depositó sobre la superficie de las hojas.



Fig. 1.—Placa Petri con una fina capa de agar al 2%, y sellada con Parafilm®, utilizada para el estudio de la oviposición de *Cirrospilus próximo a lyncus*.

Después de cada cambio, las larvas eran revisadas bajo lupa estereoscópica, anotando la existencia o no, de picaduras o de puesta. Las huevos se dejaron evolucionar hasta adulto, individualmente en placas Petri de 60 mm de diámetro con Agar al 2%.

Con todos estos datos se calculó la curva de puesta y picaduras, el porcentaje de parasitismo, el porcentaje de picaduras alimenticias, la fertilidad, y la proporción de sexos.

### Reproducción de hembras vírgenes

Para averiguar qué tipo de partenogénesis presenta este parasitoide se utilizaron 6 hembras vírgenes, empleando la misma metodología utilizada en la oviposición. Para asegurar la virginidad de las hembras, éstas fueron aisladas en estado de pupa, en placas Petri selladas con Parafilm®. Se calculó el porcentaje de parasitismo, el porcentaje de picaduras y la fertilidad.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Descripción de estados inmaduros y ciclo biológico

El huevo (Fig. 2) se coloca externamente sobre el huésped. Éste es cilíndrico, de coloración hialina, con ambos extremos redondeados, uno más ancho que el otro. A veces el huevo puede ser un poco curvado. La duración del periodo embrionario fue de 1,2 días (máx. 1,9; mín. 0,9).

La larva (Fig. 3) es la típica de un ectoparasitoide Chalcidoidea. Nada más eclosionar el huevo, la larva empieza a alimentarse y puede variar su lugar de anclaje a lo largo del periodo larval, ya que es móvil. El canal

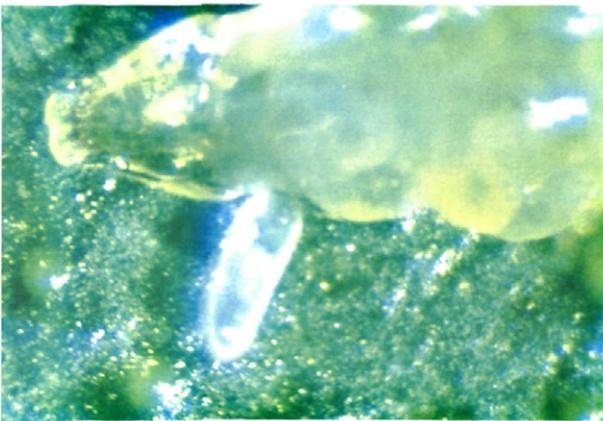


Fig. 2.—Huevo de *Cirrospilus próximo a lyncus*.



Fig. 3.—Larva madura de *Cirrospilus próximo a lyncus*, que ha consumido prácticamente en su totalidad a la larva de minador.

alimentario puede observarse debido a la transparencia de la larva, y ocupa la mayor parte del cuerpo, y se contrae rítmicamente cuando la larva se alimenta. Se ha podido observar en varias ocasiones fenómenos de canibalismo, en puestas de más de un huevo. Cuando la larva alcanza su máximo de desarrollo, expulsa el meconio y pasa al estado de prepupa. Este fenómeno de expulsión del material de desperdicio acumulado durante el período larval, se ha podido ob-

servar de dos formas, acumulado todo en un solo pedazo (Fig. 4) y acumulado en varios pedazos (4-10) a ambos lados de la larva, en forma de pequeñas columnas (Fig. 5). El período larvario duró 6,2 días (máx. 8, mín. 5).

La pupa es de tipo libre, de color blanco recién formada, y pasa a ser negro a las pocas horas (Fig. 6). La duración del período pupal fue de 9,7 días (máx. 11, mín. 8).

El adulto (Fig. 7) es de coloración negra metálica, con manchas amarillas. No pre-

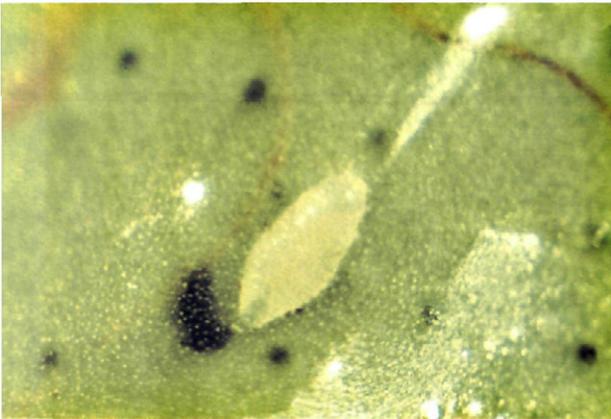


Fig. 4.—Prepupa de *Cirrospilus* próximo a *lyncus*, expulsando el meconio en un solo trozo.

