

# BOLETÍN DE SANIDAD VEGETAL

VOLUMEN 32 - NÚMERO 4.2 - 2006 - 4º Trimestre

# PLAGAS



MINISTERIO  
DE AGRICULTURA, PESCA  
Y ALIMENTACIÓN

SECRETARÍA GENERAL  
DE AGRICULTURA Y  
ALIMENTACIÓN

DIRECCIÓN GENERAL  
DE AGRICULTURA

## BOLETIN PLAGAS

Este Boletín publica bajo la forma de artículos los resultados de investigación científica o aplicada en los campos de la sanidad vegetal y ciencias afines. Los trabajos no podrán presentarse al mismo tiempo para su publicación en otra revista, sin autorización del Consejo de Redacción. Esta autorización comportará la obligación de mencionar el origen del artículo y nombre del autor. Los trabajos publicados en el Boletín reflejan únicamente los criterios de sus autores.

## SUSCRIPCIONES

Las suscripciones al Boletín de Sanidad Vegetal Plagas, de publicación trimestral, así como la venta de números ya aparecidos, deberán solicitarse a:

Centro de Publicaciones  
Paseo Infanta Isabel, 1  
28014 Madrid (España)  
Fax: 91 347 57 22  
e-mail: mcruzpf@mapya.es  
El precio de suscripción anual:  
España ..... 43,00 euros  
Extranjero ..... 59,50 euros  
Número suelto ..... 14,60 euros

El pago se efectuará mediante cheque bancario nominativo a: «M.A.P.A. - Publicaciones» o por giro postal a la dirección arriba indicada.

## INTERCAMBIOS

Este Boletín puede ser objeto de intercambio con otras publicaciones cuya temática sea afín. Para establecer dicho intercambio, las instituciones deberán dirigirse a la redacción del mismo.

## NUESTRA PORTADA



Algunos enemigos naturales registrados en espacios verdes: *Propylea quatuordecimpunctata*, *Episisrphus balteatus*, parasitoides de pulgones.

## INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

**Texto:** Los manuscritos deben ser redactados de manera concisa y dactilografiada de forma clara, con amplios márgenes, párrafos separados y a doble espacio, incluidos el resumen, leyendas a las figuras y cuadros, referencias y notas al pie. De forma general se tendrá en cuenta el esquema usual de presentación: Introducción. Material y métodos. Resultados. Discusión. Resumen en español e inglés y, en su caso, en el idioma del texto. Referencias bibliográficas. El título deberá estar seguido por el nombre del autor o autores, la afiliación institucional, la dirección postal completa y la dirección de correo electrónico cuando proceda, indicando a la redacción cuál es la persona de contacto. Los resúmenes en español deberán estar seguidos de listado de palabras clave. El resumen en los idiomas distintos al del texto, o "abstract", deberá ir precedido de la referencia bibliográfica correspondiente. Los nombres latinos deberán subrayarse o dactilogrifiarse en tipo de letra diferente al del texto.

Para autores extranjeros que así lo deseen, podrá publicarse su trabajo en el idioma original, incorporando un resumen en español e inglés.

Los manuscritos deberán enviarse en soporte magnético acompañados de dos copias en papel. En el caso de que un mismo autor envíe más de un manuscrito, cada trabajo se remitirá en un disco distinto. Deberán tener la siguiente extensión máxima, incluidos figuras y cuadros según se trate de:

**Artículo:** 16 páginas.

**Comunicación:** 1000 palabras, que pueden incluir figuras y cuadros.

**Nota:** 500 palabras que, excepcionalmente podrá incluir alguna figura. Para mayor rapidez las notas pueden enviarse por correo electrónico: aburgosr@mapya.es.

**Figuras y cuadros:** Los dibujos deben ser los originales y dispuestos para la impresión, con leyendas claras y rútolos de no menos de 2 milímetros de altura para que admitan una posible reducción a ancho de caja o ancho de columna.

Se recomienda la aportación de fotografías en color, que deben ser recortadas y encuadradas en el caso de diapositivas, reduciendo el campo a las imágenes esenciales.

Los pies de las figuras deben presentarse en hoja aparte, numeradas, entendiéndose como tales gráficos, figuras y fotografías. Los cuadros deberán numerarse y con su número se referirán en el texto, para independizarlos del mismo. Tanto las figuras como los cuadros deben situarse, aproximadamente, mediante indicaciones en los márgenes del manuscrito.

**Referencias:** Las referencias bibliográficas aparecerán en el texto mediante el nombre del autor, en mayúsculas, seguido del año, de la forma siguiente:

GARCIA-JIMENEZ, J., VELAZQUEZ, M. T., ALFARO, A. 1989. Secuencia de síntomas en el colapso del melón. *Bol. San. Veg. Plagas*, 15 (4): 333-342.

Para remisión de artículos y demás información dirigirse a la Redacción del Boletín:

Subdirección General de Agricultura Integrada y Sanidad Vegetal

Redactora Jefe de la Revista Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas

Alfonso XII, 62

28014 MADRID (España)

**VOLUMEN 32**  
**núm. 4.2**  
**2006**  
**4º Trimestre**

DIRECTOR  
*Francisco Mombiola*

DIRECTOR ADJUNTO  
*Guillermo Artolachipi*

REDACTORA JEFE  
*Adela Burgos*

CONSEJO DE REDACCIÓN  
*Antonio Bello*  
*Juan I. Calvo*  
*José M.<sup>a</sup> Cobos*  
*Pedro del Estal*  
*José García-Jiménez*  
*Concepción Jordá*  
*Alfredo Lacasa*  
*Cristina Noval*  
*Cándido Santiago*  
*Julio C. Tello*  
*Juan J. Tuset*  
*Fernando Varés*  
*Carlos Zaragoza*

EDITOR  
*Centro de Publicaciones*  
*Agrarias, Pesqueras y*  
*Alimentarias*

ISSN: 0213-6910  
NIPO: 251-06-010-5  
Depósito Legal: M-2975-1976  
Imprime: I.G. Saljen, S.L.

# SUMARIO

## ENTOMOLOGÍA

- L. SAZO, J. E. ARAYA, P. ITURRIAGA. Efecto del tipo de polen sobre la supervivencia, fertilidad y viabilidad de los huevos de *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae) en laboratorio ..... 619
- M. GARCÍA-MARTÍN, T. CABELLO, A. TORRES-RUIZ, M. GÁMEZ. Competencia intraespecífica en la respuesta de parasitación de *Chelonus oculator* Panzer (Hymenoptera: Braconidae) ..... 625
- M. M. MARTÍN, T. CABELLO. Manejo de la cría del picudo rojo de la palmera, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera, Dryophthoridae), en dieta artificial y efectos en su biometría y biología ..... 631
- S. A. DE BORTOLI. Comunicação. Aspectos biológicos de *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae) em dois genótipos de couve ..... 643
- S. A. DE BORTOLI, M. C. FERNANDES, N. M. M. S. DE ALBERGARIA, H. O. S. DÓRIA. Aspectos biológicos de *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae) em relação ao estado nutricional de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* ..... 647
- P. TURIENZO. Larval galleries and pupal chambers of *Hueque-  
nia livida* (Germain, 1898) (Coleoptera: Cerambycidae) ..... 655

## PATOLOGÍA

- D. PALMERO, C. IGLESIAS, L. VARÉS, J. SINOBAS (†). Determinación de la capacidad parasitaria de la Microbiota fúngica y de sus extractos acuosos en las semillas del cardo (*Cynara cardunculus* L.) ..... 659
- R. E. MARTÍNEZ-RESTOY, F. DIÁNEZ, M. SANTOS, M. DE CARA, J. FERRÁNDIZ HERNÁNDEZ, J. C. TELLO. Microbiota fúngica asociada a las podredumbres radiculares del puerto cultivado en Villena ..... 673
- R. M<sup>o</sup> NAVARRO CERRILLO, A. I. TERÁN BOCERO, M. E. SÁNCHEZ. Acción preventiva y curativa del fosfonato en el control de *Phytophthora cinnamomi* Rands en encina y alcornoque ..... 685
- R. BELTRÁN, J. ARMENGOL, J. GARCÍA-JIMÉNEZ. Estudio de patogenicidad a melón de hongos del suelo causantes de colapso ..... 695
- N. GONZÁLEZ, E. VARGAS-OSUNA, A. TRAPERO. El Escudete de la aceituna I: Biología y daños en olivares de la provincia de Sevilla ..... 709
- N. GONZÁLEZ, A. TRAPERO. El Escudete de la aceituna II: Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica del agente causal ..... 723

### **TERAPÉUTICA**

M. A FARFÁN, J. C. GUERRERO, J. OLIVERO, J. IZQUIERDO, J. M. VARGAS. Efecto sobre la entomofauna del olivar del tratamiento-cebo con Imidacloprid 20 LS para el control de <i>Bactrocera oleae</i> (Gmel.) (Diptera: Tephritidae), Mosca del Olivo .....	739
G. MAREGGIANI, A. GARAU. Herbivoría diferencial frente al lepidóptero especialista <i>Phocides polybius phanias</i> (Hesperiidae) .....	757

### **OTROS TEMAS**

M. RUIZ TORRES, A. MONTIEL BUENO. Incidencia del empleo de insecticidas piretroides sobre la presencia de acariosis (Acarina, Eriophidae) en olivares de la provincia de Jaén .....	763
RECENSIÓN DE PUBLICACIONES .....	773



## Efecto del tipo de polen sobre la supervivencia, fertilidad y viabilidad de los huevos de *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae) en laboratorio

L. SAZO, J. E. ARAYA, P. ITURRIAGA

Grupos de 25 *Neoseiulus californicus* (McGregor) (8 machos y 17 hembras) provenientes de crianzas en bandejas con hojas de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) infestadas con *Tetranychus urticae* (Koch), criado en las mismas plantas de fréjol en invernadero, se alimentaron con polen de nabo forrajero (*Brassica rapa* L.), amapola de California (*Eschscholtzia californica* Cham.), hierba cana (*Senecio vulgaris* L.), rábano silvestre (*Raphanus sativus* L.), correhuela (*Convolvulus arvensis* L.), diente de león (*Taraxacum officinale* Weber ex Wiggers) y girasol (*Helianthus annuus* L.), a 25°C, 75% HR y fotoperíodo de 16:8 h de luz y oscuridad. Cada unidad experimental consistió en un recipiente con agua con una esponja de poliuretano y sobre ella, una lámina de polietileno negro, con un trozo de papel absorbente en cada uno de los 4 márgenes, con un extremo en el agua, para proveer humedad y evitar que los depredadores escaparan. Los depredadores se pusieron sobre el polietileno negro, con 4 mg de polen de cada especie por separado, que se renovó cada 2 días. Las unidades se evaluaron a diario y los huevos se retiraron e incubaron en placas Petri para evaluar su viabilidad, bajo las condiciones descritas. Se mantuvo un testigo con hojas de fréjol infestadas con *T. urticae* como alimento. Hubo dos grupos de resultados de supervivencia con polen. En el primero, el polen de girasol, amapola de California y correhuela no presentaron diferencias significativas con el testigo. En el otro, los depredadores alimentados con polen de hierba cana, yuyo, diente de león y rábano no sobrevivieron más de 25 días. Más de la mitad del total de huevos fueron puestos en el testigo, seguido por los ácaros alimentados con polen de girasol y amapola de California. Los huevos de todos los tratamientos tuvieron 100% de viabilidad.

L. SAZO, J. E. ARAYA, P. ITURRIAGA. Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Casilla 1004, Santiago, Chile, lsazo@uchile.cl.

**Palabras clave:** *Brassica rapa*, *Convolvulus arvensis*, *Cydnodromus californicus*, *Eschscholtzia californica*, *Helianthus annuus*, *Raphanus sativus*, *Senecio vulgaris*, *Taraxacum officinale*, *Tetranychus urticae*.

### INTRODUCCIÓN

En Chile, como en el resto del mundo, existen diversos ácaros fitófagos que causan daños en cultivos y frutales. Por lo general, estas plagas se controlan con aplicaciones periódicas de acaricidas, los cuales, además de tener impacto ambiental, pueden causar el desarrollo de resistencia en los ácaros; tal es

el caso de *Panonychus ulmi* (Koch) plaga clave en pomáceas, la cual ha desarrollado resistencia a algunos acaricidas en la última década (SAZO y GASIC, 1993; SAZO y RAFFO, 1997).

Se ha observado con frecuencia que los problemas de arañas en lugares no tratados son marginales debido a la acción del fitoséido *Neoseiulus californicus* (McGregor),

un excelente depredador que puede por sí mismo controlar la población de éstos ácaros (GARCÍA-MARÍ y GONZÁLEZ-ZAMORA, 1999).

El concepto de depredador fitoséido efectivo ha cambiado mucho en los últimos 30 años. Inicialmente, los estudios se enfocaban en su capacidad en aumentar rápidamente su densidad poblacional, y anular así un daño masivo por arañas fitófagas. Recientemente, se ha valorado más la capacidad de los fitoséidos para regular las poblaciones de arañas fitófagas cuando sus densidades poblacionales son bajas. Se consideran importantes su persistencia en los agroecosistemas, la supervivencia sin presas y su capacidad de consumir alimentos alternativos (ANÓNIMO, 2000).

*Neoseiulus* puede consumir cinco ácaros fitófagos adultos por día, además de alimentarse de huevos y larvas (PIPMP, 2002). También puede sobrevivir alimentándose de polen (FLINT y DRIESTADT, 1999). El alimentarse y reproducirse en polen es una alternativa interesante para programas de manejo integrado de arañas, ya que esta capacidad puede aumentar su supervivencia durante períodos de escasez de la presa (VAN RIJN y TANIGOSHII, 1999) y facilitar su crianza masiva.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del polen de *Brassica rapa* L., *Eschscholtzia californica* Cham. (amapola de California, o dedal de oro), *Senecio vulgaris* L. (hierba cana), *Raphanus sativus* L. (rábano silvestre), *Convolvulus arvensis* L. (correhuela), *Taraxacum officinale* Weber ex Wiggers (diente de león) y *Helianthus annuus* L. (girasol), sobre la longevidad, fertilidad de la población y viabilidad de los huevos de *N. californicus* en condiciones de laboratorio.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se desarrolló en el Laboratorio de Entomología Frutal "Profesor Luciano Campos Street" de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, desde noviembre de 2002 a mayo de 2003.

El polen se obtuvo desde flores de las especies mencionadas y se llevó al laborato-

rio para extraerlo macerando y tamizando las anteras.

Se utilizaron poblaciones de *N. californicus* provenientes de un huerto comercial de manzanos de la VI región. El método de crianza se adaptó del descrito por WATVE y LIENK (1975), y consistió en criar las poblaciones del depredador en bandejas de plástico de 32 x 25 x 5 cm con hojas de fréjol infestadas con el ácaro fitófago *Tetranychus urticae* (Koch), criado en las mismas plantas en invernadero. Las crías se mantuvieron a 25°C y 75% HR, con fotoperíodo de 16:8 h de luz y oscuridad. Como unidad experimental se utilizó una población de 25 *N. californicus*, 8 machos y 17 hembras. Cada una consistió en un recipiente con agua con una esponja de poliuretano y sobre ella, una lámina de polietileno negro. En cada uno de los cuatro márgenes del polietileno se puso un trozo de papel absorbente, con un extremo en el agua, para proveer humedad y evitar que los depredadores escaparan. Los depredadores se pusieron sobre el polietileno negro, con 4 mg de polen, que se renovó cada 2 d. Las unidades se evaluaron diariamente y los huevos se retiraron e incubaron en placas Petri para evaluar su viabilidad. Las unidades de crianza y placas de incubación se mantuvieron en la cámara bajo las condiciones descritas. Se mantuvo un testigo con la misma población de *N. californicus* (n=25), pero con hojas de fréjol infestadas con *T. urticae* como alimento.

Se utilizó un diseño estadístico de aleatorización completa con 8 tratamientos y 5 repeticiones. Los resultados de supervivencia de *N. californicus*, fertilidad de las hembras y viabilidad de los huevos se sometieron a ANOVA y pruebas de rango múltiple de DUNCAN (1955).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Supervivencia de *N. californicus* alimentado con polen

Los resultados de supervivencia en los diversos tipos de polen se presentan en el Cuadro I.

**Cuadro 1. Promedios de *N. californicus* vivos (n inicial = 25) cada 5 días alimentados con diferentes tipos de polen.**

Tipos de polen	Promedios de <i>N. californicus</i> vivos cada 5 días					
	5	10	15	20	25	30
Girasol	16,8 a	8,8 a	7,6 a	5,2 a	2,2 a	1,6 a
Amapola de California	9,8 abc	7,6 ab	6,0 a	3,8 a	3,0 a	2,0 a
Correhuela	10,6 abc	7,4 ab	4,8 a	3,8 a	2,2 a	1,0 a
Diente de león	6,0 bc	4,0 bc	2,0 b	0,8 b	0,0 b	0,0 b
Hierba cana	8,0 bc	3,4 cd	1,8 b	0,6 b	0,0 b	0,0 b
Rábano silvestre	3,4 d	1,8 d	1,2 b	1,8 b	0,0 b	0,0 b
Nabo forrajero	1,6 d	0,4 e	0,4 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b
Testigo	13,2 a	10,8 a	8,4 a	5,6 a	1,8 a	1,6 a

Promedios en la columna con la misma letra no son diferentes ( $P \leq 0,05$ ), según pruebas de rango múltiple de DUNCAN (1955).

En los resultados se observan dos grupos. En el primero, los tratamientos con polen de girasol, amapola de California y correhuela, los cuales no presentaron diferencias significativas con el testigo.

El otro grupo lo conformaron los tratamientos con polen de hierba cana, nabo forrajero, diente de león y rábano, en los que *N. californicus* no sobrevivió más de 25 d.

**Fertilidad de las hembras de *N. californicus* y viabilidad de los huevos**

El efecto de las dietas evaluadas sobre la fertilidad de las hembras de *N. californicus* se presentan en el Cuadro 2.

Más de la mitad del total de huevos fueron puestos en el testigo, seguido por los ácaros alimentados con polen de girasol y amapola de California. Los huevos de todos los tratamientos tuvieron 100% de viabilidad.

La supervivencia de *N. californicus* alimentado con polen de girasol, correhuela y amapola de California fue similar a la obtenida cuando se alimentó con *T. urticae*. Sin embargo, la fertilidad de las hembras alimentadas con los diferentes tipos de polen fue menor que aquellas alimentadas con la araña. La viabilidad de los huevos de *N. californicus* alimentados con *T. urticae* fue similar a la de aquellos alimentados con

**Cuadro 2. Fertilidad de las hembras de *N. californicus* alimentadas con diferentes tipos de polen (n = 17) y viabilidad de los huevos (% de eclosión).**

Tipos de polen	Nº de huevos	Eclosión (%)
Girasol	19,4 b	100
Amapola de California	15,0 b c	100
Correhuela	5,8 b c	100
Diente de león	3,0 c	100
Hierba cana	3,0 c	100
Rábano silvestre	2,4 c	100
Nabo forrajero	2,0 c	100
Testigo	60,2 a	100

Promedios en la columna con la misma letra no son diferentes ( $P \leq 0,05$ ), según pruebas de rango múltiple de DUNCAN (1955). Testigo alimentado con *T. urticae*.

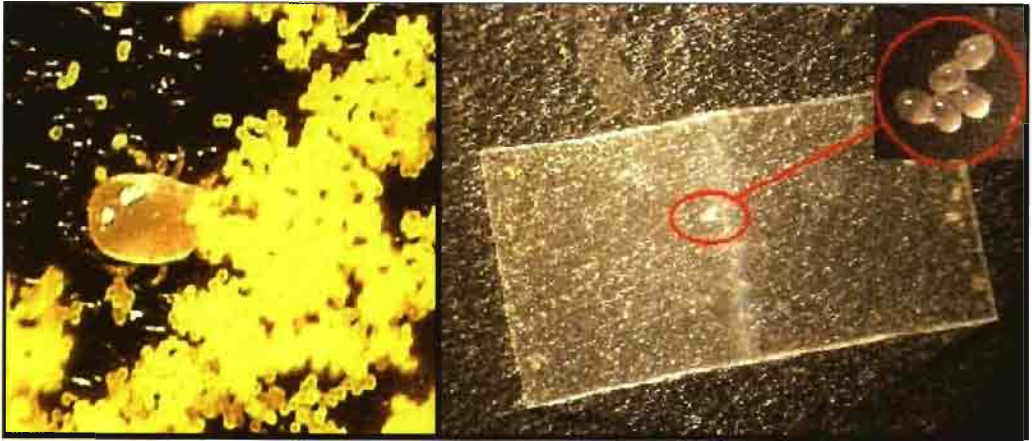


Figura 1. *N. californicus* en polen de girasol y sus huevos.

polen de girasol, correhuela, amapola de California, nabo forrajero, hierba cana, rábano silvestre y diente de león.

En conclusión, además de alimentarse de ácaros fitófagos, *N. californicus* puede sobrevivir alimentándose de polen, según indican

FLINT y DRIESTADT (1999). Alimentarse y reproducirse en polen es una alternativa interesante, ya que esta capacidad puede aumentar su supervivencia durante períodos de escasez de la presa (VAN RIJN y TANIGOSHI, 1999) y facilitar su crianza masiva.

#### ABSTRACT

SAZO L., J. E. ARAYA, P. ITURRIAGA. 2006. Effect of the type of pollen on survival, fertility and viability of eggs of *Neoseiulus californicus* (McGregor) in the laboratory. *Bol. San. Veg. Plagas*, 32: 619-623.

Groups of 25 *Neoseiulus californicus* (McGregor) (8 males y 17 females) from rearing trays with bean leaves (*Phaseolus vulgaris* L.) infested with *Tetranychus urticae* (Koch), reared on the same plants in the greenhouse, were fed with pollen of *Brassica rapa* L., *Eschscholtzia californica* Cham., *Senecio vulgaris* L., *Raphanus sativus* L., *Convolvulus arvensis* L., *Taraxacum officinale* Weber ex Wiggers and *Helianthus annuus* L., at 25°C, 75% HR and 16:8 h light dark photoperiod. Each experiment unit was a container with water and a polyurethane sponge, and onto it, a piece of black polyethylene, with a smaller piece of absorbent paper on each of the 4 borders touching the water, to provide water and prevent the mites from escaping. The predators were placed on the polyethylene, together with 4 mg pollen of each species separately, which were renovated every other day. The units were inspected daily, and the eggs were taken out and incubated to evaluate their viability, at the conditions described. A control was set with bean leaves infested with *T. urticae* as prey. There were two groups of results. In the first, pollen of *E. californica*, *C. arvensis* and *H. annuus* were similar in survival with the control. In the other, those predators provided with pollen from *B. rapa*, *T. officinale* and *R. sativus* did not survive more than 25 d. Over 50% of total eggs were produced on the control, followed by the predators fed with pollen from *H. annuus* and *E. californica*. The eggs from all treatments were 100% viable.

**Key words:** *Brassica rapa*, *Convolvulus arvensis*, *Cydnodromus californicus*, *Eschscholtzia californica*, *Helianthus annuus*, *Raphanus sativus*, *Senecio vulgaris*, *Taraxacum officinale*.