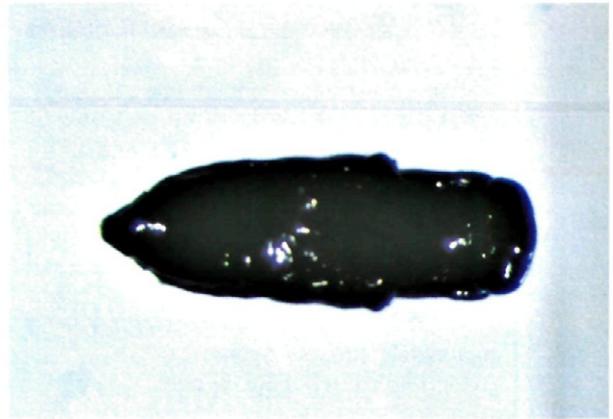


Fig. 6.—Pupa de *Cirrospilus* próximo a *lyncus*.

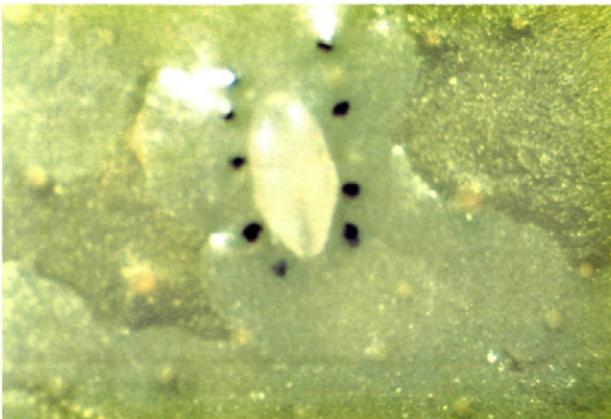


Fig. 5.—Prepupa de *Cirrospilus* próximo a *lyncus*, expulsando el meconio en varios trozos a ambos lados de la larva.



Fig. 7.—Hembra de *Cirrospilus* próximo a *lyncus*, junto a una larva picada de tercer estadio de *Phyllocnistis citrella*.

senta un claro dimorfismo sexual, siendo diferenciables por la forma del abdomen. Por lo general el macho es de tamaño más reducido que la hembra.

La duración total del ciclo de huevo a adulto fue de 17 días (máx. 19,3, mín. 15,8). La fertilidad fue del 96 %, la supervivencia de los inmaduros del 91,5 %, y la proporción de sexos fue de 1:1 (macho:hembra). La duración del ciclo biológico no se diferencia demasiado de los obtenidos en otras especies de eulófidos. A 22 °C y utilizando *Phyllocnistis labyrinthella* Bjerk. como huésped (SUDNBY, 1957); el ciclo de *Cirrospilus pictus* Nees duró 15,5 días; el de *C. elegantissimus* Westw, 15 días; el de *C. subviolaceus* Thomson, 16 días; el de *P. pectinicornis*, 17 días; el de *T. xanthops* Ratz., 17 días y el de *T. femoralis* n.sp. 17 días. A 21 °C y con *P. citrella* como huésped (DUNCAN y PEÑA, 1997) el ciclo biológico de *P. minio* (Walker), duró 16,1 ± 0,2.

### Longevidad de adultos

Tanto machos como hembras sin alimentación no superaron los 3-4 días de vida, mientras que con alimentación ambos sexos superaron los 40 días de vida, aunque se registró una gran variabilidad (mín: 13, máx: 71). También se ha podido comprobar que las hembras pueden sobrevivir sin suministrarles alimentación, solamente alimentándose de los jugos que fluyen de las larvas del minador, tras picarlas con su ovipositor. Concretamente se tuvieron 2 hembras que vivie-

ron más de 30 días, simplemente cambiándoles los huéspedes cada 2-3. También se ha podido comprobar en otros ensayos a 15 °C, que la longevidad de los adultos a esta temperatura llega a ser superior a los 170 días, por lo que se puede hablar de una elevada longevidad de los adultos de esta especie.