## REFERENCIAS

- ANÓNIMO, 2000. Historias de vida de los ácaros fitoséidos y su aplicación en el control biológico. *Ciencia Hoy*, **10**, 56, abril/mayo, rev. 13 de octubre de 2001 en: <http://cienciahoy.org/hoy56/acaros3htm>.
- DUNCAN, D. B., 1955. Multiple F and multiple range tests. *Biometrics*, **11**: 1-41.
- GARCÍA-MARÍ, F.; GONZÁLEZ-ZAMORA, J., 1999. Biological control of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) with naturally occurring predators in strawberry plantings in Valencia, Spain, *Experimental and Applied Acarology*, **23**: 487-495.
- FLINT, M. L.; DRIESTADT, S. H., 1999. *Natural Enemies Handbook: The Illustrated Guide to Biological Pest Control*, pp. 108-109, University of California Press, 154 p.
- PIPMP (Pennsylvania Integrated Pest Management Program). 2002. Hort report. Rev. June 14, 2006, at: <http://paipm.cas.psu.edu/pdf/BVB/mite.pdf>
- SAZO, R.; GASIC, C., 1993. Detección de resistencia de araña roja europea *Panonychus ulmi* (Koch) a dicofol y propargite en manzanos bajo condiciones de laboratorio, *Investigación Agrícola (Chile)*, **13**: 39-42.
- SAZO, R.; RAFFO, G., 1997. Resistencia de araña roja europea a clofentezine y hexithiazox en manzano, *Investigación Agrícola (Chile)*, **17**: 35-39.
- VAN RIJN, P.; TANIGOSHI, L., 1999. Pollen as food for the predatory mites *Iphiseius degenerans* and *Neoseiulus cucumeris* (Acari: Phytoseiidae) dietary range and life history, *Experimental and Applied Acarology*, **23**: 785-802.
- WATVE, C.; LIENK, S., 1975. Responses of two phytoseiid mites to pesticides used in New York apple orchards, *Environmental Entomology*, **4** (5): 797-800.

(Recepción: 15 marzo 2006)

(Aceptación: 19 junio 2006)





## Competencia intraespecífica en la respuesta de parasitación de *Chelonus oculator* Panzer (Hymenoptera: Braconidae)

M. GARCÍA-MARTÍN, T. CABELLO, A. TORRES-RUIZ, M. GÁMEZ

Un aspecto importante en la aplicación de un parasitoide como agente de lucha biológica puede ser su mayor o menor tendencia al superparasitismo que parece influir, entre otras causas, en el número final de huéspedes parasitados. Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido la determinar la capacidad de discriminación de *C. oculator* de huevos huéspedes previamente parasitados por hembras de la misma especie.

El ensayo se realizó en condiciones de laboratorio (20° C, 16:8 h de L:O y 60-80 % H.R), con hembras del parasitoide a la que se le ofertaron 5 densidades (50, 100, 150, 200 y 250 huevos huéspedes) de *Ephestia kuehniella*; en cada densidad, la mitad de los huevos habían sido previamente parasitados por otra hembra.

Nuestros resultados sugieren que, en condiciones de laboratorio, *C. oculator* presenta una alta capacidad de discriminación, evitando virtualmente el superparasitismo. Este comportamiento podría ser una ventaja en condiciones de campo, al incrementar el tiempo de búsqueda de huéspedes no parasitados.

M. GARCÍA-MARTÍN, T. CABELLO, A. TORRES-RUIZ. Biología Aplicada. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Almería. 04120 La Cañada (Almería).

M. GÁMEZ. Departamento de Estadística y Matemática Aplicada. Universidad de Almería. 04120 La Cañada (Almería). mgamez@ual.es

**Palabras clave:** Ecología, parasitoide, respuesta funcional, lucha biológica.

### INTRODUCCIÓN

En las especies que son parasitoides solitarios, el superparasitismo conlleva un alto coste biológico debido a que sólo un individuo puede emerger por huésped. Por tanto, evitar los huéspedes previamente parasitados puede representar una ventaja, pero requiere la capacidad de discriminar entre los huéspedes parasitados y no parasitados.

Dicha capacidad de discriminación parece estar ligada a: (a) estímulos físicos y químicos asociados interna y externamente con la fenología del huésped parasitado: estado de desarrollo, movilidad, accesibilidad o incluso capacidad de defenderse (GOBAULT *et al.*, 2004). (b) Sustancias químicas dejadas por las hembras sobre el huésped, tras la ovi-

posición (WIEDEMANN *et al.*, 2003), o en sus proximidades (HOFFMEISTER y ROITBERG, 1997). Debido a esto, las especies que atacan a huéspedes inmóviles (p. ej.: oófagos) emplean la mayoría del tiempo en examinar al huésped externamente con las antenas, posteriormente insertan el ovipositor obteniendo información adicional sobre la calidad del huésped, y solo entonces se produce la aceptación del mismo (GODFRAY, 1994).

Sin embargo, cuando los huéspedes no parasitados son escasos, se puede producir el superparasitismo: en condiciones de laboratorio, el mismo se incrementa gradualmente conforme la hembra parasita la masa de huevos ofrecida (WIEDEMANN *et al.*, 2003). Mientras que en condiciones naturales, además, la densidad del huésped, el grado de parasita-

ción del mismo, la ratio huésped/parásito por unidad de área, cambios en las condiciones medioambientales (ULLYETT, 1949), la carga ovárica de la hembra, e incluso la edad de la misma (COPE y FOX, 2003), parecen influir en la decisión de superparasitación.

Las especies del género *Chelonus* son parasitoides solitarios y koinobiontes y, en condiciones de laboratorio, existe superparasitismo: así en *C. Inanitus* L., sobre su huésped habitual *Helicoverpa armigera* (Hübner), el número máximo de huevos del parasitoide por huésped observado ha sido de cinco, llegándose a encontrar ocasionalmente más de una larva en el interior del embrión del huésped (RECHAV, 1978). También OZKAN (2006) ha encontrado más de una larva por huésped de *C. oculator*, en caso de insuficiencia de huevos del huésped alternativo *Plodia interpunctella* (Hübner). Pero ambos autores indican que sólo emerge una larva por huésped.

En este sentido, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar la capacidad de discriminación de huevos huéspedes parasitados, en situación de competencia intraespecífica de los adultos del parasitoide *Chelonus oculator*, en condiciones de laboratorio, con objeto de utilizar los datos obtenidos en programas de Lucha Biológica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño del ensayo fue totalmente aleatorio, con un tratamiento (parasitación previa o no de los huevos huéspedes) y densidad 5 niveles: 25, 50, 75, 100 y 150 huevos del huésped alternativo *Ephestia kuehniella* Keller. El ensayo se realizó en cámara climatizada a  $20 \pm 2^\circ$  C, 60-80 de H.R. y 16:8 horas de L:O; empleándose hembras previamente copuladas de *C. oculator* de menos de 48 horas de edad. Como cámaras de parasitación se utilizaron recipientes formados por placas de Petri (9 cm Ø), con las bases unidas por un cilindro de papel de filtro de 5cm de altura (Figura 1).

Para la parasitación previa, los huevos huéspedes fueron dispuestos en filas, adhe-



Figura 1. Detalle de la parasitación, por la hembra de *Chelonus oculator* y distribución de huevos huéspedes.

ridos mediante pincel y agua a una cartulina (3 x 3 cm) y se ofertaron, durante 24 horas, a una primera hembra copulada y con experiencia en oviposición. Tras este periodo, las cartulinas fueron extraídas y se completaron con igual número de huevos huéspedes sin parasitar, colocados en filas pareadas a las anteriores. Finalmente, dichas cartulinas fueron ofrecidas a una segunda hembra, de forma similar a la que se indicó anteriormente. Debido a la imposibilidad de distinguir entre la progenie de ambas hembras sólo se evolucionaron, hasta la emergencia del adulto, los huevos parasitados por la segunda hembra, en las condiciones de laboratorio citadas. El número de repeticiones fue de 10 para cada una de las densidades, dejándose testigos en cada caso.

Los datos del número de huevos huéspedes parasitados, fueron sometidos a análisis de la varianza, previa su transformación mediante  $\log(x+0,5)$ , con el programa estadístico SPSS, versión 12 (SPSS, 2003).

## RESULTADOS

En el Cuadro 1 se recogen los resultados encontrados del efecto de la presencia de huevos huéspedes previamente parasitados por una hembra de la misma especie, en el parasitismo de *C. oculator*.

**Cuadro 1. Número de repeticiones, valores medios y límites de confianza encontrados en el número de huevos de *Ephestia kuehniella* parasitados por *Chelonus oculator*, realizado en laboratorio (20±2° C, 60-80% H.R. y 16:8 horas de L:O), según densidad del huésped y en presencia de igual número de huevos huésped previamente parasitados por una hembra conespecífica.**

Densidad	Valores		
	n	media	Límites de confianza (P = 0,05)
25	10	7,5 a	1,22
50	10	11,67 a	0,48
75	10	12,50 a	1,13
100	10	5,71 a	0,45
125	10	3,99 a	0,69

(\*) Valores en columna seguidos de la misma letra no presentaron diferencias significativas.

En el análisis de la varianza del número de huevos huéspedes parasitados no se encontró efecto significativo de la densidad de los mismos. Debido a ello, no se realizaron los ajustes a ecuaciones de respuesta funcional.

Sin embargo, en todas las densidades estudiadas, el número de huevos parasitados fue mucho menor que el encontrado en las mismas condiciones sobre huevos sin parasitar (GARCÍA-MARTÍN *et al.*, 2005). El porcen-

taje medio de huevos huésped parasitados en presencia o no de huevos parasitados fue de un 15,78% frente a un 74,57%, respectivamente. Por tanto, nuestros resultados sugieren que, en condiciones de laboratorio, *C. oculator* evita virtualmente las masas de huevos huéspedes donde haya habido parasitación por otra hembra conespecífica.

En la Figura 2 se muestran los valores del porcentaje de huevos huéspedes parasitados a las distintas densidades ofrecidas, sobre los

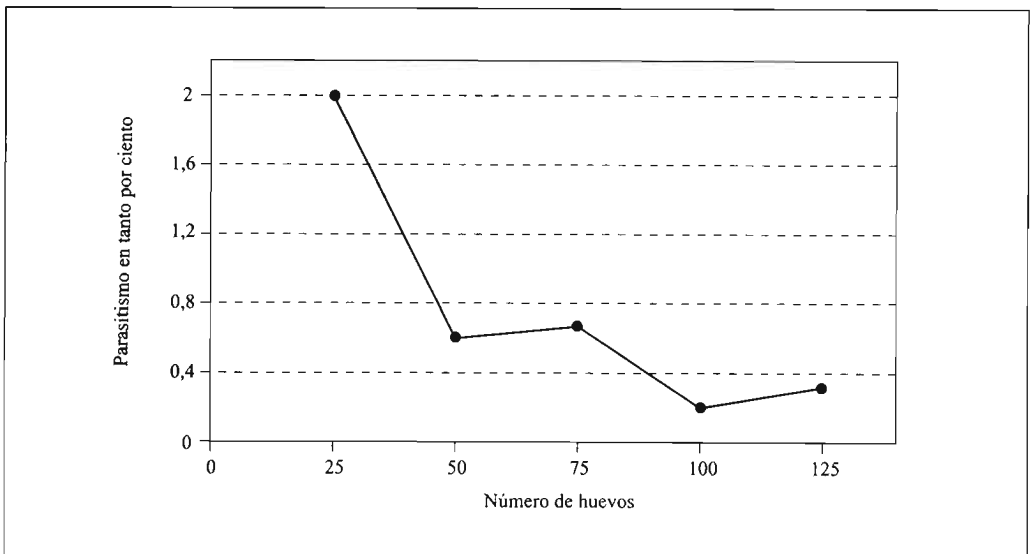


Figura 2. Evolución del porcentaje de parasitismo de *Chelonus oculator*, en el huésped *Ephestia kuehniella*, en condiciones de laboratorio, en presencia de huevos previamente parasitados por otra hembra.

huevos parasitados previamente por otra hembra de la misma especie.

## DISCUSIÓN

Los resultados encontrados (Figura 2) con un porcentaje medio de parasitismo muy bajo pueden parecer extraños ya que las hembras de los endoparasitoides solitarios, en competencia intraespecífica, tienden a aumentar el número de huevos ovipositados por masa de huevos huéspedes (VISSER y ROSENHEIM, 1998) y, además, las hembras de *Chelonus*, como se ha demostrado en *C. insularis*, son capaces de discriminar huevos previamente parasitados por hembras de la misma especie, mediante los quimiorreceptores del ovipositor o de las antenas (ABLES *et al.*, 1981). Igualmente, en otra especie del género: *C. texanus*, las hembras pueden parasitar hasta un 35,29% huevos huéspedes previamente parasitados por otras hembras (ULLYETT, 1949). Por todo ello, era de esperar que el porcentaje de parasitismo encontrado en los huevos huéspedes no parasitados fuera más elevado, incluso mayor al encontrado en el ensayo sin competencia (GARCÍA-MARTÍN *et al.*, 2005).

La única explicación posible a estos resultados puede ser que *C. oculator* rechace ovipositar en masas de huevos huéspedes, en los que existan huevos previamente parasitados. Este comportamiento se ha demostrado en

algunas especies de parasitoides que evitan la competencia detectando, a distancia, la presencia de otras hembras o huevos previamente parasitados (JANSSEN *et al.*, 1996; CASTELO *et al.*, 2003; WERNER y PEACORD, 2003). Ello implicaría la existencia de feromonas de señalización en la especie, aún no descritas para las especies del género.

Por tanto, estos resultados deberían ser completados con estudios posteriores, ya que presentan una faceta muy importante en la aplicación de *C. oculator*, como agente control biológico: el comportamiento de parasitación encontrado en esta especie puede ser una ventaja en condiciones de campo, aún a bajas densidades de la plaga; ya que al evitar los huevos previamente parasitados, *C. oculator* va a aumentar su eficacia, por aumento del tiempo de búsqueda de huéspedes sin parasitar. Aspecto importante en la utilización de la lucha macrobiológica por aumento, con densidades de sueltas del parasitoide relativamente altas.

## AGRADECIMIENTOS

Los trabajos contenidos en este artículo han sido financiados parcialmente dentro del Proyecto UE-2001-70484 "Development of and environmentally friendly protection of sweet pepper and strawberry" y con la acción integrada Hispano-Húngar HH 2004-0013.

## ABSTRACT

GARCÍA-MARTÍN M., T. CABELLO, A. TORRES-RUIZ, M. GÁMEZ. 2006. Intraspecific competence in parasitism response of *Chelonus oculator* Panzer (Hymenoptera: Braconidae). *Bol. San. Veg. Plagas.* 32: 625-629.

An important aspect in the application of a parasitoid as biological control agent can be its trend to superparasitism that seems to influence, among other reasons, in parasitized host final number. Therefore, the aim of this work has been to determine the capacity of discrimination of *C. oculator* of host eggs before parasitized for conspecific females.

The tests were realized in laboratory conditions (20° C, 16:8 h of L:O and 60-80 % H.R), with parasitoid females which 5 offered densities (50,100,150, 200 and 250 host eggs) of *Ephesia kuehniella*: in every density, the half of the eggs they had been before parasitados for another female.

Our results suggest that, in laboratories conditions, *C. oculator* presents a high capacity of discrimination, avoiding virtually the superparasitism. This behavior might be an advantage in fields conditions, on having increased the time of unparasitized host searching.

**Key words:** Ecology, parasitoid, functional response, biological control.

## REFERENCIAS

- ABLES, J. R., ; VINSON, S. B. ; ELLIS, J. S., 1981. Host discrimination by *Chelonus insularis* (Hym.: Braconidae), *Telenomus Heliolithidis* (Hym.: Scelionidae), and *Trichogramma pretiosum* (Hym.: Trichogrammatidae). *Entomophaga*, **26**: 149-156.
- CASTELO, M. K.; CORLEY, J. C.; DESOUHANT, E., 2003. Conspecific avoidance during foraging in *Venturia canescens* (Hym.: Ichneumonidae): the roles of host presence and conspecific densities. *Journal of Insect Behavior*, **16**: 307-318.
- COPE, J. M.; C. W. FOX., 2003. Oviposition decision in the seed beetle, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae): effects of seed size on superparasitism. *Journal of Stored Products Research* **39**: 355-365.
- GARCÍA-MARTÍN, M., 2005. Estudio de la respuesta funcional en sistemas parasitoide-huésped: aplicación en lucha biológica contra plagas. Universidad de Almería. Tesis doctoral. Almería: 152 pp.
- GOBAULT, M., KRESPI, L., BOIVIN, G., POINSOT, J. P. N.; CORTESERO, A. M., 2004. Intraspecific Variation in Host Discrimination Behavior in the Pupal Parasitoid *Pachycrepoideus vindemniae* Rondani (Hymenoptera: Pteromalidae). *Environmental Entomology*, **33**: 362-369.
- GODFRAY, H. C. J., 1994. *Parasitoids behavioral and evolutionary ecology*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- HOFFMEISTER, S. T.; ROITBERG, B. D., 1997. To mark to host or the patch: decision of a parasitoid searching for concealed host larvae. *Evol. Ecol.*, **11**: 145-168.
- JANSSEN, A.; APHEN, J. J. M. VAN; SABELIS, M; BAKKER, K., 1996. Odor-mediated avoidance of competition in *Drosophila* parasitoids: the ghost of competition past. *Oikos*, **73**: 356-366.
- OZKAN, C., 2006. Laboratory rearing of the solitary egg-larval parasitoid, *Chelonus oculator* Panzer (Hymenoptera: Braconidae) on a newly recorded factitious host *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Pest Science*, **79**: 27-29.
- RECHAV, Y., 1978. Biological and ecological studies of the parasitoid *Chelonus inanitus* (Hym.: Braconidae) in Israel: IV. Oviposition, host preferences and sex ratio. *Entomophaga*, **23** (1):95-102.
- SPSS, 2003. *Manual de usuario del SPSS base, versión 12.0*. SPSS Inc, Chicago: 726 pp.
- ULLYETT, G.C., 1949. Distribution of progeny by *Chelonus texanus* Cresson (Hymenoptera: Braconidae). *Can. Entomol.* **81**: 25-44.
- VISSER, M. E. ; ROSENHEIM, J. A., 1998. The influence of competition between foragers on clutch size. *Biological control*, **11**: 169-174.
- WERNER, E. E.; PEACORD, S. D., 2003. A review of trait-mediated indirect interactions in ecological communities. *Ecology*, **84**: 1083-1100.
- WIEDEMANN, L.M., CANTO-SILVA, C.R., ROMANOWSKI, H.P. and READELLI, L.R., 2003. Oviposition behaviour of *Gryon galarдой* (Hym.: Scelionidae) on eggs of *Spartocera dentiventris* (Hem.: Coreidae). *Braz. J. Biol.*, **63**: 133-139.

(Recepción: 24 abril 2006)

(Aceptación: 23 junio 2006)





## Manejo de la cría del picudo rojo de la palmera, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera, Dryophthoridae), en dieta artificial y efectos en su biometría y biología

M. M. MARTÍN, T. CABELLO

Se ha puesto a punto una metodología viable para la cría, en condiciones de laboratorio, de la especie *R. ferrugineus*, igualmente se ha desarrollado una dieta artificial, derivada de la utilizada en Lepidoptera, con componentes de fácil adquisición y sin problemas de elaboración y manejo. Con esta metodología y dieta ha sido factible el desarrollo de la especie durante 5 generaciones con valores medio del desarrollo (a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $65\pm 10\%$  de H.R. y en oscuridad) de 84,62 días para larvas y 28,69 días para pupa. La longevidad media de machos fue de 199,4 días y el de hembras de 144,3 días; éstas presentaron una fecundidad media de 211,1 huevos/♀ y una fertilidad de 164,71 larvas/♀. Estos valores son bastante mejores a los presentados por adultos, cuyas pupas fueron recolectadas en campo, alimentándose en *Phoenix canariensis*, que tenían una longevidad de hembras de 69,8 días y unos valores de fecundidad y fertilidad de 158,2 y 67,7 huevos y larvas por hembra, respectivamente. El único efecto encontrado, debido a la cría prolongada en laboratorio, fue el menor tamaño de las hembras adultas, que fue más acusado en el caso de los machos; sin embargo, el mismo no repercutió en los parámetros biológicos, antes indicados.

M. M. MARTÍN, T. CABELLO. Entomología Agrícola. Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería. Ctra. Sacramento s/n. 04120-Almería. tcabello@ual.es

**Palabras clave:** Palmera, plaga, *Rhynchophorus ferrugineus*, metodología, dieta artificial, cría en laboratorio.

### INTRODUCCIÓN

El picudo rojo de la palmera, *Rhynchophorus ferrugineus*, es una de las plagas más severas de palmeras y cocoteros en Asia (HOWARD *et al.*, 2001). Es un curculiónido tropical originario de las zonas selváticas de Asia y Oceanía. La distribución actual comprende los siguientes países y áreas geográficas: Arabia Saudita, Australia, Bahrein, Bangladesh, Borneo, Camboya, China, Egipto, Filipinas, India, Indonesia, Irak, Irán, Islas Salomón, Israel, Japón (Kobe), Jordania, Kuwait, Laos, Malasia, Myanmar, Omán, Polinesia, Papua - Nueva Guinea,

Pakistán, Qatar, Sri Lanka, Sumatra, Tailandia, Taiwán, Vietnam (LEPESME, 1947, WATANAPONGSIRI, 1966, BUTANI, 1975, KRANZ *et al.*, 1982, HILL, 1987, BOKHARI y ABUZUHIRA, 1992, COX, 1993, LIAO y CHEN, 1997, KEHAT, 1999, EPP0, 2000, EPP0, 2001). Recientemente, se ha indicado su introducción en otros países del área mediterránea como Italia, Turquía y Grecia (FERRY y GÓMEZ, 2002; LONGO y TAMBURINO, 2005).

Los primeros ataques de esta especie, en España, se detectaron en 1993, en Almuñécar (Granada) (BARRANCO *et al.*, 1996); desde dicha fecha hasta el año 2000, la espe-

cie causando graves problemas quedó localizada en las poblaciones costeras de Motril, Salobreña, Almuñécar, Nerja, Frigiliana y Torrox, afectando tanto a palmeras en parques públicos como en jardines privados (JUNTA DE ANDALUCÍA, 1999, 2000; CABELLO, 2006). Sin embargo, la situación anterior se vio drásticamente agravada con la importación masiva de palmeras infestadas procedentes de Egipto, para su utilización en el ajardinamiento de nuevas urbanizaciones en casi todo el litoral mediterráneo de Valencia, Murcia y Andalucía; de forma que comenzaron a aparecer nuevos focos muy localizados. Actualmente, se ha detectado, por los correspondientes servicios oficiales de Sanidad Vegetal de las Comunidades Autónomas (*datos no publ.*), en Marbella y Estepona (Málaga), Almería y provincia, Sangonera la Seca (Murcia), Alicante (San Vicent del Rapedig y Elche), Valencia (Olcavau y Bétera) y Castellón (Moncofar y Almenara); recientemente se ha encontrado en Canarias, también en focos muy localizados en los municipios de Las Palmas de Gran Canaria y Mogán (Gran Canaria); así como en los municipios de Pájara y Antigua (Fuerteventura).

La especie *R. ferrugineus* ha sido criada, en condiciones controladas, sobre tejido del estípite de cocotero (*Cocos nucifera*) (VIADO y BIGORNIA, 1949); en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) como huésped alternativo (RAHALKAR *et al.*, 1972, 1978, 1985; RANANAVARE *et al.*, 1975) y en semi-dieta artificial (RAHALKAR *et al.*, 1978, 1985).

RAHALKAR *et al.* (1978, 1985) fueron los primeros que utilizaron dieta artificial como substrato alimenticio de larvas de *R. ferrugineus*; su composición que posteriormente modificada por estos autores para una mejor adaptación a la cría de la especie, presenta el inconveniente de ser una semi-dieta, en la que predominan componentes naturales de difícil conservación y manejo complejo en la preparación de la misma, como son tejidos del fruto del coco y de caña de azúcar.

El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar una dieta artificial de fácil elabora-

ción para la cría de *R. ferrugineus*, así como una metodología que permita la mantenimiento de la especie, en condiciones de laboratorio, durante varias generaciones.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la puesta a punto de la cría del picudo rojo de la palmera, *Rhynchophorus ferrugineus*, se realizaron dos grupos de ensayos. En el primero, se estableció la metodología de la misma en dieta artificial; posteriormente, se evaluó el efecto de la cría prolongada de esta especie, también en condiciones de laboratorio.

### a) Manejo de la cría de la especie

Para este ensayo, los ejemplares de *R. ferrugineus* empleados fueron recogidos de campo (zona costera de la provincia de Granada) y mantenidos en cría, en laboratorio, como se indica a continuación, durante una generación; realizándose el ensayo con los ejemplares de la generación siguiente. Las condiciones del ensayo fueron: temperatura  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ , humedad relativa  $65 \pm 10 \%$  y en oscuridad.

La composición de la dieta artificial empleada para la cría de las larvas se detalla en el cuadro 1. La misma ha sido una adaptación de la empleada por CABELLO *et al.* (1984a, b) para especies de Lepidoptera, con la única diferencia de añadir fibra seca de coco. La composición del complejo vitamínico, por cada 100 ml, fue: B<sub>1</sub> (0,5 g), B<sub>2</sub> (1 g), B<sub>6</sub> (0,3 g), B<sub>12</sub> (0,003 g), C (5 g), D<sub>3</sub> (500.000 U.I.), E (0,9 g), K<sub>3</sub> (0,5 g), ácido fólico (0,1 g), ácido nicotínico (2 g), pantotenato de calcio (1 g), ácido aspártico (1,45 g), treonina (0,64 g), serina (0,66 g), ácido glutámico (2,64 g), prolina (1,15 g), glicina (1,53 g), alanina (1,74 g), cisteína (0,126 g), metionina (1,11 g), isoleucina (0,98 g), leucina (2,01 g), fenilalanina (0,77 g), tirosina (0,68 g), lisina (2,07 g), histidina (0,56 g), arginina (1,41 g) y triptófano (0,367 g).

El ensayo se realizó con un número inicial de 660 huevos. Los datos recogidos fueron: duración de los estados de huevo, larva y pupa, así como, los adultos emergidos. Para

Cuadro 1. Composición de la dieta artificial desarrollada para la cría de *Rhynchophorus ferrugineus*.

Componente	Nombre comercial	Empresa	Cantidad (g)
Ácido ascórbico	Ácido ascórbico para análisis ACS-ISO	Panreac Química S.A.	4,02
Ácido benzoico	Ácido benzoico para análisis	Panreac Química S.A.	1,61
Agar	Agar (USP) puro®	Panreac Química S.A.	17,86
Agua destilada	—	—	785,71
Cloranfenicol	Cloranfenicol-L BP93®	Gunama	0,45
Fibra seca de coco	Ecococo®	C.P.S.A.	7,14
Complejo vitamínico	Hidro Rex Vital Amoniácidos®	S.P. Veterinaria S.A.	47,68
Germen de trigo	Germen de trigo	Santiveri S.A.	44,64
Harina de maíz	—	—	44,64
Levadura de cerveza	Levadura de cerveza	Santiveri S.A.	44,64
Nipagin -M- sodio	Nipagina®	—	1,61

evaluar la fecundidad y fertilidad de adultos se formaron 28 parejas; en este caso los datos registrados fueron: longevidad de adultos (hembras y machos) y fecundidad de hembras. Los valores de los parámetros anteriores se dan por su media y límite de confianza (a  $P = 0,05$ ).

#### b) Efecto de la cría prolongada en condiciones de laboratorio y empleando dieta artificial

Una vez puesto a punto la cría de la especie, se realizó este segundo ensayo para evaluar los efectos de la cría en laboratorio, con dieta artificial, durante varias generaciones, para ello se recolectaron en campo, en la zona anteriormente indicadas pupas, de cuyos adultos se estableció la cría durante generaciones 5 generaciones, en las mismas condiciones a las señaladas con en el primer ensayo. El diseño del ensayo fue totalmente aleatorio, se empleó el único factor: generación, con un número variable de repeticiones. Para el desarrollo post-embionario, se utilizaron las siguientes repeticiones: 108 para  $F_1$ , 64 para  $F_2$ , 88 para  $F_3$ , 67 para  $F_4$  y 61 para  $F_5$ . En todas las generaciones se anotó la mortalidad a lo largo del desarrollo post-embionario, la fecha de formación de la pupa y emergencia de adulto.

Para evaluar la longevidad y fecundidad de adultos, en cada generación, se utilizaron

10 parejas; empleando iguales parámetros que en el primer ensayo. Igualmente se evolucionaron todos los huevos, de cada generación, para establecer la fertilidad de hembras.

Los datos del desarrollo post-embionario, y de los adultos, fueron sometidos a análisis de la varianza; los valores medios fueron comparados mediante mínima diferencia significativa (a  $P=0,05$ ). Para ello, se utilizó el programa SPSS, versión 12 (SPSS, 2003).

Para completar los estudios de los efectos de la cría en condiciones controladas, en la última generación ( $F_5$ ), se seleccionaron al azar 25 hembras y 25 machos, y fueron comparados biométricamente con 24 hembras y 25 machos, cuyas pupas habían sido recolectados de campo, provenientes de *Phoenix canariensis*. En cada ejemplar se realizaron las siguientes medidas: longitud máxima de la cabeza, anchura máxima del pronoto, anchura máxima y longitud máxima del abdomen, longitud máxima del élitro, longitud del fémur, tibia y tarsos de la pata posterior (figura 1). Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis multivariante, para su clasificación en poblaciones mediante función discriminante; empleando, para ello, el programa anteriormente indicado. Igualmente, a efectos comparativos, se estudió la longevidad y fecundidad de dichos adultos, utilizando 20 parejas.

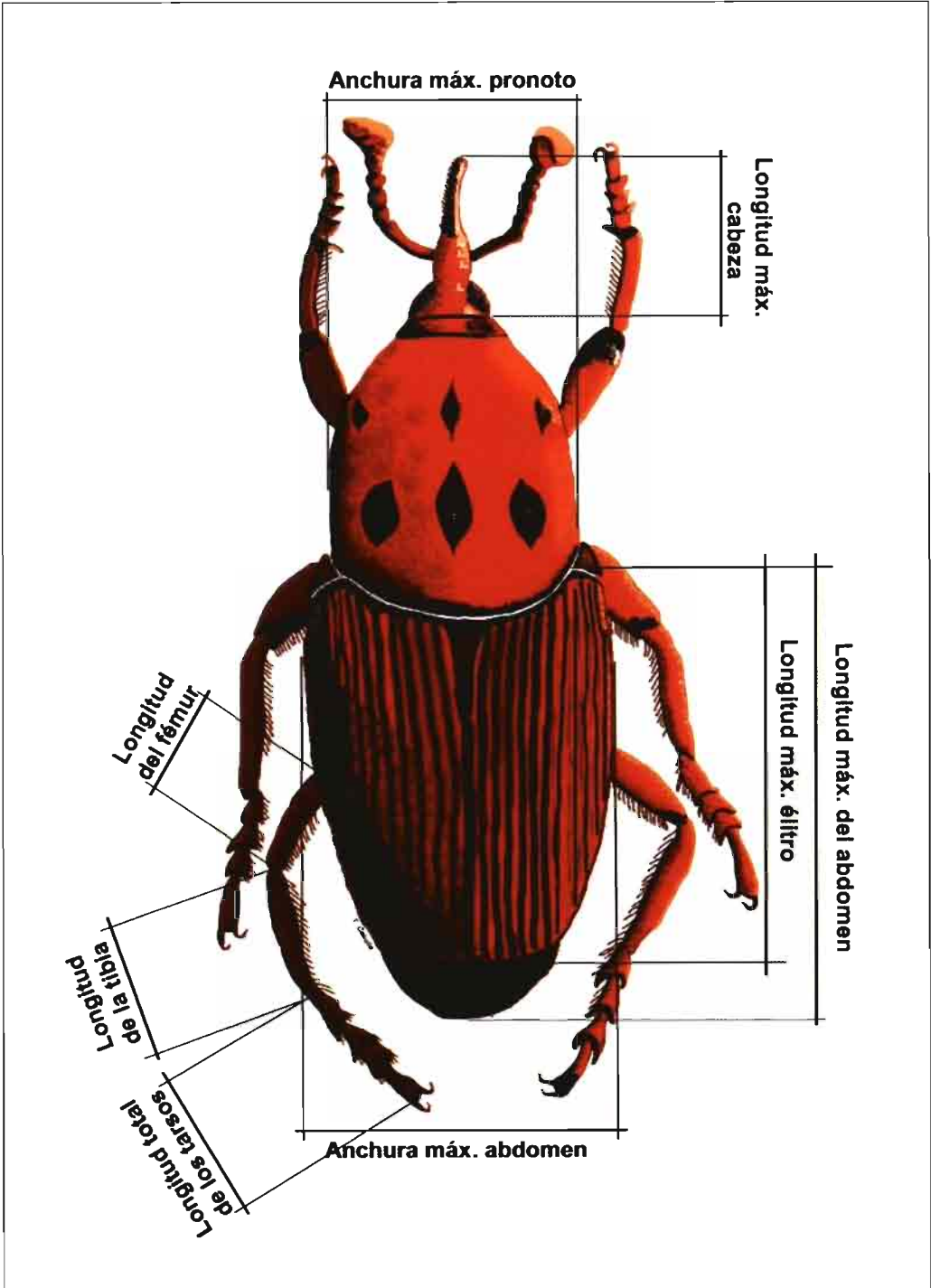


Figura 1. Parámetros medidos en adultos de *Rhynchophorus ferrugineus*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### a) Manejo de la cría de *R. ferrugineus* en laboratorio

a.1) Oviposición: los adultos emergidos fueron agrupados por parejas, en recipientes de plástico (2,5 l), a los que se les añadió, como alimento y sustrato de oviposición, un trozo de manzana con epidermis, que es un material muy bien aceptado por las hembras, de forma que la pulpa es un buen alimento de adultos y la epidermis es preferida para la oviposición; además los opérculos dejados sobre los huevos hacen a éstos fácilmente localizables (figura 2); el trozo de manzana debe ser renovado cada 24-48 horas. Los recipientes de oviposición, fueron cerrados ligeramente con su tapadera, para permitir el intercambio gaseoso, y se mantuvieron en las condiciones anteriormente indicadas. El fragmento de manzana, recogido de cada pareja, se deshacía con la ayuda de un bisturí y se extraían los huevos.

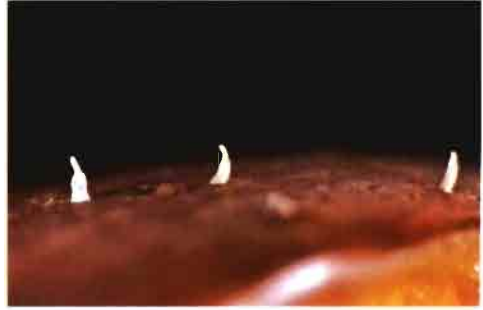


Figura 2. Detalle de los opérculos dejados por las hembras adultas de *Rhynchophorus ferrugineus* en la epidermis de manzana, durante la oviposición.

a.2) Estado de huevo: los mismos, después de ser extraídos, del trozo de manzana, se situaban en placas de Petri sobre una fina capa de dieta artificial (1mm), que servía de primer alimento a las larvas neonatas. Estos recipientes, con unos 20 huevos por placa, se depositaban en un incubador, en las condiciones del ensayo. Diariamente, se observa-



Figura 3. Recipientes empleados en la cría de los primeros estadios larvarios de *Rhynchophorus ferrugineus*, en laboratorio y empleando dieta artificial.



Figura 4. Recipientes empleados en la cría de los últimos estadios larvarios de *Rhynchophorus ferrugineus*, en laboratorio y empleando dieta artificial.

ban las placas y se extraían las larvas neonatas. Se ha encontrado que la duración de este estado fue de  $3,35 \pm 0,27$  días.

a.3) Manejo de larva: Las larvas neonatas, extraídas de las placas de Petri, fueron introducidas, individualmente, en botes Coulter (20 ml), rellenos hasta la mitad con dieta artificial (figura 3), los mismo deben ser renovados 2 veces, cada 15 días; después de 30 días, las larvas se transferían a recipientes de polipropileno de 100 ml, rellenos hasta la mitad con dieta (figura 4); en éstos, las larvas permanecen 45 días; igualmente, dieta y recipientes se renuevan cada 15 días.

Con dieta artificial y a  $25^{\circ}$  C la duración del estado de larva fue de  $95,53 \pm 1,63$  días. Éste valor es similar a los 96 días señalados por ESTEBAN-DURAN *et al.*, (1998), pero en caña de azúcar; por otra parte son ligeramente mayores a los encontrado por (VIADO y BIGORNIA, 1949; RAHALKAR *et al.*, 1972, 1975, 1985; SALAMA y ABDEL-RAZEK, 2002).

a.4) Manejo de pupa: Posteriormente, las larvas se colocan en el mismo tipo de recipientes antes citados (100 ml), pero rellenos hasta la mitad con fibra vegetal seca y deshilachada (*Agave americana* L.), humedecida cada dos días, con agua destilada (figura 5); la cuál es aceptada muy bien por las larvas como sustrato de pupación. Las pupas fueron mantenidas, en las condiciones antes indicadas, hasta emergencia de adultos. El tiempo empleado en este estado fue de  $27,83 \pm 3,13$  días.

a.5) Rendimiento de la cría: El rendimiento en adultos fue 60,7%, respecto al número de larvas neonatas empleadas; lo que indica la idoneidad de la dieta, así como el método de manejo de los estados inmaduros de la especie. Dicho valor está muy próximo al encontrado, para la misma especie, pero empleando como sustrato caña de azúcar o fruto de coco (RAHALKAR *et al.*, 1972; ESTEBAN-DURAN *et al.*, 1998); pero son ligeramente mayores a los encontrados por RAHALKAR *et al.* (1978) empleando semi-dieta, que consiguieron rendimientos del 28% al 66%, según generación.



Figura 5. Detalle de la fibra empleada como sustrato de pupación de *Rhynchophorus ferrugineus*, en condiciones de laboratorio.

Respecto a la longevidad de adultos, las hembras presentaron un valor de  $108,04 \pm 20,86$  días; a su vez, para los machos la misma fue de  $121,38 \pm 56,56$  días. La fertilidad de la hembra fue de  $174,19 \pm 18,57$  huevos.

La dieta desarrollada, según los datos anteriores, permite la cría de la especie de forma fácil. La misma presenta la ventaja, a las utilizadas hasta la fecha, de no emplear constituyentes fresco, como por ejemplo fruto de coco o caña de azúcar, lo que facilita la elaboración y utilización de la dieta artificial puesta a punto.

b) Efecto de la cría prolongada, en condiciones de laboratorio y con dieta artificial, en los parámetros biológicos de *R. ferrugineus*

La cría de insectos, en condiciones controladas y a largo plazo, puede presentar riesgos de problemas genéticos, que afectan a la viabilidad de los mismos; así como, a sus características biológicas, como son: malformaciones en adultos, disminución en fecundidad y fertilidad, mayor mortalidad de larvas, etc. (MACKAUER, 1976, PETERS y BARBOSA, 1977, WAAGE *et al.*, 1985; CABELLO, 1994).

En el cuadro 2 se recogen los valores de duración del desarrollo de los estados de



Cuadro 2. Duración del desarrollo post-embrionario (en días) de *Rhynchophorus ferrugineus*, según generación, en dieta artificial y condiciones de laboratorio (25±2° C y H.R.: 65±10%).

Estado	Número de días					Valor medio
	Generación					
	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	
Larva	93,40 b	74,43 a	90,30 b	86,39 c	87,36 c	84,62
Pupa	30,00 b	26,86 ab	26,63 a	29,65 b	31,61 b	28,69
Total	128,40 a	112,16 c	117,04 b	115,74 bc	118,97 b	118,23

Valores en fila, seguidos de la misma letra, no presentan diferencias significativas a  $P=0,05$

larva, pupa y total, de *R. ferrugineus*, durante cinco generaciones mantenidas en laboratorio y en dieta artificial. En el análisis realizado, se ha encontrado un efecto altamente significativo ( $P<0,01$ ) de la generación sobre la duración del estado de larva. Sin embargo, existen ligeras variaciones, con diferencias menores a 16 días entre generaciones. Igualmente, si analizamos la duración del estado de pupa, se encontró un efecto altamente significativo ( $P<0,01$ ) de la generación; en este caso, existe una ligera tendencia a aumentar la duración del estado, salvo en F<sub>2</sub>, con el paso de las generaciones. En la duración del desarrollo post-embrionario total, también se ha encontrado un efecto altamente significativo ( $P<0,01$ ) de la generación; aunque, tampoco se ha observado una tendencia, creciente o decreciente, del mismo con la sucesión de generaciones. En este sentido hay que señalar que RAHALKAR *et al.* (1978), durante 12 generaciones de cría de la especie en semi-dieta, tampoco encontraron una relación entre la duración y generación. Las diferencias encontradas entre generaciones puede ser debido al desarrollo no sincronizado de los estados inmaduros que presenta la especie, como se ha demostrado en otros trabajos sobre esta especie (CABELLO, 2006) y en otras especies de curculiónidos (PÉREZ-FARINÓS, 2003)

Los resultados medios encontrados (84,62 días) (cuadro 2), para las cinco generaciones, son menores, respecto a la duración del estado de larva, al del ensayo de puesta a punto de la dieta, a igual temperatura; sin embargo, la duración del estado de pupa (28,69 días) es muy similar.

La mortalidad en estado de larva y pupa, así como conjunta, para *R. ferrugineus* criada en condiciones controladas, durante cinco generaciones, presentó unos valores medios del 21,60; 28,56 y 44,02%, respectivamente. Comparando los resultados obtenidos con los datos de RAHALKAR *et al.* (1978) se debe mencionar que el valor encontrado (44,02%) es inferior al reportado por estos autores.

En el cuadro 3 se recogen los valores medios de longevidad de adultos, durante las cinco generaciones. En el análisis estadístico de los datos no se encontró efecto significativo de la generación en la longevidad de hembras. Por el contrario, si lo hubo en la longevidad de machos ( $P<0,05$ ). En este caso, la máxima longevidad se dio en las generaciones F<sub>3</sub> y F<sub>5</sub>, que no presentaron diferencias significativas entre si; los valores mínimos se obtuvieron en las generaciones F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>. En general, como ocurrió en el desarrollo post-embrionario, no se puede observar una tendencia en la longevidad, tanto de machos como hembras, en relación al paso de las generaciones. Para los valores de fecundidad y fertilidad de hembras (cuadro 3) no hubo efecto significativo de la generación. Los valores de fecundidad obtenidos son mayores a los citados por RAHALKAR *et al.* (1978) para la misma especie.

Si se compara los datos medios de las hembras adultas, mantenidas durante las 5 generaciones en laboratorio, con los de las hembras de campo (cuadro 3), se puede observar que la fecundidad y fertilidad fue mucho mayor para las primeras, ello probablemente debido a la mayor duración del periodo de oviposición de éstas que casi duplicó al presentado por las

Cuadro 3. Parámetros biológicos de los adultos de *Rhynchophorus ferrugineus* criados en condiciones de laboratorio (temperatura: 25±2° C y H.R.: 65±10%), durante cinco generaciones.

Origen	Generación	Longevidad de adultos (días)				Macho	Fecundidad (No. huevos/♀)	Fertilidad (No. larvas/♀)
		Hembra						
		Preoviposición	Oviposición	Post-oviposición	Total			
Laboratorio	F <sub>1</sub>	10,4 b	85,6 a	32,2 a	128,3 a	164,0 ab	213,0 a	160,5 a
	F <sub>2</sub>	8,3 ab	110,9 a	23,7 a	142,9 a	152,6 a	185,0 a	137,8 a
	F <sub>3</sub>	17,1 c	112,2 a	38,4 a	167,8 a	244,7 c	182,7 a	146,3 a
	F <sub>4</sub>	5,5 a	92,6 a	43,6 a	146,5 a	214,8 b	215,7 a	169,4 a
	F <sub>5</sub>	5,5 a	111,6 a	19,1 a	135,9 a	220,7 bc	259,0 a	209,6 a
	Media	9,4	102,6	31,4	144,3	199,4	211,1	164,71
Campo	F <sub>0</sub>	8,1	56,3	8,8	69,8	–	158,2	67,7

Valores en columna, seguidos por la misma letra, no presentan diferencias significativas a P=0,05.

Cuadro 4. Valores de los parámetros morfológicos medidos (mm) en adultos de *Rhynchophorus ferrugineus*, según sexo y procedencia (laboratorio o campo).

Parámetro (mm)	Valor	Hembra		Macho		Total	
		Campo	Laboratorio	Campo	Laboratorio	Campo	Laboratorio
		Longitud máx. de la cabeza	número	24	25	25	25
	media	7,48	5,91	7,19	5,36	7,33	5,64
	des. est.	1,14	0,53	0,64	0,73	0,92	0,69
Anchura máx. del pronoto	número	24	25	25	25	49	50
	media	9,34	7,35	10,23	7,63	9,80	7,49
	des. est.	1,42	0,57	0,68	0,53	1,18	0,56
Anchura máx. del abdomen	número	24	25	25	25	49	50
	media	11,92	9,22	12,93	9,48	12,44	9,35
	des. est.	1,73	0,59	0,87	0,60	1,434	0,60
Longitud máx. del élitro	número	24	25	25	25	49	50
	media	15,68	11,88	17,16	12,24	16,44	12,06
	des. est.	2,85	1,05	1,18	0,76	2,27	0,93
Longitud máx. del abdomen	número	24	25	25	25	49	50
	media	18,92	14,97	19,68	14,95	19,31	14,96
	des. est.	3,44	1,12	1,17	0,82	2,55	0,97
Longitud del fémur de la pata posterior	número	24	25	25	25	49	50
	media	6,45	5,12	7,21	5,67	6,84	5,49
	des. est.	0,93	0,52	0,71	0,37	0,90	0,52
Longitud de la tibia de la pata posterior	número	24	25	25	25	49	50
	media	4,38	3,59	5,33	3,70	4,86	3,64
	des. est.	0,65	0,38	0,72	0,58	0,83	0,49
Longitud de los tarsos de la pata posterior	número	24	25	25	25	49	50
	media	4,22	3,40	4,82	3,70	4,53	3,55
	des. est.	0,59	0,29	0,48	0,37	0,62	0,36

hembras de campo. Estos datos también son indicación de la idoneidad del método de cría desarrollado.