### Oviposición y picaduras

Como puede verse en la figura 8, la puesta se repartió durante todo el periodo de vida de la hembra excepto en los 4-5 días antes de su muerte. También se apreció como el intervalo de confianza fue aumentando a lo largo del periodo de vida del parasitoide. Esto puede atribuirse al hecho que cada vez se reducía el número de hembras, por lo que la dispersión de los resultados era mayor. El número medio de huevos puestos por hembra fue de 235,2 con un incremento medio diario de 3,9 (máx: 5,2, mín: 2,7). Las picaduras alimenticias tuvieron lugar durante todo el periodo de puesta y se mantuvieron más o menos constantes en torno a 0,7 picaduras/día (máx: 1,5, mín: 0,4).

De los 1.767 huevos recogidos, se obtuvo una fertilidad del 79 %, y separando por número de huevos por puesta, la fertilidad disminuyó desde un 97 % en puestas de un solo huevo hasta el 30 % en puestas de 5 huevos, como puede verse en la cuadro 1. En estas puestas de más de un huevo se observó en varias ocasiones la evolución de dos individuos hasta adulto como era de esperar en esta especie por ser gregaria facultativa.

Cuadro 1.—Fertilidad, número de huevos, porcentaje de puesta y número de puestas según el número de huevos por puesta de hembras fecundadas de *Cirrospilus* próximo a *lyncus*

N.º de huevos/puesta	N.º de puesta	% de puesta	N.º de huevos	Fertilidad
1	794	65,7	794	97,2
2	320	26,5	640	72,5
3	68	5,6	204	50,5
4	22	1,8	88	50,0
5	4	0,3	20	30,0

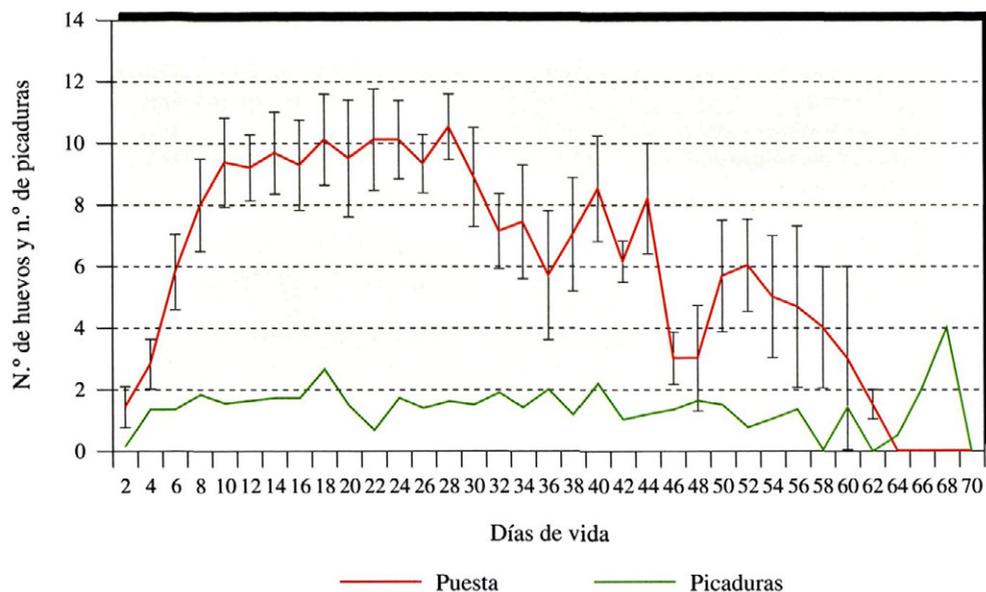


Fig. 8.—Evolución de la puesta y las picaduras alimenticias de *Cirrospilus* próximo a *lyncus*. En la curva de puesta aparece en barras verticales el intervalo de confianza al 95%.

La proporción de sexos que se obtuvo fue de 1:5,6 (hembras:machos), valor lejano al 1:1 que se obtuvo en la prueba de longevidad donde la oviposición tuvo lugar en las crías masivas de *Cirrospilus* sp.