Finalmente, la biometría de adultos según origen y sexo se recoge en el cuadro 4. El análisis multivariante presentó significación estadística ( $P < 0,05$ ); los valores más discriminantes fueron la anchura máxima del pronoto y del abdomen; que fueron utilizados para la representación de las poblaciones como recoge la figura 6 para hembras y figura 7 para machos. En dichas figuras se puede observar que las hembras de laboratorio y campo pertenecen a la misma población,

aunque los adultos provenientes de la cría en laboratorio fueron menores; por el contrario, en machos el efecto es mucho más acusado, de forma que las poblaciones estaban claramente separadas entre sí, sin solapes. Este menor tamaño de los adultos de laboratorio a sido efecto de la cría prolongada en laboratorio, como se ha demostrado en otros insectos mantenidos en laboratorio, especialmente en parasitoides y depredadores (GRENIER y CLERCQ, 2003); sin embargo, en el presente caso, no tuvo efecto en los parámetros biológicos de las hembras (longevidad y fecundidad), como se mencionó anteriormente.

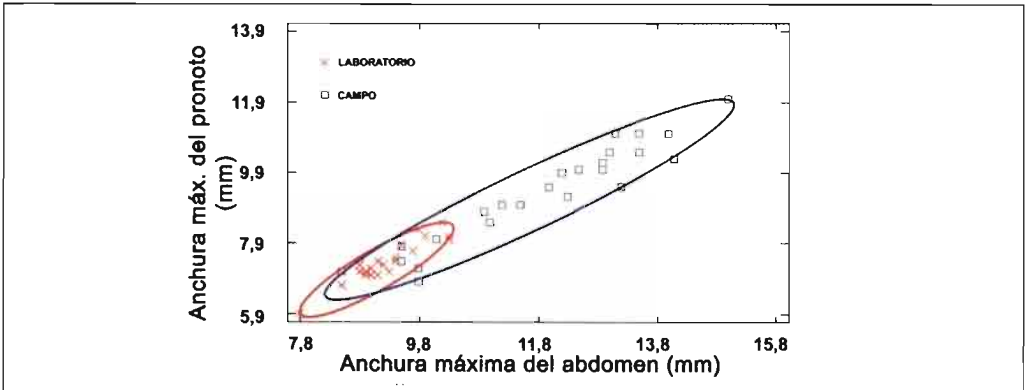


Figura 6. Representación de las hembras adultas de *Rhynchophorus ferrugineus*, según procedencia (laboratorio o campo), en función de los dos parámetros más discriminantes en el análisis multivariante.

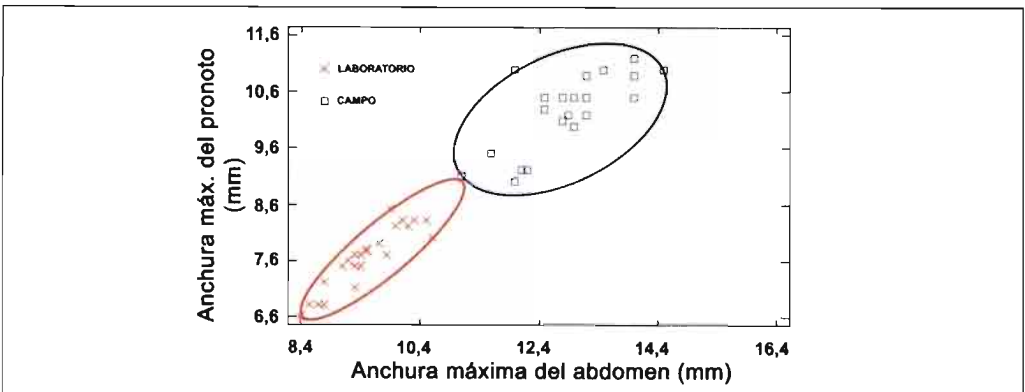


Figura 7. Representación de los machos adultos de *Rhynchophorus ferrugineus*, según procedencia (laboratorio o campo), en función de los dos parámetros más discriminantes en el análisis multivariante.

## ABSTRACT

MARTÍN M. M., T. CABELLO. 2006. Rearing management of Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera, Dryophthoridae), in artificial diet and effects on biology and adult biometry. *Bol. San. Veg. Plagas*, **32**: 631-641.

A viable methodology has been developed for rearing, under laboratory conditions, Red Palm Weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*), also an artificial diet has been developed, derived of one used in Lepidoptera, with easy components and without elaboration and handling problems. With this methodology and diet has been feasible the development of the species during 5 generations (at  $25\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $65\pm 10\%$  of H.R. and darkness). Under these conditions, the larva required 84.62 days to complete its development and 28.69 the pupa. Adult longevity was 199.4 days for males and 144.3 days for females; these presented a fecundity of 211.1 eggs/♀ and fertility 164.71 larvae/♀. Those values were higher than those that had field adults, feeding in *Phoenix canariensis*, which presented female longevity of 69.8 days, with fecundity and fertility of 158.2 and 67.7 eggs and larvae per female, respectively. The species rearing in laboratory, during 5 generations, had an effect in the size of adults; however, the smallest size of laboratory adults did not affect to its longevity and fecundity that was bigger than the one presented by field adults.

**Key words:** Palm, pest, Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, artificial diet, laboratory rearing.

## REFERENCIAS

- BARRANCO, P.; PEÑA, J. DE LA; CABELLO, T., 1996. El picudo rojo de las palmeras. *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier): nueva plaga en Europa. *Phytoma-España*, **76**: 36-40.
- BOKHARI, U. G.; ABUZUHRA, R., 1992. Diagnostic tests for red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, infested date palm trees. *Arab Journal of Scientific Research*, **10**: 93-104.
- BUTANI, D. K., 1975. Insect pests of fruit crops and their control-11: date palm. *Pesticides*, **9**: 40-42.
- CABELLO, T., 1994. Mantenimiento y estabulación de invertebrados. *Actas del III Congreso Nacional de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio*. Granada: 95-100.
- CABELLO, T., 2006. Population biology and dynamics of Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, in Spain. *Actas I Jornada Internacional sobre el picudo rojo de las palmeras, Rhynchophorus ferrugineus*. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Valencia (en prensa).
- CABELLO, T.; MARTÍN, M. M.; URBANEJA, A., 2006. Situación actual del curculiónido rojo de la palmera *Rhynchophorus ferrugineus* en España. *Espádice*, **9**: 14-17.
- CABELLO, T.; RODRÍGUEZ, H.; VARGAS, P., 1984a. Development, longevity and fecundity of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep.: Noctuidae) reared on eight artificial diets. *Journal of Applied Entomology*, **97**: 494-499.
- CABELLO, T.; RODRÍGUEZ, H.; VARGAS, P., 1984b. Utilización de una dieta artificial simple en la cría de *Heliothis armigera* HB., *Spodoptera littoralis* Boisd. y *Trigonophora meticulosa* Hb. (Lep.: Noctuidae). *Anales Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Serie Agrícola*, **27**: 101-107.
- COX, M. L., 1993. Red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, in Egypt. *FAO Plant protection Bulletin*, **41**: 30-31.
- EPPO, 2000. *Rhynchophorus ferrugineus* occurs in Oman. EPPO Reporting Service. *Reporting Service 2000*, **6**: 2000/96.
- EPPO, 2001. *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) red palm weevil. ([http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert\\_List/Insects/rhynchfe.html](http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/Insects/rhynchfe.html)).
- ESTEBAN-DURAN, J.; YELA, J. L.; BEITIA-CRESPO, F.; JIMÉNEZ-ÁLVAREZ, A., 1998. Biología del curculiónido ferruginoso de las palmeras *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) en laboratorio y campo: ciclo en cautividad, peculiaridades biológicas en su zona de introducción en España y métodos biológicos de detección y posible control (Coleoptera, Curculionidae, Rhynchophorinae). *Bol. San. Veg. Plagas*, **24**: 737-748.
- FERRY, M., GÓMEZ, S., 2002. The Red Palm Weevil in the Mediterranean Area. *Palms*, **46**: 172-178.
- GRENIER, S.; CLERCQ, P. DE, 2003. Comparison of artificially reared natural enemies and their potential for use in biological control. En: LENTEREN, J.C. VAN (Ed.). *Quality control and production of biological control agents: Theory and testing procedures*. CAB Publishing, Wallingford: 115-131.
- HILL, D. S., 1987. *Agricultural insect pests of the tropics and their control*. Cambridge University Press, Cambridge: 746 pp.
- HOWARD, F. W.; MOORE, D.; GIBLIN-DAVIS, R. M.; ABAD, R. G., 2001. *Insects on palms*. CAB Publ. Wallingford: 400 pp.
- JUNTA DE ANDALUCÍA, 1999. *Memoria 1997*. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla: 607 pp.

- JUNTA DE ANDALUCÍA, 2000. *Memoria 1998*. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla: 595 pp.
- KEHAT, M., 1999. Threat to date palms in Israel, Jordan and the Palestinian by the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *Phytoparasitica*, **27**: 107-108.
- KRANZ, J.H.; SCHMUTTERER H.; KOC, W., 1982. *Enfermedades, plagas y malezas de los cultivos subtropicales*. Verlag Paul Parey, Berlin: 722 pp.
- LEPESME, P., 1947. *Les insectes des palmiers*. Lechevalier Éd., Paris: 904 pp.
- LIAO, C. C.; CHEN, C. C., 1997. Primary study the insect pests, hosts and ecology of weevil attacking ornamental palm seedlings. *Bulletin of Taichung District Agricultural Improvement Station*, **57**: 43-48.
- LONGO, S.; TAMBURINO, V., 2005. Gravi infestazioni di punteruolo rosso della palma. *L'Informatore Agrario*, **50**: 73-75.
- MACKAUER, M., 1976. Genetic problems in the production of biological control agents. *Annual Review of Entomology*, **21**: 369-385.
- MARTÍN, M. M.; CABELLO, T., 2005. *Biología y ecología del curculiónido rojo de la palmera, Rhynchophorus ferrugineus (Olivier, 1790) (Coleoptera: Dryophthoridae)*. Universidad de Almería. Almería: 202 pp.
- MARTÍN, M. M.; URBANEJA, A.; CABELLO, T., 2005. El picudo rojo de las palmeras, *Rhynchophorus ferrugineus* (Col.: Dryophthoridae). *Agraria*, **4**: 23-26.
- PÉREZ-FARINÓS, G. M., 2003. *Biología y control de Aubeonymus mariaefranciscas Roudier (Col.: Curculionidae), plaga de la remolacha azucarera*. Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral. Madrid: 166 pp.
- PETERS, T. M.; BARBOSA, P., 1977. Influence of population density on size, fecundity and developmental rate of insects in culture. *Annual Review Entomology*, **22**: 431-450.
- RAHALKAR, G. W.; HARWALKAR, M. R.; RANANAVARE, H. D., 1972. Development of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier, on sugarcane. *Indian Journal of Entomology*, **34**: 213-215.
- RAHALKAR, G. W.; HARWALKAR, M. R.; RANANAVARE, H. O., 1975. Laboratory studies on sterilization of the male red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier. *International Atomic Energy Agency Food and Agriculture*, 261-267.
- RAHALKAR, G. W.; TAMHANKAR, A. J.; SHANTARAM, K., 1978. An artificial diet for rearing red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier. *Journal of Plantation Crops*, **6**: 61-64.
- RAHALKAR, G. W.; HARWALKAR, M. R.; RANANAVARE, H. D.; TAMHANKAR, A. J.; SHANTARAM, K., 1985. *Rhynchophorus ferrugineus*. En: SINGH, P.; MOORE, R.F. (Eds.) *Handbook of insect rearing*. Elsevier. Amsterdam: 279-286.
- RANANAVARE, H. D.; SHANTARAM, K.; HARWALKAR, M. R.; RAHALKAR, G. W., 1975. Method for the laboratory rearing of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. *Journal of Plantation Crops*, **3**: 65-67.
- SALAMA, H. S.; ABDEL-RAZEK, A. S., 2002. Development of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), (Coleoptera, Curculionidae) on natural and synthetic diets. *Anzeiger für Schädlingkunde*, **75**: 137-139.
- SPSS, 2003. *SPSS base 12.0 manual del usuario*. SPSS Inc. Chicago: 754 pp.
- VIADO, G. B.; BIGORNIA, E., 1949. A biological study of the asiatic palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), (Curculionidae, Coleoptera). *The Philippine Agriculturist*, **33**: 1-27.
- WAAGE, J. K.; CARL, K. P.; MILLS, N. J.; GREATHEAD, D. J., 1985. Rearing entomophagous insects. En: SINGH, P.; MOORE, R. F., (Eds.), *Handbook of insect rearing*. Elsevier. Amsterdam: 45-48.
- WATTANAPONGSIRI, A., 1966. A revision of the genera *Rhynchophorus* and *Dynamis* (Coleoptera: Curculionidae). *Department of Agriculture Science Bulletin* (Bangkok, Thailand), **1**: 328 pp.

(Recepción: 19 mayo 2006)

(Aceptación: 12 julio 2006)





## Comunicação

### Aspectos biológicos de *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) (Homoptera: Aphididae) em dois genótipos de couve

S. A. DE BORTOLI

O objetivo do presente trabalho foi avaliar alguns aspectos biológicos do pulgão *Brevicoryne brassicae* em dois genótipos de couve, *Brassica oleracea* var. *acephala*, procurando-se detectar possível fonte de resistência por antibiose. Os genótipos avaliados foram 'Manteiga 916' e 'Roxa 919', utilizando-se 60 (sessenta) fêmeas por cultivar, com as quais foram determinados: o número de descendentes, o período pré-reprodutivo, o período reprodutivo e o período de vida de ninfa a adulto. Pelos resultados obtidos constatou-se o efeito negativo do genótipo 'Roxa 919' no desenvolvimento de *B. brassicae*, o que evidencia resistência do tipo antibiose no genótipo em relação ao 'Manteiga 916'.

S. A. DE BORTOLI. Laboratório de Biologia e Criação de Insetos, Departamento de Fitosanidade/FCAV/UNESP, Via de Acesso Prof. Dr. Paulo Donato Castellane, s/no. CEP: 14884-960 Jaboticabal – São Paulo – Brasil  
E-mail: bortoli@fcav.unesp.br

**Palavras chave:** aspectos biológicos, couve, genótipos, *Brevicoryne brassicae*.

Várias espécies de insetos atacam frequentemente a couve, destacando-se duas de pulgões, *Brevicoryne brassicae* e *Myzus persicae*, sendo que o primeiro, denominado pulgão das brássicas é cosmopolita (VASICEK *et al.*, 1998) e é, normalmente, de maior ocorrência nas condições de Jaboticabal, SP, Brasil, causando, não raras vezes, prejuízos significativos devido à intensa e contínua retirada de seiva das plantas, sendo considerado no Brasil praga-chave da cultura (SALGADO, 1983). Tal situação faz com que o cultivo da couve normalmente necessite do uso intensivo de inseticidas, muitas vezes de largo espectro e alta toxicidade, fato este que pode causar problemas aos produtores-aplicadores, como também aos consumidores (LARA *et al.*, 1979).

Devido à necessidade de se obter outros métodos de controle, com o objetivo de evi-

tar os efeitos colaterais indesejáveis do uso exclusivo e sistemático do controle químico, trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de avaliar o comportamento de diferentes genótipos em relação ao ataque de pragas, procurando-se, assim, obter cultivares menos suscetíveis aos afídeos.

Nesse sentido, tem sido constatada a ocorrência de diferentes níveis de resistência de genótipos de *Brassica oleracea* var. *acephala* ao pulgão *B. brassicae* (THOMPSON, 1963; LA ROSSA *et al.*, 2005). Através de processos seletivos, tem-se obtido genótipos com e sem cera cuticular nas folhas, e observado que plantas sem cera não são colonizadas pelo afídeo, enquanto que em folhas com camada cerosa o inseto consegue formar colônias bastante populosas.

Diferenças significativas na população do inseto têm sido obtidas em diferentes varie-

dades comerciais de couve, sugerindo que um dos fatores determinantes da preferência seria a coloração das folhas; as variedades americanas de cor vermelha favorecem o estabelecimento e a sobrevivência do pulgão (RADCLIFFE & CHAPMAN, 1966).

As cultivares de couve 'Manteiga de Ribeirão Pires 2446', 'Manteiga de Ribeirão Pires 2620' e 'Manteiga 1811' são menos preferidas por *B. brassicae*, em condições de campo, enquanto que, em laboratório, destacam-se as cultivares 'Roxa', 'Manteiga Tupi' e 'Manteiga de Jundiá', sendo considerada a 'Roxa' e a 'Manteiga Tupi' como as mais promissoras. A variedade 'Crespa 918' é apontada como a mais preferida, em ambas as situações (LARA *et al.*, 1978).

O objetivo desse trabalho foi avaliar alguns aspectos biológicos do pulgão *B. brassicae* em dois genótipos de couve, *Brassica oleracea* var. *acephala*, procurando-se assim detectar possível fonte de resistência por antibiose.

Para tanto, em área experimental do Departamento de Fitossanidade da FCAV-UNESP, Jaboticabal, SP, em solo do tipo Latossolo Vermelho-Escuro fase arenosa, as cultivares de couve 'Roxa 919' e 'Manteiga 916' foram cultivadas, seguindo-se as recomendações normalmente empregadas para a cultura, com exceção ao tratamento fitossanitário (as pragas, quando necessário, foram eliminadas manualmente). O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com 2 (dois) tratamentos (genótipos) e 30 repetições, sendo cada uma delas representada por duas fêmeas de *B. brassi-*

*cae*. Os dados foram obtidos em 5 plantas de cada genótipo, sendo 12 fêmeas em cada uma delas confinadas nas terceiras e/ou quartas folhas, a contar do ápice da planta. Portanto, 60 fêmeas (por genótipo) recém emergidas foram individualizadas em gaiolas plásticas, tipo "plexiglass", e acompanhadas em seus desenvolvimentos através de observações diárias, determinando-se os seguintes parâmetros biológicos: número total de descendentes, período pré-reprodutivo, período reprodutivo e período total de vida (ninfã + adulto).

Os dados obtidos foram analisados pelo teste F, sendo que as médias encontram-se sumarizadas na Tabela 1. Com relação ao número médio de descendentes por fêmea, verificou-se que no genótipo 'Roxa 919' o pulgão apresentou menor número de descendentes quando comparado ao 'Manteiga 916', evidenciando claro efeito negativo na biologia do afídeo (antibiose), fato este que dá ao referido material o caráter resistência, sendo que resultados semelhantes já foram obtidos em outros genótipos, alguns também do grupo Manteiga (LARA *et al.*, 1979). Quanto ao período pré-reprodutivo, período reprodutivo e período total de vida do inseto, nota-se que no genótipo 'Manteiga 916', o pulgão teve os referidos parâmetros prolongados, em relação ao 'Roxa 919', resultados estes que mais se aproximam dos dados normais para a espécie, mostrando que no material com característica de resistência ('Roxa 919') ocorre redução nos parâmetros estudados, além de reduzir significativamente o número de descendentes.

Tabela 1. Número descendentes por fêmea, período pré-reprodutivo (dias), período reprodutivo (dias) e período de vida (ninfã + adulto) (dias) de *Brevicoryne brassicae* nos genótipos de couve 'Manteiga 916' e 'Roxa 919'.

PARÂMETROS/GENÓTIPOS	'MANTEIGA 916'	'ROXA 919'
Número de descendentes	40,57 ± 5,93 a	24,37 ± 2,21 b
Período pré-reprodutivo	5,80 ± 0,64 a	3,13 ± 0,38 b
Período reprodutivo	10,03 ± 0,70 a	8,43 ± 0,58 b
Período de vida (ninfã + adulto)	15,83 ± 1,43 a	11,57 ± 1,21 b

Médias seguidas por letras diferentes, nas linhas, diferem estatisticamente entre si.

Assim, pelos resultados obtidos nota-se o efeito negativo do genótipo 'Roxa 919' no desenvolvimento de *B. brassicae*, o que evi-

dencia resistência por antibiose do genótipo em relação ao 'Manteiga 916'.

#### RESUMEN

DE BORTOLI, S.A., 2006. Aspectos biológicos de *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae) en dos genotipos de col berza. *Bol. San. Veg. Plagas*, **32**: 643-646.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar algunos aspectos biológicos del pulgón de la col *Brevicoryne brassicae* en dos genotipos de col berza, *Brassica oleracea* var. *acephala*, para detectar la posible fuente de resistencia por antibiose. Los genotipos evaluados fueron 'Manteiga 916' y 'Roxa 919'. se utilizaron 60 (sesenta) hembras por cultivar, en cada cultivar fueron determinados: el número de descendientes, el período pre-reproductivo, el período reproductivo y el período de vida de ninfa a adulto. Los resultados obtenidos constataron un efecto negativo del genotipo 'Roxa 919' sobre el desarrollo de *B. brassicae*. lo que comprueba resistencia del tipo antibiose sobre el genotipo con relación al 'Manteiga 916'.

**Palabras clave:** aspectos biológicos, col berza, genotipos, *Brevicoryne brassicae*.

#### ABSTRACT

DE BORTOLI, S.A., 2006. Biological aspects of *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae) feeding on two kale genotypes. *Bol. San. Veg. Plagas*, **32**: 643-646.

This work was carried out to evaluate some biological aspects of *Brevicoryne brassicae* with the objective to check antibiose, feeding on two *Brassica oleracea* var. *acephala* genotypes. 'Manteiga 916' and 'Roxa 919'. It was raised 60 females per genotype getting the number of descendants, pre-reproductive period, reproductive period and the length of the nymph and adult period. By the results it was possible to conclude: there is a negative effect of 'Roxa' genotype in aphid development, showing the presence of antibiose in that material.

**Key words:** biological aspects, kale, genotypes, *Brevicoryne brassicae*.

#### REFERÊNCIAS

- LARA, F. M.; COELHO, A.; MAYOR JR., J., 1979. Resistência de variedades de couve à *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758). II. Antibiose. *Anais da Sociedade Entomológica Brasil*, **8** (2): 217-223.
- LARA, F. M.; MAYOR JR., J.; COELHO, A.; FORNASIERI, J. B., 1978. Resistência de variedades de couve à *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758). I. Preferência em condições de campo e laboratório. *Anais da Sociedade Entomológica Brasil*, **7** (2): 175-182.
- LA ROSSA, F.; VASICEK, A.; LOPEZ, M.; MENDY, M.; PAGLIONI, A., 2005. Biología y demografía de *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae) sobre cuatro variedades de *Brassica oleracea* L. en condiciones de laboratorio (II). *RIA*, **34** (3): 105-114.
- RADCLIFFE, B.; CHAPMAN, K. R., 1966. Plant resistance to insect attack in commercial cabbage varieties. *Journal of Economic Entomology*, **59** (1): 116-120.
- SALGADO, L. O., 1983. Pragas das brássicas, características e métodos de controle. *Informe Agropecuário*, **9**: 43-47.
- THOMPSON, K. F., 1963. Resistance to the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) in brassica plants. *Nature*, **198**(4876): 209.
- VASICEK, A.; LA ROSSA, F.; RAMOS, S.; NORIEGA, A., 1998. Efecto de la temperatura sobre el "pulgón del repollo" (*Brevicoryne brassicae* L.) (Homoptera-Aphidoidea). *Revista de la Facultad de Agronomía UBA*, **18** (1-2): 99-103.