### Reproducción de hembras vírgenes

De la totalidad de huevos puestos por las seis hembras vírgenes durante el periodo de estudio, se consiguió que evolucionaran 138 individuos que resultaron ser machos. Por tanto, visto anteriormente que hembras fe-

cundadas daban lugar a ambos sexos, podemos afirmar que *Cirrospilus* sp. presenta una partenogénesis arrenotoca, al igual que otros eulófidios próximos (DELANOUE y ARAMBOURG, 1967; DUNCAN y PEÑA, 1997; SUNDBY, 1957). Análogamente a lo que ocurrió con las hembras fecundadas, la fertilidad disminuyó al aumentar el número de huevos por puesta (cuadro 2).

En el cuadro 3 puede observarse el porcentaje de parasitismo, el porcentaje de picaduras alimenticias y la mortalidad total, tanto de las hembras fecundadas como de las hembras vírgenes. Puede observarse

Cuadro 2.—Fertilidad, número de huevos, porcentaje de puesta y número de puestas según el número de huevos por puesta de hembras vírgenes de *Cirrospilus* próximo a *lyncus*

N.º de huevos/puesta	N.º de puesta	% de puesta	N.º de huevos	Fertilidad
1	144	86,3	144	95,1
2	18	10,8	36	86,1
3	5	2,9	15	46,7

**Cuadro 3.—Comparación del porcentaje de parasitismo, porcentaje de picaduras alimenticias y mortalidad total (parasitismo + picaduras alimenticias) entre hembras fecundadas y hembras vírgenes de *Cirrospilus* próximo a *lyncus*. Junto a cada media aparece el intervalo de confianza al 95%**

	Hembras fecundadas	Hembras vírgenes
% Parasitismo	65,4 ± 10,1	24,9 ± 5,8
% Picaduras alimenticias	12,4 ± 2,0	19,3 ± 3,7
% Mortalidad total	77,8 ± 10,5	44,2 ± 6,2

como el porcentaje de picaduras alimenticias respecto a la mortalidad total es mayor en las hembras vírgenes, que en las fecundadas. En ambos casos el porcentaje de picaduras alimenticias representa un factor importante de mortalidad, que debería tenerse en cuenta en los futuros estudios sobre el impacto de este insecto sobre su huésped.

## CONCLUSIONES

Se han descrito los distintos estados evolutivos por los que pasa *Cirrospilus* sp. y se ha calculado la duración de cada uno de ellos a 20 °C. Se ha observado también que los adultos de este parasitoide poseen una longevidad elevada si se les suministra una alimentación alternativa como miel y polen y que pueden superar los 60 días de vida a 20 °C. La partenogénesis que presenta este

parasitoide es arrenotoca. La puesta se ha observado durante todo el periodo de vida de la hembra, con una media de 3,9 huevos día y una fertilidad del 96%. Se ha comprobado que la fertilidad decrece a medida que aumenta el número de huevos por puesta. Finalmente se ha visto que las picaduras alimenticias representan un porcentaje importante en la mortalidad total producida por este parasitoide.

## AGRADECIMIENTOS

A R. Hinarejos por el suministro de material tanto vegetal como biológico. A O. Tomás por su participación en las pruebas de laboratorio. Y, a todo el personal de la Sección de Entomología del I.V.I.A. por la ayuda prestada durante el desarrollo de las pruebas.

## ABSTRACT

URBANEJA, A.; LLÁCER, E.; JACAS, J. y GARRIDO, A., 1998: Biología de *Cirrospilus* próximo a *lyncus*, parasitoide autóctono del minador de las hojas de los cítricos. *Bol. San. Veg. Plagas*, 24(4): 707-714.

*Cirrospilus* near *lyncus* Walker (Hym:Eulophidae) is an indigenous parasitoid of the citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lep:Gracillariidae). This species was under controlled environmental conditions (20° C temperature, 8:16 h. light photoperiod). Mean developmental time from egg to adult was 17 days, including 1.2 days for egg incubation, 6.2 days for larval development and 9.6 days for pupal development. A short description of the parasitoid egg, larva and pupa is provided. Adults could survive more than 50 days, and females laid an average of 235.2 eggs, with a fertility of 96 % and a sex ratio of 1:5.6 (female:male). Virgin females showed arrhenotokous parthenogenesis. Host feeding accounted for nearly 20 % of total mortality (parasitism + host feeding), caused by *C. near lyncus* on *P. citrella*.