(Recepción: 23 mayo 2006)

(Aceptación: 20 noviembre 2006)



## Aspectos biológicos de *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae) em relação ao estado nutricional de *Brassica oleracea* L. var. *acephala*

S. A. DE BORTOLI, M. C. FERNANDES, N. M. M. S. DE ALBERGARIA, H. O. S. DÓRIA

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar os aspectos biológicos de *Brevicoryne brassicae* (L.) em relação ao estado nutricional das plantas de couve, visando a obtenção de informações referentes ao manejo pragas. O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação a  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ , utilizando-se vasos de Leonard para plantio das mudas. Os tratamentos foram baseados nas variações da relação nitrato/amônia: 0/0, 100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100 e testemunha. De acordo com os resultados, pode-se concluir que: plantas com relação nitrato/amônia equilibrada possuem tendência em favorecer o desenvolvimento e reprodução do afídeo da couve; altos níveis de amônia são prejudiciais ao desenvolvimento das plantas de couve, tornando-as alimento não favorável ao inseto; manipulando a relação nitrato/amônia da planta hospedeira, pode-se causar alterações físicas e metabólicas refletindo em alterações biológicas e comportamentais no inseto, isto é, induzir menor suscetibilidade ou tolerância das plantas às injúrias.

S. A. DE BORTOLI, Dept. de Fitossanidade, Fac. Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n. 14884-900, Jaboticabal, SP. E-mail: bortoli@fcav.unesp.br

M. C. FERNANDES, Ex-Aluno do Doutorado do Dept. de Biologia, Fac. Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP.

N. M. M. S. DE ALBERGARIA, Ex-Aluno do Doutorado do Dept. de Fitossanidade, Fac. Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP.

H. O. S. DÓRIA, Ex-Aluna do Doutorado do Dept. de Biologia, Fac. Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP.

**Palavras-chave:** insecta, pulgão da couve, nitrogênio, interação inseto-planta.

### INTRODUÇÃO

Entre as brássicas, a couve é uma das hortaliças mais populares, sendo produzida em pequenas propriedades, nos “cinturões verdes” de grandes centros urbanos e também em hortas domésticas. Dentre as principais pragas da couve pode-se citar *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae); este inseto vive em grandes colônias na face superior das folhas de couve causando enrolamento das folhas pela

sucção contínua de seiva, destacando-se como importante transmissor de viroses (GALLO *et al.*, 2002).

O mercado consumidor de produtos hortícolas exige produtos de qualidade com boa aparência externa e sem resíduos. Assim, para reduzir a aplicação de produtos fitossanitários proporcionando vantagens econômicas e ecológicas, alguns pesquisadores têm explorado as defesas químicas da própria planta, tentando induzir menor suscetibilidade.

SINGH & AGARAWALL (1983) apresentaram diversas citações sobre a influência da adubação mineral na incidência de diferentes espécies de pragas em diferentes culturas na Índia. Esses autores relataram que em 74 % dos experimentos realizados com nitrogênio foram observados aumentos populacionais das pragas com aumento da dose de nitrogênio. COSTELLO (1994) observou que duas aplicações dos fertilizantes foliares Mixt I e Alpinest, reduziu a população de *B. brassicae* em 50%.

De acordo com o trabalho de VAVRINA *et al.* (1993), onde diferentes fontes de nitrogênio foram testadas em couve chinesa; com aplicação, em pré-plantio, de nitrato de cálcio, nitrato de amônio, uréia, solução de nitrato de uréia-amônio (Uran) e solução de uréia-cálcio (Nitrato-Plus), obteve-se plantas com cabeças grandes, mas com alta incidência de pragas.

PETIT *et al.* (1994) estudaram os efeitos da redução da concentração de nitrogênio em solução hidropônica sobre o crescimento da população de *Aphis gossypii*, em pepino, e *Myzus persicae* em pimentão. Através das variações das concentrações de nitrogênio de 90 a 175, 175 a 225 ppm de N na solução, ficou constatado que a população de *Aphis gossypii* foi significativamente reduzida na concentração de 90 a 175 ppm de N. Observaram também alta fecundidade dos afídeos nas concentrações de 175 a 225 ppm de N.

ZAGO *et al.* (1997) analisaram a influência de seis diferentes combinações de adubação de esterco bovino com uréia sobre a população de *B. brassicae* em couve manteiga, e verificaram que o tratamento que proporcionou maior densidade de pulgões foi o de 20 ton. de esterco + 1 ton. de uréia/ha.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar alguns aspectos biológicos do pulgão *Brevicoryne brassicae*, em função de diferentes níveis de nitrogênio na cultura da couve.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação climatizada (temperatura de 25 ±

3°C, umidade relativa de 70 ± 10% e fotofase de 12 horas) do Departamento de Fitossanidade, e as análises químicas das plantas foram realizadas no Laboratório de Química do Departamento de Tecnologia, ambos pertencentes à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal. A criação estoque de *B. brassicae* teve início a partir de coletas em plantas de couve manteiga cultivadas em campo. Os insetos foram mantidos em plantas de couve da variedade *acephala* cultivadas em vasos de cerâmica (5 L de capacidade) em casa-de-vegetação. Para a montagem do experimento foram escolhidos vasos de Leonard (VICENT, 1970), constituídos por garrafas de vidro com o fundo cortado e vidros de compota como suporte e recipiente da solução nutritiva. No “bico” das garrafas que ficavam invertidas, foi presa uma tela com abraçadeira de plástico, visando a condução da solução por capilaridade até o substrato e sustentação.

O substrato foi composto de areia fina lavada em água corrente por 5 vezes; após lavagem foi adicionado solução de HCL 5% e deixado em repouso por 12 horas. Lavou-se novamente com água para a retirada de cloreto, sempre controlando através da reação química com nitrato de prata 0,1%, e por último, levado em estufa à 300°C por 24 horas para secagem e eliminação do restante de microorganismos completando assim, o processo de esterilização de substrato.

Os tratamentos (soluções nutritivas) foram baseados nas variações da relação nitrato/amônia (0/0, 100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100 e testemunha – solução nutritiva recomendada para a cultura). As soluções foram colocadas nos vidros suporte a um volume de 300 ml, sendo que estas foram trocadas semanalmente nas duas primeiras semanas e diariamente após esse período. Foram avaliadas duas gerações de *B. brassicae* onde determinou-se os seguintes parâmetros biológicos: capacidade reprodutiva, desenvolvimento pós-embrionário e longevidade das fêmeas. Para avaliação desses parâmetros, foram usadas caixas de “pexiglass” como gaiolas, as quais foram presas através

Tabela 1. Análises de Regressão Polinomial dos aspectos biológicos na Geração I de *Brevicoryne brassicae*, para os tratamentos com relação Nitrato/Amônia (100/0; 75/25; 50/50; 25/75; 0/100).

Aspectos Biológicos	Equações de Regressão	Teste F			R <sup>2</sup>
		RL <sup>1</sup>	RQ <sup>2</sup>	RC <sup>3</sup>	
Ínstar 1	$y = 2,09$	3,24 <sup>NS</sup>	0,40 <sup>NS</sup>	0,23 <sup>NS</sup>	-
Ínstar 2	$y = 2,1 - 0,0068x$	6,05*	0,24 <sup>NS</sup>	0,47 <sup>NS</sup>	0,94
Ínstar 3	$y = 1,2717$	0,24 <sup>NS</sup>	0,79 <sup>NS</sup>	0,20 <sup>NS</sup>	-
Ínstar 4	$y = 1,5 + 0,1147 - 0,0046x + 0,00003493x^2$	0,15 <sup>NS</sup>	0,24 <sup>NS</sup>	4,82*	1,00
Longevidade	$y = 10,5469$	0,26 <sup>NS</sup>	2,05 <sup>NS</sup>	1,65 <sup>NS</sup>	-
Desc./Dia	$y = 0,282 + 0,1897x - 0,001874x^2$	0,01 <sup>NS</sup>	5,65*	0,56 <sup>NS</sup>	0,95
Total Desc.	$y = 4,9078 + 0,3403x - 0,003496x^2$	0,12 <sup>NS</sup>	14,69**	0,21 <sup>NS</sup>	0,91
Tempo Total	$y = 13,76$	0,52 <sup>NS</sup>	3,54 <sup>NS</sup>	1,52 <sup>NS</sup>	-

<sup>1</sup>Regressão Linear; <sup>2</sup>Regressão Quadrática; <sup>3</sup>Regressão Cúbica.

de “clips” de metal na superfície inferior das folhas de couve, conforme metodologia utilizada por CABETTE (1989).

O experimento iniciou-se quando as plantas atingiram aproximadamente 30 cm de altura e 4 a 5 folhas. Para isso foram utilizados pulgões de até um dia de idade, trazidos da criação estoque, colocando-se um inseto por gaiola, sendo presas quatro gaiolas distribuídas no terço médio das plantas/vaso; foram utilizados 5 vasos por tratamento, totalizando 4 gaiolas por vaso. Utilizou-se para análise e interpretação dos resultados, o delineamento inteiramente casualizado, sendo que para os dados biológicos do inseto foi aplicada regressão polinomial.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No tratamento cuja relação nitrato/amônia foi de 0/0, as plantas de couve não conseguiram desenvolver-se devido a ausência total da fonte de nitrogênio.

### Aspectos biológicos - Geração I

Analisando os dados da Geração I, observou-se que o 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> ínstars não apresentaram diferenças estatísticas significativas, sendo 2,09 dias e 1,27 dias a duração média destes estádios, respectivamente (Tabela 1).

O 2<sup>o</sup> ínstar apresentou valores significativos, pode-se observar que o tratamento

100/0 foi o que demonstrou aumentar a duração desta fase em relação aos demais, como pode ser observado na Figura 1. No 4<sup>o</sup> ínstar, houve diferença observando-se no tratamento 75/25 maior duração desse período, um decréscimo no tratamento 50/50 e novo aumento no tratamento 25/75 (Figura 2).

Em relação à longevidade das fêmeas de *B. brassicae* não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, sendo a longevidade média de 10,55 dias, estando esse valor dentro do intervalo de variação obtido por SATAR *et al.* (2005) e bem inferior ao citado por LA ROSSA *et al.* (2005). Quando se analisou o número médio de descendentes por dia, o tratamento 50/50 destacou-se em relação aos demais, sendo que os tratamentos 100/0 e 0/100 não favoreceram a capacidade reprodutiva dos pulgões quando comparados aos tratamentos com relação nitrato/amônia equilibrada (Figura 3).

O mesmo ocorreu com o número total de descendentes, ou seja, o tratamento 50/50 proporcionou maior capacidade reprodutiva, concluindo que o balanceamento dos nutrientes no hospedeiro favorece a reprodução do inseto (Figura 4), resultado esse contrastante ao relatado por PETIT *et al.* (1994). A longevidade de *B. brassicae* diferiu em função dos tratamentos, sendo 13,76 dias o seu valor médio. Analisando-se os dados sem considerar o resultado calculado pela estatística, pode-se afirmar que nos tra-

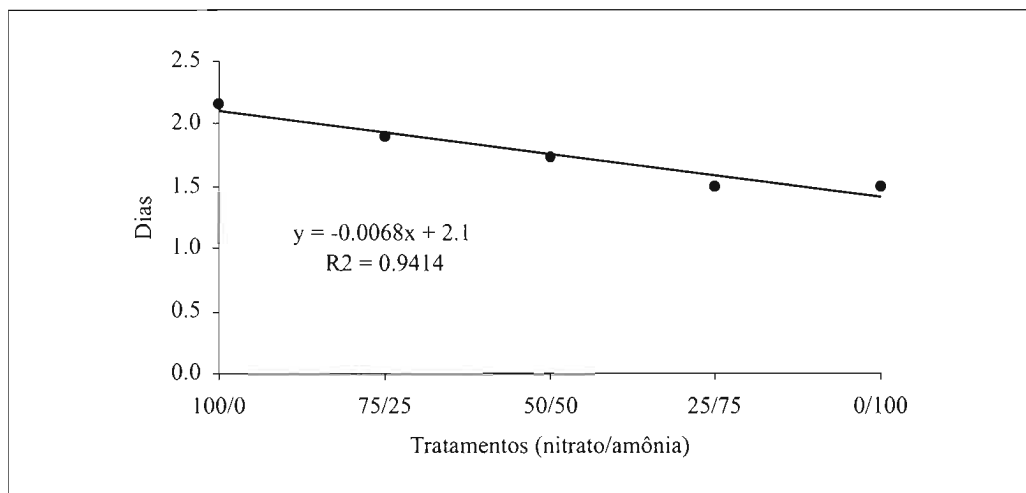


Figura 1. Curva de regressão polinomial obtida com a duração do 2º ínstar de *Brevicoryne brassicae* nos diferentes tratamentos.

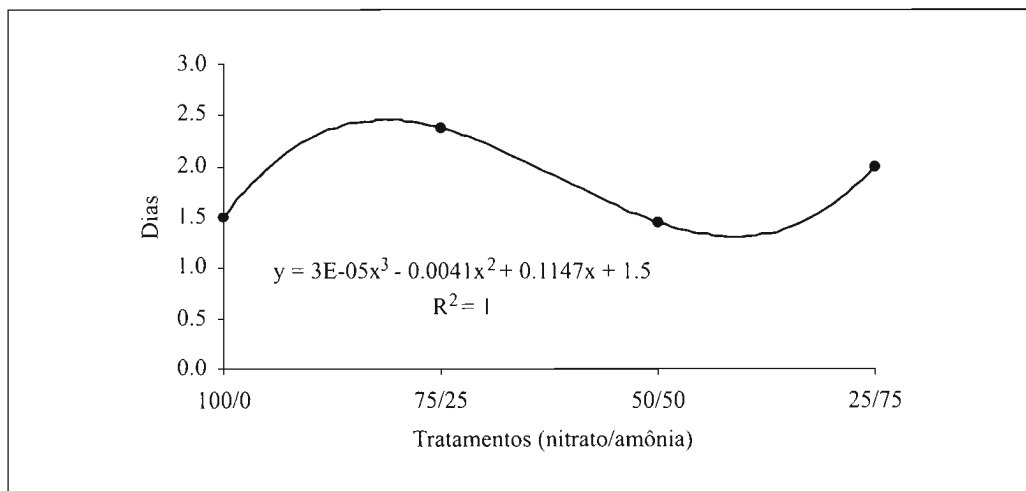


Figura 2. Curva de regressão polinomial obtida com a duração do 4º ínstar de *Brevicoryne brassicae* nos diferentes tratamentos.

tamentos 100/0 e testemunha, os pulgões tiveram uma tendência em sobreviver por mais tempo, como também mostraram-se como indivíduos mais desenvolvidos em relação a tamanho de corpo e coloração.

De acordo com os resultados obtidos na Geração I, pode-se considerar que o pulgão da

couve apresenta melhor desenvolvimento e reprodução quando as plantas de couve recebem nutrição com relação nitrato/amônia equilibrada. Os tratamentos que recebem nutrição com excesso de amônia causam desequilíbrios na dinâmica da população dos insetos em estudo, afetando, principalmente, a reprodução.



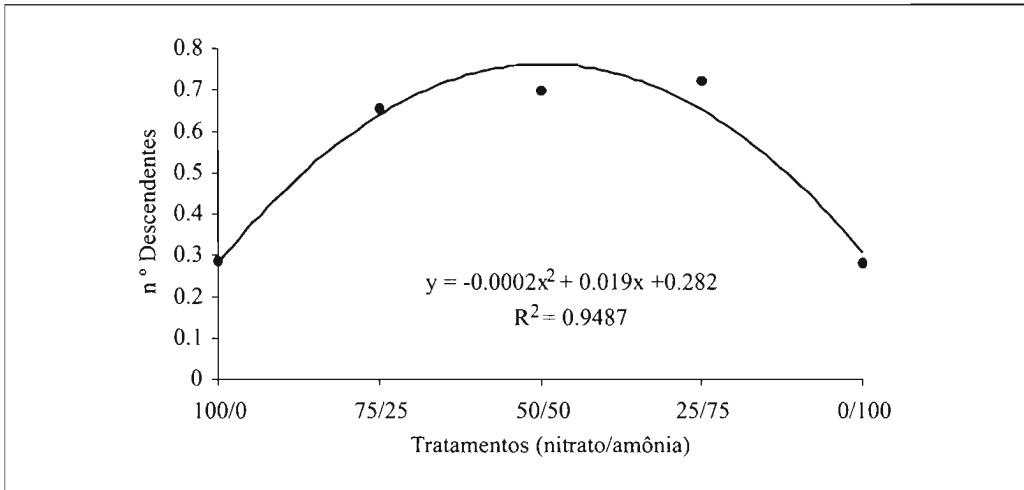


Figura 3. Curva de regressão polinomial obtida com o número médio de descendentes de *Brevicoryne brassicae* no período de 24 horas na Geração I.

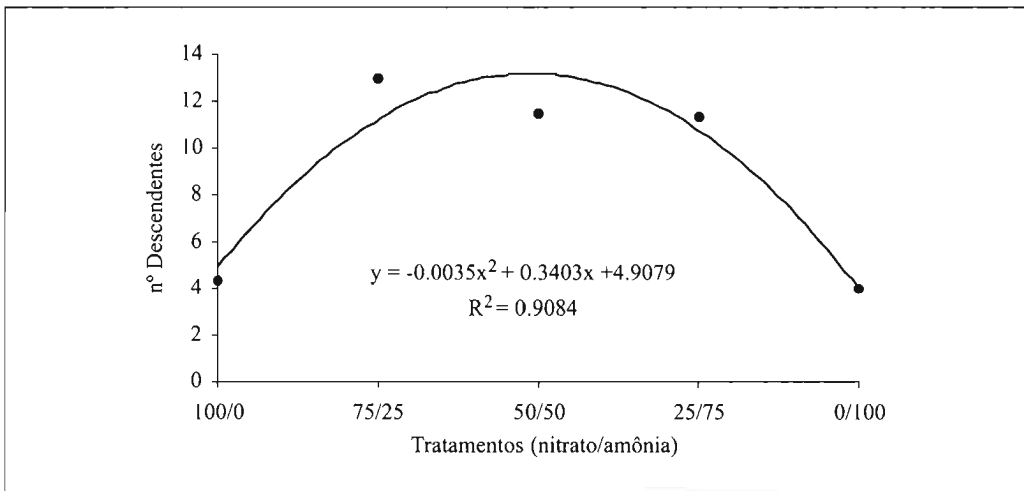


Figura 4. Curva de regressão polinomial obtida com o número total de descendentes de *Brevicoryne brassicae* nos diferentes tratamentos na Geração

Quando se comparou os tratamentos extremos (100/0 e 0/100), observou-se que o nitrato, fonte de nitrogênio absorvida pela planta, quando fornecido em altas doses (100/0), favorece o desenvolvimento vegetativo da planta, a capacidade reprodutiva e a qualidade de vida dos insetos que a utilizam

como fonte de alimento. No entanto, quando foi fornecida uma alta quantidade de amônia (0/100), que é outra fonte de nitrogênio (tóxica e não absorvida) para as plantas, essa quantidade de amônia prejudicou desenvolvimento vegetativo da planta, diminuindo sua área foliar, provocando queimaduras nos

bordos das folhas e, conseqüentemente, desfavorecendo uma alimentação de boa qualidade para o inseto, reduzindo a sobrevivência.

### Aspectos biológicos - Geração II

Para as avaliações dos aspectos biológicos do pulgão da couve na Geração II, foram utilizados os descendentes com até 1 dia de idade provenientes da Geração I. Na instalação do experimento da Geração II não foi possível a realização dos tratamentos com as relações 0/0 e 0/100 devido ao baixo índice de reprodução e alto índice de mortalidade dos descendentes na Geração I.

De acordo com os resultados de regressão polinomial, não houve diferença significativa entre os tratamentos em para todos os ínstar. A duração média de cada ínstar foi de 1,86; 1,64; 1,62; 1,86 dias, do 1º ao 4º ínstar, respectivamente. Não houve efeito dos tratamentos sobre a longevidade das fêmeas

(13,57 dias, em média) e sobre o número médio de descendentes por dia (0,64 descendentes, em média). O número total de descendentes foi maior no tratamento 75/25, sendo que 12,27 dias foi a da longevidade média dos pulgões.

Assim, na geração II apenas o número de descendentes apresentou diferença estatística para as relações nitrato/amônia avaliadas, mostrando por meio deste parâmetro biológico que altos níveis de nitrogênio favorecem a capacidade reprodutiva dos afídeos, situação esta também relatada no trabalho de PETIT *et al.* (1994).

### AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos Roberto Souza e Silva da Universidade Federal de São Carlos – UFS-Car, pela identificação do pulgão utilizado no trabalho.

### RESUMEN

DE BORTOLI S. A., M. C. FERNANDES, N. M. M. S. DE ALBERGARIA, H. O. S. DÓRIA. 2006. Aspectos biológicos de *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae) en relación al estado nutricional de *Brassica oleracea* L. var. *acephala*. *Bol. San. Veg. Plagas*, **32**: 647-653.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal evaluar los aspectos biológicos de *Brevicoryne brassicae* (L.) en relación al estado nutricional de las plantas de col, buscando la obtención de informaciones referentes al manejo de plagas. El experimento fue realizado en un invernadero a  $25 \pm 3$  °C, utilizándose recipientes de Leonard para plantío de las mudas. Los tratamientos se basaron en las variaciones de la relación nitrato/amonio: 0/0, 100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100 y el testigo. De acuerdo con los resultados encontrados se puede concluir que: plantas con relación equilibrada de nitrato/amonio poseen tendencia a favorecer el desarrollo y reproducción del áfido de la col; los altos niveles de amonio son perjudiciales al desarrollo de las plantas de col, tornándolas alimento no favorable para el insecto. Con la manipulación de la relación nitrato/amonio de la planta hospedera, se pueden causar cambios físicos y metabólicos que se reflejan en alteraciones biológicas y de comportamiento en el insecto, esto produce menor susceptibilidad o tolerancia de las plantas a los daños.

**Palabras clave:** Insecta, Pulgón de la col, nitrógeno, interacción insecto-planta.

### ABSTRACT

DE BORTOLI S. A., M. C. FERNANDES, N. M. M. S. DE ALBERGARIA, H. O. S. DÓRIA. 2006. Biological aspects of *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae) in relation to *Brassica oleracea* L. var. *acephala* nutrition. *Bol. San. Veg. Plagas*, **32**: 647-653.

This work was aimed to evaluate the biological aspects of the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.) in relation to plant nutrition, to obtain information about pest management. The experiment was conducted in a greenhouse with environmental control.

The pots were Leonard's type made of glass bottles. According to the results it was concluded that: plants with balanced levels of nitrogen (nitrate/ammonia) show tendency to increase the development and reproduction of cabbage aphid; high levels of ammonia are deleterious to cabbage development, plants treated with high levels of ammonia are not beneficial to the insects; the manipulation of the nitrate/ammonia rate could cause physical disturbances on the host plant. This situation could lead to biological and behavioral disturbances on the insects and induced less susceptibility or tolerance of plants to injury.

**Key words:** insecta, nitrogen, cabbage aphid, insect-plant interaction.

#### REFERÊNCIAS

- CABETTE, H. S. R., 1989. Capacidade reprodutiva e sobrevivência do pulgão do sorgo granífero (*Sorghum bicolor*), *Schizaphis graminum* (Rondani, 1952) (Homoptera: Aphididae) no campo e no laboratório. 1989. 112p. Dissertação (Mestrado em Entomologia), FFCLRP/USP, Ribeirão Preto, SP, 1989.
- COSTELLO, M. J., 1994. Broccoli growth, yield and level of aphid infestation in leguminous living mulches. *Biological Agriculture & Horticulture*, **10**(3): 207-222.
- GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R. P. L., BAPTISTA, G. C. DE, BERTI FILHO, E., PARRA, J. R. P., ZUCCHI, R. A., ALVES, S. B., VENDRAMIM, J. D., MARCHINI, L. C., LOPES, J. R. S., OMOTO, C., 2002. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba: FEALQ, 920p.
- LA ROSSA, F., VASICEK, A., LÓPEZ, M., MENDY, A., 2005. Biología y demografía de *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae) sobre cuatro variedades de *Brassica oleracea* L. en condiciones de laboratorio (II). *RIA*, **34**(3):105-114.
- PETIT, F. L., LOADER, C. A., SCHON, M. K., 1994. Reduction of nitrogen concentration in the hydroponic solution on population growth rate of the aphids (Homoptera: Aphididae) *Aphis gossypii* on cucumber and *Myzus persicae* on pepper. *Environmental Entomology*, **23**(4):930-936.
- SATAR, S., KERSTING, U., ULUSOY, M. R., 2005. Temperature dependent, life history traits of *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hom., Aphididae) on white cabbage. *Turk J. Agric. Far.*, **29**:341-346.
- SINGH, R., AGARWAL, R. A., 1983. Fertilizers and pest incidence in India. *Potash Review*, **23**:1-4.
- VAVRINA, C. S., OBREZA, T. A., CORNELL, J., 1993. Response of chinese cabbage to nitrogen rate and source in sequential plantings. *Hortscience*, **28**(12):1164-1165.
- VICENT, J. M., 1970. *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. IBP Hand Book, n.15, Oxford: Blackwell Scientific Publications, 200p.
- ZAGO, V. C. P., RODRIGUEZ, W. C., DA SILVA, M. J. P. R., PERRUSO, J. C., RUMJANEK, N. G., CASSINO, P. C. R., 1997. Influência de diferentes combinações de adubação sobre a população de *B. brassicae* (Homoptera: Aphididae) em couve-manteiga. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, VII. Salvador, BA. Resumos. 1997.

(Recepción: 31 mayo 2006)

(Aceptación: 21 noviembre 2006)



## Larval galleries and pupal chambers of *Huequenía livida* (Germain, 1898) (Coleoptera: Cerambycidae)

P. TURIENZO

Description and photographs of larval galleries, pupal chambers and emergence holes of *H. livida* in *Araucaria araucana* dead branches are present.

P. TURIENZO. Entomología, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 4º Piso, Pabellón II, (CP 1428) Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina. e-mail: paolaturienzo@yahoo.com

**Key words:** Larval biology, Longhorned beetle, *Araucaria*.

### INTRODUCTION

The family Cerambycidae (Coleoptera: Chrysomeloidea) is represented by 845 species in Argentina. The larvae are phytophagous, most of them develop in dead wood but minorities do it in living plants (DI IORIO, 2005). The larval galleries and pupal chambers of this family had received little attention until the classification proposed by DUFFY (1953). More recently, descriptions of larval galleries and pupal chambers had been made in some Neotropical species (MEYER, 1967; NAPP, 1976, 1977; PENTADO-DIAS, 1978, 1979, 1980; DI IORIO, 1993a, 1993b, 1993c, 1995, 1996, 2006).

In 2005, *Huequenía livida* (Germain, 1898) was first recorded with the first known host plant in Argentina, *Araucaria araucana* (Mol.) Koch (TURIENZO, 2005). Turienzo obtained a winter and a summer generation in laboratory and the woods, from which the adults emerged, had kept for this study. The objective of this contribution is to describe and illustrate the larval galleries, pupal chambers and emergence holes of *H. livida* in *Araucaria* dead branches and

contributes with the biology of this Cerambycidae.

### MATERIALS AND METHODS

Reared material obtained from Neuquén: San Martín de los Andes, 10-1-2005, P. Turienzo & O. Di Iorio leg [basal dead branches on living trees] (TURIENZO, 2005). The woods, with the respective traces are in authors' collection, Paola Turienzo, Buenos Aires (PTBA). Photographs of this material had been taken, and the corresponding measurements of pupal chambers (6 examples) and access/exit holes (15 examples) were obtained with a calibre (precision 0.01 mm). The terminology used here is those proposed by DI IORIO (1995).

### RESULTS

The larval galleries are subcorticals, increasing in size when the larvae growth, and filled with compacted frass. In cases of high larval densities, it is not possible to distinguish between individual limits of the larval galleries (Fig. 1). In tiny branches (1 cm diame-



Figure 1. Larval biology of *H. livida* in *A. araucana*: larval tunnels filled with compacted frass, and without individual limits (high larval density).



Figure 2. Pupal chambers in cross-section.

ter), the larvae penetrate in the medullar region where they built the pupal chambers. These are direct and internal (DUFFY, 1953), and derived from a subcortical gallery (DI IORIO, 1995). In cross-section, the pupal chambers measure  $3.93 \pm 0.61$  mm high and  $6.18 \pm 1.21$  mm width (Fig. 2), oriented with the width parallel to the growth rings. In longitudinal

section, the pupal chambers measure  $23.13 \pm 5.64$  mm total length (Fig. 3). Measurements of the access/exit holes were  $3.09 \pm 0.19$  mm high and  $4.73 \pm 0.39$  mm width (Fig. 4). The access/exit holes are horizontal (their width is transversal to the longitudinal axis of the branch). When the larval density is so high, the orientations of the access/exit holes are variable (Fig. 4). The adults build the emergence holes in the bark, located in front of the access/exit holes, and with the same orientation and measurements of this lasts.

## DISCUSSION

MARTINS (2002) include the genus *Huequenía* Cerda, 1986, in the tribe Achysonini.

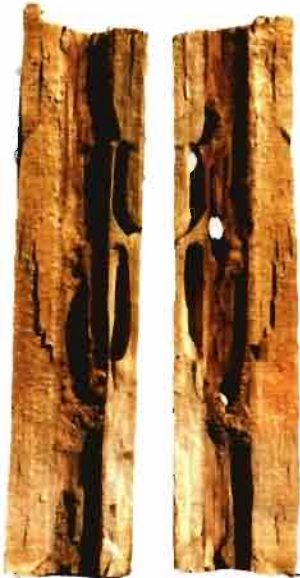


Figure 3. Pupal chambers in longitudinal section.



Figure 4. Access/exit holes.

By the present, only the pupal chambers and larval galleries of one species of the genus *Achryson* were described. Larval galleries of *Achryson surinamum* (L., 1767) are internal (DI IORIO, 1996), and the pupal chambers correspond to the larval habit (DI IORIO, 1995), with the vertical emergence holes build by the adults (DI IORIO, pers. com.). The corresponding larval tunnels, pupal chambers and emergence holes for the genus *Huequenía* are, in consequence, completely different of the type-genus of this tribe. Species in both *Achryson* and *Huequenía* are nocturnal.

With this paper, the author contributes with some characteristics of one genus of this tribe but more studies must be done like describe immature stages to know the possible phylogenetics relations and possible diagnoses like simple keys for users like forest productors.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was doing by the direction of O.R. Di Iorio. The author thanks him for his advice and criticism during the preparation of this manuscript.

## RESUMEN

TURIENZO P. 2006. Galerías larvales y cámaras pupales de *Huequenía livida* (Germain, 1898) (Coleoptera: Cerambycidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, **32**: 655-658.

Se presentan descripciones y fotografías de galerías larvales, cámaras pupales y orificios de emergencia de *H. livida* en ramas secas de *Araucaria araucana*.

**Palabras clave:** Biología larval, Escarabajos longicornios, *Araucaria*.

## REFERENCES

- DI IORIO, O.R. 1993a. Plantas hospedadoras y oviposición de *Dorcacerus barbatus* (Oliv.) (Coleoptera, Cerambycidae) en Argentina. *Revta. bras. Ent.*, **37**(4): 723-729.
- DI IORIO, O.R. 1993b. Cerambycidae (Coleoptera) y otros insectos asociados a *Parkinsonia aculeata* (Leguminosae) en Argentina. *Revta Biol. Trop.*, **41**(3): 463-470.
- DI IORIO, O.R. 1993c. Asociación de *Lochmaeocles sladeni* (Gahan) (Coleoptera: Cerambycidae) con *Enteolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong y *Cathormion polyanthum* (Spreng.) Burk. (Leguminosae), y notas sobre otras Cerambycidae, depredadores y parasitoides. *Rev. Soc. Entomol. Arg.*, **52**: 63-71.
- DI IORIO, O. R. 1995. The genus *Deltosoma* Thomson, 1864 in Argentina: *D. lacordairei* Thomson, 1864 and *D. xerophila* n. sp; with a revision of larval tunnels and pupal chambers in Neotropical Cerambycinae (Coleoptera: Cerambycidae). *G. it. Ent.*, **7**: 203-217.
- DI IORIO, O. R. 1996. Biología de Cerambycidae (Coleoptera) de la Argentina. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 462 p., 233 figs., 243 tablas.
- DI IORIO, O. R. 2005. A field guide of the long horned beetles (Coleoptera: Cerambycidae) from Argentina. Esteban Abadie & Pablo Wagner (Coordinators). Buenos Aires, xiv + 98 p. + 74 plates.
- DI IORIO, O. R. 2006. Tourneutini of Argentina: new records, host plants, and comparison of their larval and adults biologies with those of Prioninae and Trachyderini (Coleoptera: Cerambycidae). *G. it. Ent.*, **11**: 183-234.
- DUFFY, E. A. J. 1953. A monograph of the immature stages of British and imported timber beetles (Cerambycidae). British Museum of Natural History: 1-350.
- MARTINS, U. R. 2002. Tribo Achrysonini. p. 37-144. In: Martins, U.R. (Ed.). 2002. Cerambycidae sul-americanos (Coleoptera). Taxonomia Vol. 4: Subfamilia Cerambycinae. Tribos Erlandiini Aurivillius, 1912. Smodicini Lacordaire, 1869. Achrysonini Lacordaire, 1869. Cerambycini Latreille, 1804 - Cerambycina Latreille, 1804. Sociedade Brasileira de Entomologia. São Paulo, 254 p.
- MEYER, F. R. 1967. Larva, pupa and life history of three species of Ibdionini (Coleoptera: Cerambycinae). *Papéis Avulsos Zool.*, S. Paulo, (**20**): 147-158.
- NAPP, D. S. 1976. Revisão dos gêneros *Compsocerus* Lepelletier & Serville, 1830 e *Paramoecerus* Gounelle, 1910 (Coleoptera: Cerambycidae). *Rev. Bras. Ent.*, **20** (1): 1-64.
- NAPP, D. S. 1977. Revisão do gênero *Unxia* Thomson, 1860 (Coleoptera, Cerambycidae). *Rev. Bras. Ent.*, **20** (3/4): 117-152.

- PENTADO-DIAS, A. M. 1978. Biología e ontogenia de alguns Ibidionini (Coleoptera, Cerambycidae, Cerambycinae). *Rev. Bras. Ent.*, **22**(1): 35-48.
- PENTADO-DIAS, A. M. 1979. Biología e ontogenia de *Neoclytus pusillus* (Lap. & Gory) (Coleoptera, Cerambycidae, Cerambycinae, Clytini). *Rev. Bras. Ent.*, **23**(2): 77-83.
- PENTADO-DIAS, A.M. 1980. Contribuição ao conhecimento da biología e ontogenia de *Trachyderes thoracicus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Cerambycidae). *Rev. Bras. Ent.*, **24** (2): 131-136.
- TURIENZO, P. 2005. Nuevo registro de *Huequenía livida* (Germain, 1901) (Coleoptera: Cerambycidae) en *Araucaria araucana* (Mol.) Koch (Araucariaceae) de la Argentina. *Bol. San. Veg. Plagas*, **31**(4): 517-518.
- (Recepción: 26 septiembre 2006)  
(Aceptación: 3 noviembre 2006)



## Determinación de la capacidad parasitaria de la Microbiota fúngica y de sus extractos acuosos en las semillas del cardo (*Cynara cardunculus* L.)

D. PALMERO, C. IGLESIAS, L. VARÉS, J. SINOBAS (†)

El presente estudio evalúa el efecto que 6 diferentes géneros hongos aislados a partir de semillas de 54 diferentes cultivares de cardo (*Cynara cardunculus* L.) y sus extractos acuosos tienen sobre la germinación y nascencia de las semillas. Se han realizado pruebas de patogenicidad con dos aislados de cada uno de los seis géneros de mayor frecuencia del inventario (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* y *Alternaria*), así como de los extractos producidos tras 3, 7 y 11 días de incubación de los micetos.

Los resultados de las inoculaciones con los micetos muestran efectos negativos sobre los porcentajes de germinación, con reducciones en la germinación que fueron máximas tras las inoculaciones con *Rhizopus stolonifer* (29% de disminución) y *Fusarium verticillioides* (23%). Los porcentajes de emergencia disminuyen tras duplicar la concentración del inóculo, aumentando además drásticamente el número de plántulas dañadas sobre el total de las emergidas. En el significativo caso de la inoculación con *Cladosporium* la duplicación del inóculo disminuyó la germinación hasta en un 31% respecto al testigo.

Las plántulas emergidas tras las inoculaciones con los extractos obtenidos a partir de cultivos líquidos de los hongos ensayados presentaban los mismos síntomas de atrofia y daños sobre raíz y coleóptilo que los descritos para cada hongo. Los extractos acuosos de los géneros estudiados disminuyen también la germinación. Los resultados nos muestran la diferente capacidad parasitaria de cada una de las especies estudiadas apreciándose además diferencias según los diferentes periodos de agitación de los hongos y permiten asegurar que la producción de toxinas está regulada por el hongo, y que no aumenta linealmente con el crecimiento micelial.

D. PALMERO: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) Dirección Técnica de Evaluación de Variedades y Laboratorios, Ctra. de la Coruña Km. 7,5 (28400) Madrid (persona de contacto email: palmero@inia.es)

C. IGLESIAS, L. VARÉS, J. SINOBAS (†): U.D. Genética y Fitopatología. E.U.I.T.A. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria. 28400 Madrid.

**Palabras clave:** *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium verticillioides*, *Rhizopus stolonifer*, metabolitos, toxicidad, patogenicidad, plántulas.

### INTRODUCCIÓN

En su estudio sobre la producción de biomasa en el sur de Europa, TREBBI (1993) estudió, entre otras especies vegetales, la productividad de *Cynara cardunculus*. El

autor obtuvo rendimientos de 69 y 57 toneladas por hectárea de los cultivares B. de España y G. de Roma respectivamente. En otros estudios realizados sobre cardo se recogen diferencias de rendimientos de hasta 7 toneladas por hectárea de biomasa

total en función de año de cosecha (FOTTI *et al.*, 1999).

Estas diferencias pueden, en parte, explicarse por las enfermedades que afectan al cultivo y que tienen un importante efecto sobre el rendimiento final del mismo.

Una de las ventajas del cultivo de *Cynara* son las escasas labores culturales que demanda. Sus bajos requerimientos hídricos y de fertilización hacen que su cultivo sea viable en zonas de baja pluviometría. Los tratamientos fungicidas son, por tanto, costes que no podría soportar este tipo de cultivos. Esto, unido al coste medioambiental de su uso, nos hacen plantearnos la lucha contra las enfermedades desde otras perspectivas.

El presente trabajo pretende, una vez conocida la micoflora presente en las semillas del cardo, averiguar cual es el efecto que los micetos "per se" y los metabolitos exudados tienen sobre la germinación y la nascencia de las semillas, continuando con otro artículo publicado con anterioridad, donde se hacía el inventario de la microbiota fúngica asociada a las semillas de cardo (PALMERO *et al.*, 2005).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Aislados fúngicos

Los hongos estudiados proceden de un inventario fúngico de las semillas de cardo (*Cynara cardunculus* L.), donde se analizaron más de 4400 semillas de 54 cultivares de cardo de distintas procedencias y se identificaron un total de 15 géneros diferentes. (PALMERO *et al.*, 2005).

Tanto en los ensayos de germinación como en los de patogenicidad, se utilizaron semillas procedentes de San Fernando de Henares, proporcionadas por la U.D. de Botánica de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid, conservadas en cámara climática, en sacos de semillas no tratadas, a 4 °C. Los géneros de hongos seleccionados para este estudio fueron *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* y *Alternaria*.

### Método utilizado en el conteo de conidios

Para determinar la concentración del inóculo aplicado a las semillas, se utilizó un hematocitómetro con retículo de 0.200 mm de profundidad por 5 mm<sup>2</sup> de superficie. (Retículo de Malassez. FORTUNA. W-GERMANY®).

### Determinación del poder germinativo de las semillas.

Para la realización de los ensayos de germinación se utilizaron 10 placas de Petri de vidrio de 90 mm de diámetro a modo de cámara húmeda en cada repetición (20 semillas por placa) y ensayos sobre toallas de papel de filtro humedecidote 52 x 42 cm con 50 semillas/toalla y dos repeticiones por cada uno de los cuatro tratamientos ensayados: dos con hipoclorito sódico sin diluir (40 g de Cl activo / l) usando 5 y 10 minutos como tiempo de inmersión, con posterior aclarado con agua del grifo. Dos con diluciones de hipoclorito sódico al 50 % (20 g de Cl activo / l) utilizando los mismos tiempos que para el caso anterior, y el testigo.

Las pruebas de germinación realizadas sobre sustrato se llevaron a cabo en recipientes de plástico con un tamaño de 90x113 mm de boca y 63 mm de profundidad y con orificios de drenaje. El sustrato utilizado fue vermiculita, de granulometría variable entre 0,75 y 8 mm de diámetro, de esta manera se analizaron 8 cajas por cada tratamiento con 25 semillas sembradas en cada caja, comparando el tratamiento de desinfección seleccionado (40 g de Cl activo / l durante 5 min.) con el testigo sin tratar. En este caso se tuvieron en cuenta los porcentajes de plántulas dañadas sobre el total de las germinadas.

Todas las pruebas para la determinación del poder germinativo se llevaron a cabo en cámaras de fotoperiodo y temperatura controlados, incubando las muestras a 25°C y 12 h/día de iluminación durante 8-9 días, tras los cuales se realizaron los conteos. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza unifactorial.

### Obtención de extractos

Para obtener los metabolitos exudados por los patógenos estudiados se añadieron pastillas del cultivo agarizado de unos 2 cm. de diámetro, tomado del borde de la colonia en crecimiento, a matraces Erlenmeyer de 250 ml con medio líquido PD (Patata-Dextrosa) estéril.

Los cultivos líquidos se mantuvieron en agitador orbital a 140 r.p.m. y en oscuridad durante períodos de 3, 7 y 11 días. Transcurrido este tiempo, los cultivos líquidos se filtraron a través de un doble filtro de papel Millipore de tamaño de poro de 0.45 µm. Método como el indicado por MONTROYA *et al.* (2001) y FERNÁNDEZ-CORRAL *et al.* (2002).

### Pruebas de patogenicidad de los micetos y de sus extractos acuosos.

De entre todos los géneros de hongos presentes en las semillas analizadas se seleccionaron los de más frecuencia de aislamiento, los códigos que identifican cada aislado así como su procedencia se presentan en el cuadro 1.

La producción de las masas miceliales y conidios necesarios para inocular las semillas se realizó sobre PDA, incubándolo en cámara climática a 25°C en oscuridad, durante 5-6 días.

Tras el periodo de incubación se añadió a 400 ml de agua destilada el contenido de 2 placas de petri por aislado y se homogeneiza el medio con una batidora.

La aplicación se realizó repartiendo los 400 ml de inóculo sobre 25 semillas colocadas previamente en recipientes de plástico con el sustrato de vermiculita, manteniendo condiciones de fotoperiodo de 2500 lux durante 14h/día con salto térmico de 5°C oscilando entre 25°C (14h) y 20°C (10 h).

Este mismo proceso se repitió 3 veces con cada aislado. Asimismo, se repitieron los ensayos otras tres veces con la densidad de inóculo reducida a la mitad. Las densidades de inóculo resultantes en los distintos preparados se muestran en el cuadro 1.

El conteo y la observación de daños producidos sobre las plántulas emergidas se efectuaron tras un período de incubación de 10 días, realizándose paralelamente en cada uno de los ensayos testigos sin inóculo.

Una vez obtenidos los extractos de los aislados de *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Penicillium*, se aplicaron sobre las semillas mediante el procedimiento anteriormente utilizado en las pruebas de patogenicidad, con la salvedad de que una vez regadas con los metabolitos, y cubiertas por una fina capa de vermiculita, las semillas no se volvían a regar.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los ensayos de desinfección fijaron el mayor porcentaje de germinación media el de las semillas sumergidas durante

Cuadro 1. Códigos, procedencia y densidad de inóculo de las diferentes especies fúngicas ensayadas.

Aislados	Códigos	Lote de procedencia	Localidad / año de cosecha
<i>Penicillium rugulosum</i> Thom.	Pe-1	B-5	Badajoz / 1997
	Pe-2	M-30	Madrid / 1998
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link	Cla-1	B-10	Badajoz / 1998
	Cla-2	M-38	Madrid / 1998
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenberg: Fries) Vuillemin.	Rhi-1	M-39	Madrid / 1998
<i>Fusarium verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg.	Fus-1	M-29	Madrid / 1998
	Fus-2	B-6	Badajoz / 1997
<i>Alternaria alternata</i> (Fries) von Keissler	Al-1	M-14	Madrid / 1997
	Al-2	B-6	Badajoz / 1997
<i>Aspergillus Niger</i> van Tieghem	As-1	M-8	Madrid / 1992-1996
<i>Aspergillus flavus</i> Link.	As-2	M-30	Madrid / 1998

Cuadro 2. Tratamientos de desinfección y evaluación del poder germinativo de las semillas.

Tratamientos	Tiempo	Ensayos en cajas de Petri *	Ensayos en toalla *	Ensayos con vermiculita **
40 g de Cl activo / l	5 min.	93 %	96 %	3 % a
40 g de Cl activo / l	10 min.	75 %	90 %	-
20 g de Cl activo / l	5 min.	86 %	92 %	-
20 g de Cl activo / l	10 min.	76 %	93 %	-
Testigo	Testigo	91 %	97 %	15 % b

\* Resultados expresados en porcentaje de germinación de semillas.

\*\* Resultados expresados en porcentaje de plántulas dañadas.