**Key words:** *Cirrospilus* near *lyncus*, *Phyllocnistis citrella*, Biology.

## REFERENCIAS

- DELANOUE, P. y ARAMBOURG, Y., 1967: Contribution a l'étude en laboratoire de *Pnigalio mediterraneus* (Hym. Chalcidoidea Eulophidae). *Ann. Soc. Ent. Fr. (N.S.)*, 3 (4): 909-927.
- DUNCAN, R. y PEÑA, J. E., 1997: Fecundity, Host Stage Preferences, and the Effects of Temperature on *Pnigalio minio* (Hymenoptera: Eulophidae), a Parasitoid of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *Environ. Entomol. En prensa*.
- GARCÍA MARÍ, F.; COSTA COMELLES, J.; VERCHER, R.; CASTRILLÓN, D.; OLMEDA, T.; GARRO, R. y ALONSO, D., 1997: Lucha biológica contra el minador. *Levante Agrícola*. 339: 122-127.
- GARJO, C. y GARCÍA, E., 1994: *Phyllocnistis citrella* (Stainton, 1856) (Insecta: Lepidoptera: Gracillariidae: Phyllocnistinae) en los cultivos cítricos de Andalucía (Sur de España): Biología, ecología y control de la plaga. *Bol. San. Veg. Plagas*, 20: 815-826.
- GARRIDO, A. y BUSTO, T. DEL, 1994: Enemigos de *Phyllocnistis citrella* Stainton, encontrados en Málaga. *Invest. Agr.: Fuera de Serie* 2: 87-92.
- GARRIDO, A. y GASCÓN, I., 1995: Distribución de fases inmaduras de *Phyllocnistis citrella* Stainton, según el tamaño de la hoja. *Bol. San. Veg. Plagas*. 21: 559-571.
- GONZÁLEZ, L., 1997: Daños causados por los ataques de *Phyllocnistis citrella* Stainton. (Lepidoptera. Gracillariidae), y su repercusión sobre la producción de árboles adultos de cítricos en el suroeste español. *Bol. San. Veg. Plagas*, 23: 73-91.
- GONZÁLEZ TIRADO, L.; BERNABÉ, P. y CASTAÑO, M., 1996: Enemigos naturales de *Phyllocnistis citrella* Stainton. (Lepidoptera. Gracillariidae, Phyllocnistinae) en la provincia de Huelva. Distribución geográfica, evolución estacional y tasas de parasitismo. *Bol. San. Veg. Plagas*. 22: 741-760.
- HEPPNER, J. B., 1993: Citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae: Phyllocnistinae). *Fla. Dep. Agric. Consum. Serv. Div. Plant Ind. Entomolol. Circ.* 359.
- JACAS, J.; GARRIDO, A.; MARGAIX, C.; FORNER, J.; ALCAIDE, A. y PINA, J. A., 1997: Screening of different citrus rootstocks and citrus-related species for resistance to *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *Crop Protection*. 16 (8): 701-705.
- NUCIFORA, A. y NUCIFORA, M. T., 1997: The citrus bud-miner (*Phyllocnistis citrella* Stainton) in citrus nurseries in Sicily. Selective Control Methods. 5th International Congress of Citrus Nurserymen. Università di Catania. 15 pp.
- SUNDBY, R., 1957: The parasites of *Phyllocnistis labyrinthella* Bjerk. and their relation to the population dynamics of the leaf-miner. *Norsk. ent. Tidsskr., Suppl.* 2. p. 153.
- URBANEJA, A.; JACAS, J.; VERDÚ, M. J. y GARRIDO, A., 1997: Dinámica e impacto de los parasitoides autóctonos de *Phyllocnistis citrella* Stainton, en la Comunidad Valenciana. Investigación Agraria. Producción y protección vegetales. *En prensa*.
- URBANEJA, A.; LLÁCER, E.; HINAREJOS, R.; JACAS, J. y GARRIDO, A., 1998: Sistema de cría del minador de las hojas de los cítricos, *Phyllocnistis citrella* Stainton y sus parasitoides *Cirrospilus* sp. y *Quadrastichus* sp. *Bol. San. Veg. Plagas*. 24 (4): 787-796.
- VERCHER, R.; VERDÚ, M. J.; COSTA COMELLES, J. y GARCÍA MARÍ, F., 1995: Parasitoides autóctonos del minador de hojas de cítricos *Phyllocnistis citrella* en las comarcas centrales valencianas. *Levante Agrícola* 333: 305-312.
- VERDÚ, M. J., 1996: Chalcidoidea (Hymenoptera), parásitos del minador de los cítricos *Phyllocnistis citrella* (S). *Levante Agrícola* 335: 227-230.

(Recepción: 12 enero 1998)

(Aceptación: 16 marzo 1998)