5 min. en hipoclorito sódico sin diluir, con un porcentaje de germinación del 93%, incluso superior al del testigo (91%). Las comparaciones entre las diferentes concentraciones y tiempos de desinfección se muestran en el cuadro 2.

Estos datos, unidos a la gran contaminación de hongos presente en las muestras de semilla utilizadas como testigo hacen del método de desinfección consistente en sumergirlas durante 5 min. en hipoclorito sódico (40 g de Cl activo / l) el más adecuado para utilizar en los ensayos de patogenicidad. Una vez decidido este punto y para verificar los resultados del tratamiento elegido, se realizaron nuevos ensayos de germinación en cajas con vermiculita para observar su comportamiento en un sustrato igual al que se utilizará en los ensayos de inoculación. Se observaron diferencias significativas entre el tratamiento y el testigo. Los porcentajes de plántulas dañadas, que en el testigo llegaban al 15 %, se mantienen en un 3 % en los lotes de semillas sometidos al tratamiento de desinfección.

La desinfección previa de las semillas antes de los ensayos de inoculación con los diferentes metabolitos, nos permite ofrecer una mayor fiabilidad en los resultados.

### Resultados obtenidos con densidades de inóculo simple.

La inoculación de los diferentes hongos dio como resultado efectos negativos sobre los porcentajes de germinación (Cuadro 3), las diferencias con relación al testigo son siempre significativas. El porcentaje de

emergencia más alto es siempre el del testigo, con un 86 %.

El menor número de plántulas emergidas se corresponde con las inoculaciones de los aislados Rh-1 y Al-1, con 29 y 19% de disminución del porcentaje de emergencia respecto al testigo.

Las diferencias observadas entre *Aspergillus niger*, con un 67% de germinación, y *A. flavus*, con un 76%, tienen una posible explicación en el diferente grado de patogenicidad que cada especie pueda presentar ante un mismo hospedante, grado que dependerá de muchos factores, como los diferentes metabolitos excretados por cada hongo y su especificidad, la velocidad de crecimiento, etc. En este caso se comprueba como los mayores daños sobre la germinación se producen por el aislado de *A. niger*, que cuenta con una mayor densidad de conidias y una mejor respuesta frente a las altas temperaturas, frente al aislado de *A. flavus*.

Los daños observados en las plántulas resultantes de las inoculaciones de semillas con ambas especies de *Aspergillus* consisten en necrosis en la raíz principal y en las secundarias, llegando a rodearlas por completo, y estrangulándolas. En la parte aérea aparecen manchas sobre el tallo, de coloración oscura y con el contorno perfectamente delimitado.

Las inoculaciones con aislados de *Alternaria alternata* provocaron disminuciones en la emergencia de plántulas del 24 y 15 % respecto al testigo. Los daños son similares a los anteriormente descritos para *Aspergillus*, pero en este caso las manchas del hipocotilo

Cuadro 3. Plántulas de cardo (*Cynara cardunculus*) emergidas y dañadas tras el tratamiento con diferentes densidades de inóculo.

Especie	Código de aislado	Densidad de inóculo Simple				Densidad de inóculo Doble			
		Porcentaje de emergencia		Plántulas dañadas		Porcentaje de emergencia		Plántulas dañadas	
<i>Cladosporium herbarum</i>	Cla-1	70 %	cd	6 %	ab	70 %	cd	22 %	bcde
	Cla-2	77 %	e	13 %	bc	52 %	ab	20 %	bcde
<i>Penicillium rugulosum</i>	Pe-1	70 %	cd	10 %	bc	63 %	abc	27 %	de
	Pe-2	71 %	cde	6 %	ab	75 %	cd	28 %	e
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Rh-1	57 %	a	8 %	ab	48 %	a	26 %	cde
<i>Aspergillus niger</i>	As-1	67 %	bc	9 %	bc	70 %	bcd	10 %	ab
<i>Aspergillus flavus</i>	As-2	76 %	de	15 %	c	71 %	cd	18 %	bcde
<i>Alternaria alternata</i>	Al-1	62 %	ab	10 %	bc	68 %	bc	12 %	abc
	Al-2	71 %	cde	14 %	bc	67 %	bc	21 %	bcde
<i>Fusarium verticillioides</i>	F.m-1	67 %	bc	10 %	bc	65 %	bc	14 %	abcd
	F.m-2	63 %	b	9 %	bc	62 %	abc	17 %	bcde
Testigo	T	86 %	f	1 %	a	83 %	d	1 %	a

tienen un contorno menos delimitado y coloración más clara, presentándose longitudinalmente a lo largo del tallo.

En algunas plántulas, tanto en las inoculaciones con *Aspergillus* como con *Alternaria*, una vez emergidos los callados, se observa la aparición de crecimiento micelial del hongo sobre los mismos cotiledones, llegando a esporular y constituyendo una fuente de inóculo o reinfección del propio cultivo.

La inoculación con *F. verticillioides*, provocó bajos porcentajes de emergencia (67 y 63 % en cada uno de los dos aislados inoculados). En ambos casos hay diferencias significativas con relación al testigo, con disminuciones del porcentaje de emergencia del 19 y 23 % respectivamente. Muchas de las plántulas emergidas presentaban raíces necrosadas, síntoma característico del ataque de *Fusarium*.

En cuanto al número de plántulas dañadas, los datos observados para cada tratamiento varían desde un 1% en el testigo a un 15% en As-2.

En la inoculación con *Aspergillus*, de la misma forma a como ocurre con *Cladosporium*, el aislado que, tras los ensayos de emergencia de plántulas, tenía el menor porcentaje y que contaba por tanto con una mayor capacidad parasitaria es el que produ-

ce menor número de plántulas dañadas. En este caso, las inoculaciones con *A. niger* presentan un 67% de emergencia y un 9% de plántulas dañadas del total de las emergidas. Cuando se inoculó con *A. flavus*, la emergencia fue del 76%. Es decir, un 12% superior a las inoculadas con *A. niger* y, sin embargo, el porcentaje de plántulas dañadas era del 15%. Al tratarse de dos especies distintas, podría entenderse una diferente capacidad parasitaria, otra interpretación que puede darse a este comportamiento, es que varios mecanismos están implicados en las acciones sobre la emergencia y lesiones posteriores sufridas por las plántulas y que, probablemente, no actúen los mismos. Estos porcentajes han de tenerse muy presentes a la hora de valorar los daños producidos por el hongo, pues las semillas que den lugar a plántulas atrofiadas o dañadas seriamente no conseguirán desarrollarse con normalidad una vez sembradas en los campos de cultivo.

Las plántulas atacadas por *Aspergillus* presentaban daños visibles en forma de manchas oscuras de contorno delimitado. Resultados que coinciden con los obtenidos por HARMAN y GRANETT, (1972).

Tras la inoculación de las semillas con dos aislados diferentes de *Alternaria*, se

observó un alto número de plántulas dañadas, con porcentajes del 10 y 14% respectivamente, con diferencias significativas respecto al testigo.

Los síntomas presentes en las plántulas dañadas consisten en manchas de un color parduzco más claras que las producidas por los hongos anteriormente inoculados, más o menos delimitadas, que discurren longitudinalmente a lo largo del tallo. Estos síntomas son idénticos a las lesiones que GAETAN y MADIA (1998) describen sobre los tallos de colza canola.

La inoculación con dos aislados de *Fusarium verticillioides*, mostró porcentajes de un 10 y 9% respectivamente de plántulas dañadas sin que aparecieran diferencias significativas entre ellas. Los daños se caracterizan por la aparición de gran cantidad de raíces necróticas, con necrosis tanto distales como intermedias. Las plántulas dañadas presentaban un alto número de manchas de color claro a lo largo del hipocotilo.

### Resultados obtenidos con densidades de inóculo doble

Los resultados obtenidos tras la duplicación del inóculo (Cuadro 3), fueron también sometidos a un análisis de varianza unifactorial. Los resultados obtenidos indican la existencia de diferencias significativas entre algunos de los tratamientos y el testigo.

En el cuadro 3 se aprecia como los porcentajes de emergencia disminuyen considerablemente tras las inoculaciones. Los mayores porcentajes de emergencia se observan en Pe-2 y As-2, con un 8 y 12 % inferior al testigo, sin diferencias significativas con respecto a él. Esta capacidad parasitaria de las dos especies se corresponde con lo observado para una densidad de inóculo simple, lo que indica que, a partir de una densidad de inóculo, el incremento no tiene efecto significativo. Tampoco difieren significativamente con relación al testigo los tratamientos Cla-1 y As-1. A diferencia de los tratamientos con los aislados Cla-2, Pe-1, Rh-1, Al-1, Al-2 Fm-1 y Fm-2 que presentan todos ellos diferencias significativas con el testigo.

Al duplicar el inóculo no se aprecian diferencias significativas en la capacidad parasitaria de los aislados de *P. rugulosum*, *A. alternata* y *F. verticillioides*, así como de las dos especies de *Aspergillus*, *A. niger* y *A. flavus*. Coincide esto solo en parte con los resultados de el cuadro 3, en la que únicamente entre los aislados de *Penicillium* y *Fusarium* no aparecían diferencias significativas. Indicando que la capacidad parasitaria de los aislados podría tender a igualarse a una cierta densidad de inóculo.

Solamente los aislados de *C. herbarum* mantienen diferencias significativas entre sí, coincidiendo con las diferencias aparecidas para una densidad de inóculo simple (Cuadro 3).

En el caso de las especies de *Fusarium* y *Rhizopus* que, con una densidad de inóculo medio producían los mayores efectos sobre la emergencia de plántulas, continúan manteniendo esta capacidad al duplicar el inóculo, disminuyendo los porcentajes de emergencia respecto al testigo en un 18 y 21 % en el caso de *Fusarium*, y en un 35 % en *Rhizopus*. Entre todos los porcentajes de nascencia obtenidos al duplicar el inóculo la disminución más drástica tiene lugar tras la inoculación con *Rhizopus*. Este resultado que, como hemos comprobado, se debe a la acción en la germinación de las semillas, se agudiza en un 16% cuando se dobla la densidad del inóculo. La baja aparición de necrosis radiculares asociadas a la inoculación con este hongo permite pensar que una vez emergida la semilla, el miceto no afecta de una manera tan drástica al desarrollo de las plántulas como los demás géneros estudiados ni aún a dosis de inóculo elevadas.

La capacidad parasitaria de cada uno de los aislados se corresponde con la anteriormente observada en los ensayos con densidades de inóculo simple, si bien se aprecia un aumento en los porcentajes de daños.

El mayor aumento se produce en *Penicillium*, en *Cladosporium herbarum* y *Rhizopus stolonifer* también se aprecia el incremento en los daños sobre las plántulas, en contraposi-

ción, los aislados de *Alternaria*, *Aspergillus* y *Fusarium* no aumentan tan drásticamente el número de plántulas dañadas.

En todos los casos se producen serios daños sobre plántulas ya germinadas. Estas plántulas resultan seriamente afectadas y no tendrán un desarrollo normal en campo. En muchos casos, las plántulas resultarán inviables e incluso morirán. Pero en aquellos en los que no se produjera la muerte de la planta, los rendimientos finales se verían reducidos, tanto como consecuencia de una disminución del vigor de la planta (y, por consiguiente, del porcentaje de materia seca), como por una reducción del número, calidad y viabilidad de las semillas.

### Resultados sobre las pruebas de toxicidad obtenidas con los extractos fúngicos

Las pruebas de patogenicidad con extractos acuosos ensayados se llevó a cabo con dos aislados de *Alternaria*, dos aislados de *Aspergillus*, un aislado de *Penicillium* y dos aislados de *Fusarium*, presentes en el inventario fúngico, y con alta capacidad potencial de producir concentraciones de metabolitos tóxicos que afecten a la germinación y nascencia de las semillas (KOHOMOTO *et al.*, 1982; TIETJEN *et al.*, 1983; COLE *et al.*, 1973; HOLESTEIN y STOESSL., 1988). Los resultados se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Evaluación de los filtrados de los cultivos líquidos a los 3, 7 y 11 días de agitación del hongo sobre semillas y plántulas de cardo (*Cynara cardunculus*). Los daños en porcentajes de plántulas afectadas sobre el total de las emergidas.

Aislado	Emergidas			Atrofiadas		
	3 días	7 días	11 días	3 días	7 días	11 días
Testigo	88 ± 7,4 b	83 ± 6,7 b	86 ± 5,8 b	6 ± 5 a	8 ± 5,7 a	5 ± 5,7 a
Al-1	76 ± 8,1 a	70 ± 5,3 a	74 ± 5,8 a	23 ± 5,2 b	20 ± 5,5 b	25 ± 8,4 b
Al-2	75 ± 5,8 a	71 ± 5,6 a	69 ± 9,4 a	17 ± 5,9 b	37 ± 5,4 c	33 ± 11,8 c
Testigo	80 ± 7,9 a	79 ± 8,5 a	85 ± 8,2 b	8 ± 3,5 a	8 ± 6,8 a	7 ± 5,6 a
As-1	72 ± 8,6 a	72 ± 11,9 a	75 ± 11 a	23 ± 6,6 b	32 ± 12 c	21 ± 7,7 b
As-2	77 ± 12,1 a	72 ± 11,4 a	74 ± 10 a	20 ± 4,8 b	19 ± 6,4 b	21 ± 6,4 b
Testigo	88 ± 4,3 b	77 ± 14,9 b	92 ± 4,3 b	1 ± 2,8 a	1 ± 2,8 a	1 ± 2,5 a
Fm 1	51 ± 12,2 a	60 ± 7,1 a	73 ± 4,7 a	20 ± 13,6 b	10 ± 8,3 b	16 ± 6,9 b
Fm 2	45 ± 6,1 a	60 ± 4,3 a	74 ± 6,8 a	25 ± 15,1 b	10 ± 8,5 b	15 ± 4,7 b
Testigo	85 ± 5,4 b	89 ± 4,9 b	86 ± 5,5 b	6 ± 4,7 a	8 ± 5,3 a	8 ± 4,3 a
Pe-1	77 ± 9,1 a	74 ± 5,5 a	78 ± 9,3 a	18 ± 8,6 b	19 ± 11 b	22 ± 12 b
Aislado	Raíz necrosada			Manchas hipocotilo		
	3 días	7 días	11 días	3 días	7 días	11 días
Testigo	3 ± 2,7 a	8 ± 5,7 a	4 ± 3,9 a	5 ± 4,8 a	4 ± 4,7 a	5 ± 4,2 a
Al-1	12 ± 6,2 b	13 ± 5,4 b	13 ± 8,9 b	22 ± 9,1 b	34 ± 18 b	27 ± 7,3 b
Al-2	15 ± 7,7 b	29 ± 8 c	20 ± 8,6 b	24 ± 11,4 b	35 ± 6 b	34 ± 17,7 b
Testigo	6 ± 4,5 a	6 ± 3,9 a	6 ± 3,4 a	0 ± 0 a	1 ± 2 a	2 ± 3 a
As-1	23 ± 8,3 b	78 ± 5,5 c	32 ± 9,5 c	20 ± 5,3 b	26 ± 6,6 c	22 ± 7,6 c
As-2	24 ± 4,9 b	18 ± 9,4 b	19 ± 6,6 b	17 ± 3,3 b	16 ± 7,7 b	12 ± 3,8 b
Testigo	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	6 ± 4,9 a	2 ± 3,6 a	1 ± 2,6 a
Fm 1	0 ± 0 a	1 ± 3,5 a	1 ± 3,1 a	17 ± 10,3 b	7 ± 6,8 a	3 ± 4,1 a
Fm 2	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	39 ± 19,2 c	20 ± 7,7 b	9 ± 5,9 b
Testigo	7 ± 4,3 a	9 ± 3,8 a	7 ± 4,1 a	5 ± 3,4 a	4 ± 4,2 a	3 ± 3,7 a
Pe-1	12 ± 7,5 a	15 ± 10,2 a	19 ± 14 a	8 ± 3,4 b	4 ± 3 a	6 ± 4,4 a

### Pruebas de toxicidad con los extractos obtenidos a partir de *Alternaria alternata*.

La disminución en el porcentaje de emergencia de plántulas tras el riego con extractos de *A. alternata* (Cuadro 4) tiene lugar en igual cuantía en los dos aislados, no pudiendo apreciarse diferencias significativas entre ellos, aunque sí con respecto al testigo.

Los resultados ponen de manifiesto la distinta capacidad parasitaria de los dos aislados, siendo los metabolitos del aislado AI-2 los que mayor porcentaje de daños causan a las plántulas, con un máximo en su actividad fitotóxica extracelular cercano a los 7 días de incubación del cultivo líquido con un 37 % de plántulas atrofiadas y un 29 % de plántulas que presentaban atrofas en las raíces.

El aislado AI-1 causa menores porcentajes de daños, y lo hace además de manera constante desde el tercer día. Los cuadrados medios presentan diferencias significativas frente al testigo en los tres periodos de agitación del hongo y entre los dos aislados para periodos de 7 y 11 días de incubación.

Estos datos confirman la variabilidad genética presente entre los diferentes aislados de *A. alternata* puesta de manifiesto en las inoculaciones directas del patógeno y confirmado con la inoculación de metabolitos. La observación de los mismos síntomas aparecidos sobre las plantas tras la inoculación con el filtrado que tras la inoculación con los patógenos directamente nos permite concluir que los daños observados en las plántulas infectadas son debidos a la producción de micotoxinas y no a la invasión física del hongo. Estos resultados coinciden con los presentados por HARMAN y GRANETT, (1972) y HANDA *et al.* (1982).

Se ha comprobado además, que el aislado cuyos metabolitos producían mayores daños tras ser inoculados sobre las semillas coincide con el aislado que producía mayor número de conidias, lo que nos permite pensar en una probable relación entre la producción de conidias y la actividad fitotóxica extracelular del hongo.

Las micotoxinas producidas por *Alternaria* sp. no son específicas de la planta del

cardo (AGRIOS, 1996), pero, aunque los daños producidos por estos metabolitos sean mucho más manifiestos en sus hospedantes habituales, si la cantidad de toxinas es lo suficientemente alta, que sea o no hospedante no es un factor limitante para la aparición de daños (HARMAN y GRANETT, 1972).

La representación gráfica (Fig. 1) pone de manifiesto la distinta capacidad parasitaria de los diferentes aislados de *Alternaria*.

### Pruebas de toxicidad con los extractos líquidos obtenidos a partir de *Aspergillus niger* y *A. flavus*.

*Aspergillus* es un hongo que, además de aparecer en un elevado número de muestras analizadas en el inventario, tiene una gran capacidad potencial de producir metabolitos fitotóxicos para las semillas (BROWN *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 1981; KING *et al.*, 1983; SANCHIS *et al.*, 1983; WIDSTROM *et al.*, 1990; FERNÁNDEZ-CORRAL *et al.*, 2002).

En el cuadro 4 se observa como únicamente aparecen diferencias significativas entre los porcentajes de emergencia de plántulas del testigo y los tratamientos cuando la extracción se prolonga 11 días. Probablemente la concentración de posibles metabolitos obtenidos con 3 y 7 días de agitación del hongo antes de su extracción, no sea lo suficientemente alta como para impedir la germinación y emergencia de las plántulas. Los mayores daños producidos sobre las raíces coinciden con los producidos sobre la parte aérea en lo que se refiere al período de agitación del hongo antes de ser aplicados sus extractos, cercano al tercer día en *A. niger* y al séptimo día en *A. flavus*, mostrando así la diferente capacidad parasitaria de cada una de las especies de *Aspergillus* utilizadas en el estudio.

Los porcentajes de plántulas atrofiadas muestran diferencias significativas entre las dos especies y el testigo, que presenta siempre porcentajes muy bajos de daños, no superando en ningún caso al 8%. Posiblemente, la atrofia o el retraso en el crecimiento observado se produzca con bajas concentraciones de posibles tóxicos en el medio,



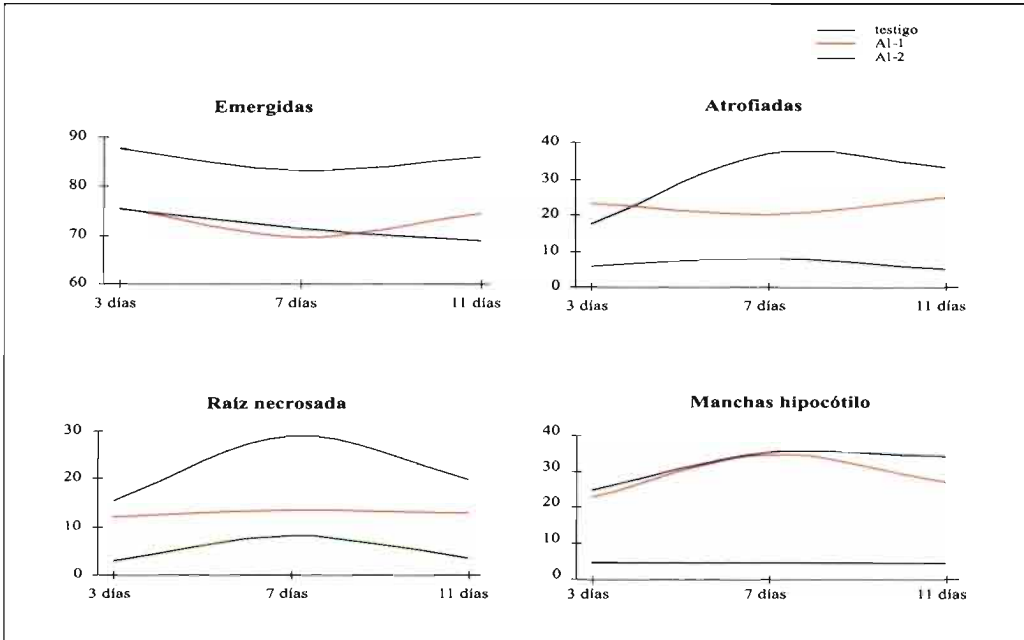


Figura 1. Gráficas comparativas de las pruebas de patogenicidad con los extractos de dos aislados de *Alternaria alternata*.

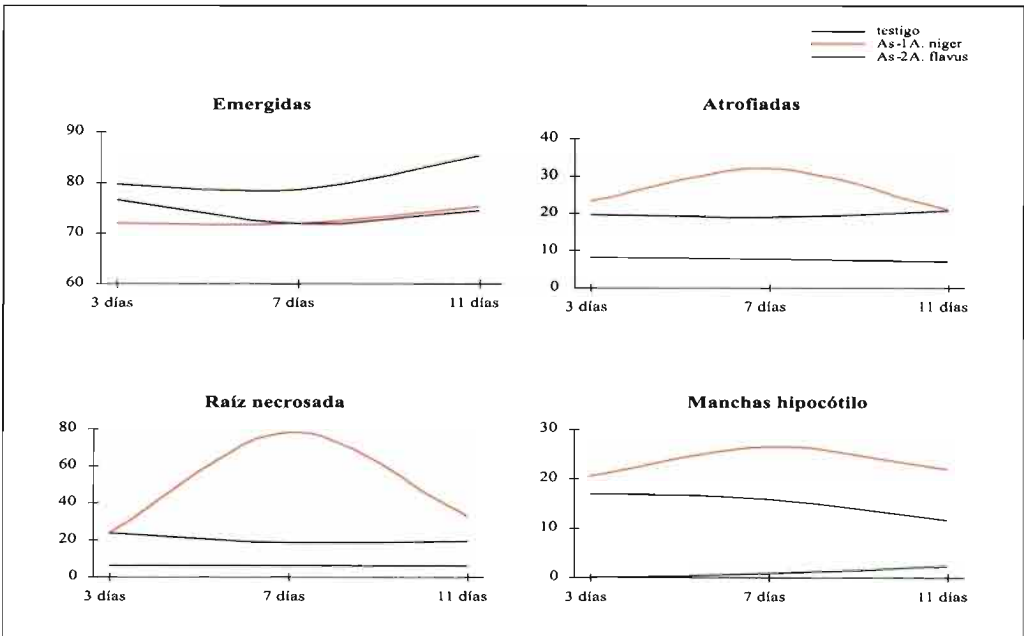


Figura 2. Gráficas comparativas de las pruebas de patogenicidad con extractos de *Aspergillus Níger* (As-1) y *Aspergillus flavus* (As-2).

por lo que la severidad de los daños no se ve afectada por el cambio que la concentración de tóxicos sufre a lo largo de los distintos períodos de incubación del hongo.

Los porcentajes de plántulas con raíces necrosadas sufren grandes variaciones en los tratamientos con extractos de una especie u otra. Si bien los extractos de las dos especies causan abundantes necrosis en plántulas, los mayores daños se producen con extractos procedentes de períodos de incubación del hongo distintos para cada especie. El aislado de *A. flavus* (As-2) produce el mayor porcentaje de daños al inocular los extractos de 3 días de incubación, con un 24% de plántulas con raíces necrosadas, porcentaje que disminuye a un 18 y 19% con períodos de 7 y 11 días de incubación, respectivamente (ver Fig. 2).

En inoculaciones con metabolitos de *A. niger* (As-1), los daños son similares a los producidos con los metabolitos de *A. flavus* (As-2) obtenidos a los 3 días de agitación del hongo. Sin embargo, en extracciones realizadas a los 7 y 11 días, las necrosis producidas por los extractos de As-1 son muy superiores.

Los porcentajes de daños observados son muy altos, llegando hasta el 78% de raíces de plántulas dañadas por *A. niger* a los 7 días de incubación frente al 6% de raíces dañadas que presenta el testigo.

Las manchas aparecidas sobre el hipocotilo de las plántulas tienen la misma morfología tras la inoculación con los extractos que tras la inoculación con los mismos hongos. Los mayores porcentajes de plántulas dañadas se presentan tras ser inoculadas con metabolitos obtenidos tras 7 días, en el caso de *A. niger* (26% de plántulas con hipocotilo dañado), y 3 días, en el caso de *A. flavus* (17% de plántulas con hipocotilo dañado). Son destacables las grandes diferencias producidas con respecto al testigo, donde el porcentaje de plántulas que presentan daños en el hipocotilo es prácticamente nulo.

Las gráficas comparativas (Fig. 2) muestran como las dos especies tienen comportamientos diferentes en lo que se refiere a los

daños ocasionados, pues mientras que *A. niger* mantiene constantes a lo largo de los tres periodos de incubación los porcentajes de daños, en *A. flavus* se aprecia claramente un punto máximo en la producción de sustancias fitotóxicas extracelulares que tiene lugar cerca del séptimo día de agitación del hongo. Estos resultados nos muestran la diferente toxicidad de cada una de las especies de *Aspergillus* utilizadas en el estudio, y que permiten asegurar, que la producción de metabolitos tóxicos está regulada por el hongo, y que no aumenta linealmente con el crecimiento micelial.

#### **Pruebas de toxicidad con los extractos líquidos obtenidos a partir de *Fusarium verticillioides*.**

Se analizaron dos aislados diferentes de *Fusarium verticillioides*, comparándolos con un testigo. Este género es el productor más importante de fumonisinas (FANDOHAN *et al*, 2004; MUNKVOLD *et al*, 1997). La disminución en el porcentaje de emergencia de plántulas tras la inoculación con metabolitos de *F. verticillioides* (Cuadro 4), tiene lugar en similar cuantía en ambos aislados, no pudiendo apreciarse diferencias significativas entre ellos aunque sí con respecto al testigo.

La emergencia es un 37 y 43% respectivamente inferior al testigo con metabolitos obtenidos a los 3 días. La emergencia observada tras la inoculación con metabolitos extraídos a los 7 y 11 días aumenta en los dos aislados estudiados.

La elevada capacidad germinativa de los filtrados a los 3 días de incubación del hongo, que se ve disminuida a los 7 y 11 días parece indicar que se reduce la emisión de metabolitos tóxicos paralelamente al tiempo de incubación, de la misma manera que hacen pensar en la pérdida de toxicidad de los metabolitos ya producidos.

En los porcentajes de plántulas atrofiadas los mayores daños se aprecian en los ensayos realizados con metabolitos obtenidos tras 3 días de agitación con un 20 y 25% de plántulas atrofiadas. Daños que disminuyen con periodos de incubación mayores.

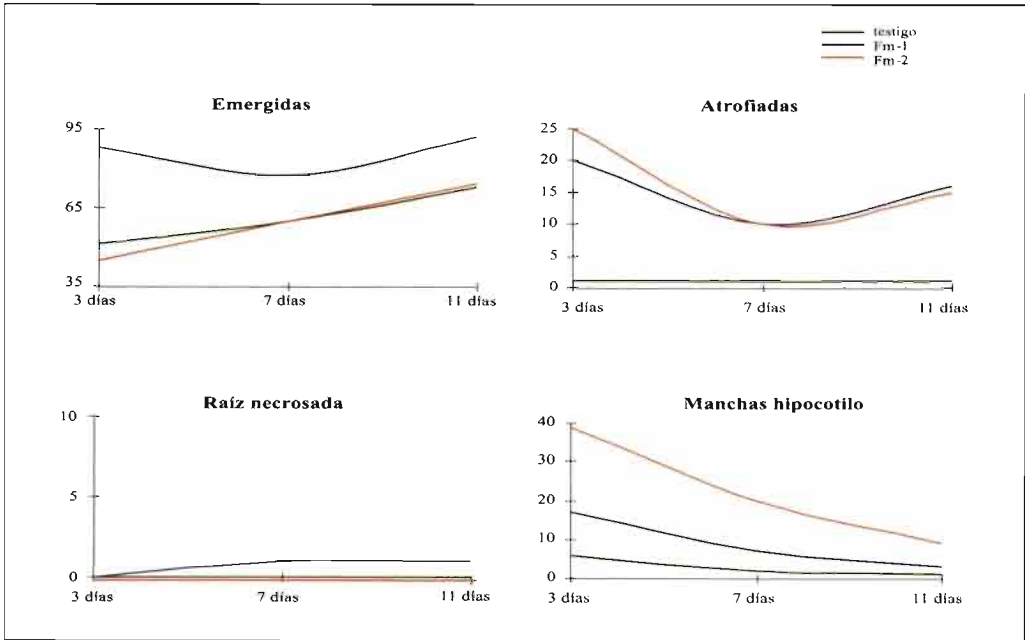


Figura 3. Gráficas comparativas de las pruebas de toxicidad con extractos de dos aislados (Fm-1 y Fm-2) de *Fusarium verticillioides*.

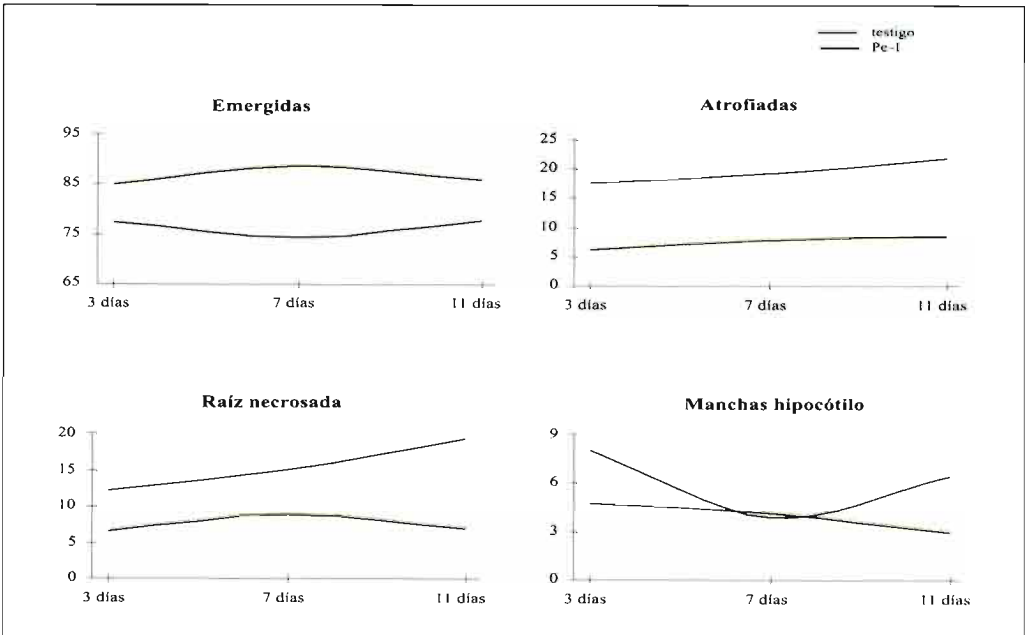


Figura 4. Gráficas comparativas de las pruebas de toxicidad con extractos de *Penicillium rugulosum* (Pe-1).

No se aprecia efecto alguno de las inoculaciones sobre las raíces de las plántulas, no parece por tanto que sea este un efecto de los metabolitos producidos por los aislados de *Fusarium verticillioides*. En contraposición al resultado de la inoculación con los dos aislados de *Fusarium verticillioides*, donde aparecían daños en porcentajes de un 10 y 9% respectivamente de plántulas dañadas (Cuadro 3), caracterizándose éstas por la aparición de gran cantidad de raíces necróticas, con necrosis tanto distales como intermedias.

En cambio, en los porcentajes de manchas en el hipocotilo, los mayores porcentajes de daños vuelven a ser los observados tras la inoculación de metabolitos obtenidos tras tres días de agitación, disminuyendo paulatinamente con mayores periodos de agitación de los aislados (ver Fig. 3).

#### **Pruebas de toxicidad con los extractos obtenidos a partir de *Penicillium rugulosum*.**

La capacidad de producción de toxinas que presenta este género y su efecto sobre las semillas almacenadas son sobradamente conocidos (PRANGE *et al.*, 2005). Comparándose un único aislado con un testigo, los resultados del conteo realizado a los 10 días se muestran en el cuadro 4.

Se observa un descenso en los porcentajes de emergencia tras las inoculaciones con extractos de *P. rugulosum* de un 8 a un 15% con respecto al testigo. Estos porcentajes permanecen casi constantes a lo largo de los tres periodos de incubación del hongo, con un máximo, a los 11 días de agitación del cultivo líquido, del 78% de plántulas emergidas, no muy alejado del 77% observado a los 3 días de agitación del hongo.

El ensayo con extractos acuosos de *P. rugulosum* dio como resultado porcentajes de plántulas atrofiadas, en los que se aprecia un mínimo ascenso en la actividad fitotóxica a medida que aumenta el período de agitación al que ha sido sometido el hongo. A diferencia de los ensayos con *Alternaria alternata* y *Aspergillus niger* y *flavus*, los extractos de *Penicillium* producen atrofiadas a

partir de los 3 días de agitación del hongo con un 18% de plántulas afectadas, aunque sufren un aumento lineal al menos hasta los 11 días de incubación del hongo, con un máximo del 22% de plántulas atrofiadas a los 11 días de incubación del hongo.

Las gráficas comparativas entre las inoculaciones con metabolitos obtenidos a partir de cultivos líquidos de *Penicillium* y el testigo (Fig. 4) muestran el efecto que estos metabolitos tienen sobre las plántulas tratadas. Los daños aumentan linealmente con los días de agitación del hongo. Esto nos lleva a la conclusión de que, en el caso de *Penicillium*, la producción de metabolitos está influenciada por el periodo de incubación del hongo, aumentando así linealmente al menos hasta los 11 primeros días.

La inhibición de la germinación fue, por lo general, mayor al inocular las semillas con el cuerpo miceliar y conidial de los aislados directamente que con sus extractos acuosos. Así ocurre en las inoculaciones con *Penicillium*, *Alternaria* y *Aspergillus*. En el caso de las inoculaciones con *Fusarium moniliforme*, los mayores porcentajes de inhibición de la germinación se obtuvieron con los extractos acuosos.

Por regla general las semillas de cardo presentan mayores porcentajes de daños y atrofiadas cuando son inoculadas con los extractos acuosos. Así, los extractos de *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Níger* y *Fusarium moniliforme* presentan mayores porcentajes de plántulas atrofiadas y dañadas (Cuadro 4) que el observado tras la inoculación con los cuerpos miceliales directamente (Cuadro 4).

El echo de que muchos autores hayan descrito daños similares en la germinación y nascencia de semillas de diferentes especies nos hace pensar que posiblemente no se trate de toxinas específicas.

Los géneros estudiados en este trabajo son de poca importancia, en general, en Patología Vegetal, puesto que no producen enfermedades aparentemente llamativas, sin embargo su papel en la germinación y muerte y atrofia de plántulas puede tener una tras-

cendencia importante que podría alcanzar a lo que en los bancos de germoplasma se denomina envejecimiento de las semillas y

pérdida de germinación. Pues bien, estos hongos podrían tener una estrecha relación con esa falta de germinación.

#### ABSTRACT

PALMERO D., C. IGLESIAS, L. VARÉS, J. SINOBAS (†). 2006. Evaluation of the effect of fungal population and their aqueous extracts over thistle seeds (*Cynara cardunculus* L.) germination and nascence. *Bol. San. Veg. Plagas*, **32**: 659-672.

In previous works, the fungal population present in seeds of 54 cultivars of thistle was characterized. A total of 4400 seeds were tested and 15 different genera of fungi were identified.

The present work evaluates the effect of such fungi and their aqueous extracts over seed germination and nascence.

Pathogenicity tests have been made for 2 strains from each of the 6 most quantitative important genera (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* and *Alternaria*), as well as for their metabolites produced after 3, 7 and 11 days of incubation

The fungal inoculation results show negative effects on seed germination. Those effects were maximum after inoculation with *Rhizopus stolonifer* (29% less germination) and *Fusarium verticillioides*.

Nascence percentage decreases after inoculum concentration duplication and the number of damaged plants grows drastically. In the significative case of inoculation with *Cladosporium*, germination decreased 31% with that duplication, analogous as what happens with the rest of de genera, in lesser or greater degree.

Seedlings emerged after being inoculated with metabolites obtained from aqueous extracts showed the same symptoms (atrophy and damage on radicles and coleoptiles) than those described for the fungus itself. Metabolites of tested genera decrease as well germination.

Different parasitical ability for each species is shown by the results. There are also differences depending on the stirring period. Those data permit to assume that toxic metabolite production is fungal - regulated and does not have a linear relationship with myceliar growing.

**Key words:** *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium verticillioides*, *Rhizopus stolonifer*, metabolites, toxicity, pathogenicity, seedlings.

#### REFERENCIAS

- AGRIOS, G. N., 1995. Fitopatología. UTEHA. Ed. Noriega.
- COLE, R. J.; KIRKSEY, W. J.; CUTLER, H.G.; DOUPNIK, B. L. and PECKHAM, J.C., 1973. Toxin from *Fusarium moniliforme*: Effects on plants and animals. *Science*, **179**: 1324-1326.
- FERNÁNDEZ-CORRAL, J. A.; SANTOS, M.; BLANCO, R. y TELLO, J., 2002. Estado sanitario de las semillas de judía en los cultivos de Caniles (Granada). *Phytoma-España*, **139**: 16-21.
- FANDOHAN, P.; GBENOU, J.D.; GNONLONFIN, B; HELL, K.; MARASAS, W.F.O. and WINGFIELD, M. 2004. Effect of the essential oils on the growth of *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in corn. *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 6824-6829.
- FOTTI, S.; MAUROMICALE, G.; RACCUA, S.A. ; FALLICO, B. ; FANELLA, F. and MACCARONE, E., 1999. Possible alternative utilization of *Cynara* spp. I. Biomasa, grain yield and chemical composition of grain. *Industrial Crops and Products*, **10**: 219- 228.
- GAETAN, S. y MADIA, M. S., 1998. La mancha negra de la hoja (*Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltsh.) en cultivos de colza cánola en Buenos Aires y Santa Fe, Argentina. *Bol. San. Veg. Plagas*, **24**: 573-580.
- HANDA, A. K.; BRESSAN, R. A. and PARK, M. L., 1982. Use of plant cell cultures to study production and phytotoxicity of *Alternaria solani* toxin(s). *Physiological Plant Pathology*, **21**: 295-309.
- HARMAN, G. E. and GRANETT, A. L., 1972. Deterioration of stored pea seed, changes in germination, membrane permeability and ultrastructure resulting from infection by *Aspergillus ruber* and from aging. *Physiological Plant Pathology*, **2**: 271-278.
- HARMAN, G. E., 1972. Deterioration of stored seeds by *Aspergillus ruber*, extraction and properties of a toxin. *Phytopathology*, **62**: 206-208.

- HOLESTEIN, J. E. and STOESSL, A., 1983. Metabolites of *Alternaria solani*. Part IX: Phytotoxicity of altersolanol A. *Phytopathologische zeitschrift*, **108**: 143-147.
- JONES, R. K.; DUNCAN, H. E. and HAMILTON, P. B., 1981. Planting date, harvest date and irrigation effects on infection and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in field corn. *Phytopathology*, **71**: 810-816.
- KING, S. B. and WALLIN, J. R., 1983. Methods for screening corn for resistance to kernel infection and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. Pages 77-80 in: Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. Diener, U. L.; Asquith, R.L. and Dickens, J. W. Eds. South Coop. Bull., 279. Auburn University, Auburn, AL.
- KOHMOTO, K.; VERMA, V. S.; NISHIMURA, S.; TAGAMI, M. and SCHEFFER, R. P., 1982. New outbreak of *Alternaria* stem cancer of tomato in Japan and production of host-selective toxins by the causal fungus. *J. Fac. Agric. Tottori Univ.*, **17**: 1-8.
- KOMADA, H., 1975. Development of selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Review of Plant Protection Research*, **8**: 114-125.
- MONTOYA, J. R.; GÓMEZ VÁZQUEZ, J. M.; BLANCO PRIETO, R. y TELLO, J., 2001. Estado sanitario de las semillas de plantas aromáticas cultivadas en Almería. *Bol. San. Veg. Plagas*, **27**: 345-354.
- PRANGE, A.; MODROW, H.; HORMES, J; KRÄMER, J. and KÖLHER, P., 2005. Influence of mycotoxin producing fungi (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) on gluten proteins during suboptimal storage of wheat after harvest and competitive interactions between field and storage fungi. *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 6930-6938.
- PALMERO, D.; IGLESIAS, C. y SINOBAS, J., 2005. Inventario fúngico asociado a las semillas de cultivares de Cardo (*Cynara cardunculus* L.). *Bol. San. Veg. Plagas*, **31**VÍÑAS

(Recepción: 22 marzo 2006)

(Aceptación: 18 septiembre 2006)

## Microbiota fúngica asociada a las podredumbres radiculares del puerro cultivado en Villena

R. E. MARTÍNEZ-RESTOY, F. DIÁNEZ, M. SANTOS, M. DE CARA, J. FERRÁNDIZ HERNÁNDEZ, J. C. TELLO

Se presenta en este trabajo un estudio sobre la etiología de las podredumbres radiculares del puerro. El estudio abarca los análisis practicados a 825 plantas producidas en semilleros con sustratos a base de turba y bandejas alveoladas y a 310 plantas procedentes de diferentes parcelas en producción del campo de Villena. Las raíces de las plantas, tanto las producidas en semillero como las del campo mostraban, fundamentalmente, una podredumbre blanda que a veces, adquiría coloración marrón clara o rosada, cualquiera que fuese la variedad del puerro (Lancelot, Nepal y Sabina). Dieciséis especies o géneros de hongos fueron aislados, sobresaliendo por su frecuencia: *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*), *F. oxysporum*, *F. roseum*, *F. solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Phoma* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Stemphylium botryosum*. Un total de 49 aislados de los hongos mencionados fueron inoculados en plántulas de tres variedades de puerro (Lancelot, Nepal y Sabina) en condiciones ambientales controladas en una cámara climatizada. Ningún síntoma de los observados en campo fue reproducido en las 3528 plantas inoculadas mediante tres técnicas diferentes. El artículo presenta una explicación posible para las podredumbres radiculares estudiadas, basadas en las técnicas de producción de plantas en semilleros, utilizando bandejas alveoladas con sustrato a base de turba y la consiguiente forma de manejar el cultivo en el terreno de asiento al aire libre.

R. E. MARTÍNEZ-RESTOY, F. DIÁNEZ, M. SANTOS, M. DE CARA, J. C. TELLO. Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. La Cañada de San Urbano. 04120 Almería, España;  
J. FERRÁNDIZ HERNÁNDEZ. Agrícola Villena Coop. V., Villena (Alicante)

**Palabras clave:** *Allium porrum*, *Fusarium* sp., *Macrophomina phaseolina*, *Phoma* sp., *Pythium* sp.

### INTRODUCCIÓN

Las micosis de origen edáfico en el puerro (*Allium porrum*) no deben ser ni abundantes ni graves, siendo comunes a otros miembros cultivados del género *Allium*, especialmente cebolla y ajo. Al menos, así puede deducirse de los tratados de patología vegetal que abordan los conocimientos sobre el tema (MESSIAEN *et al.*, 1991; SMITH *et al.*, 1992; GARCÍA-MORATO, 2003). En España, las enfermedades del puerro tienen una información

muy fragmentaria que en muchos casos no ha sido publicada. Así, podría citarse la escasisima presencia de nematodos en los cultivos de Villena (Bello, comunicación personal, 2003) y de virosis en la misma comarca (Jordá, comunicación personal, 2004). En el País Vasco, la presencia de *Phytophthora porri* provoca daños de cierta importancia en los cultivos de invierno (BERRA LERCHUNDI, 1996) y la presencia de *Pyrenochaeta terrestris* (*Phoma terrestris*) ha sido citada con una extensión geográfica restringida por BERRA

LERCHUNDI, (1999). Dado que dicha información es insuficiente, dispersa y sin registro como se pone en evidencia en la obra Patógenos de plantas descritos en España (DE ANDRÉS *et al.*, 2000) y dado el objetivo del trabajo aquí presentado, parece procedente enumerar las micosis que tienen su origen en el suelo y que afectan al cultivo del puerro. La información ha sido elaborada en base a los trabajos de MESSIAEN *et al.*, (1991), SMITH *et al.*, (1992) y MOHAN y SCHEWARTZ, (2000). La información se ha completado con los datos recientemente publicados para las cebollas levantinas, que recogen más de 20 años de observaciones continuadas (GARCÍA MORATO, 2003).

En plántulas y semillas, diversas especies de *Botrytis* (especialmente *B. alli*) y especies de *Urocystis* (*U. cepulae*, *U. magica* y *U. colchici*) que originan el conocido carbón, han sido citadas como patógenas. Más raramente en semilleros y con mayor frecuencia en siembras directas, *Sclerotium cepivorum* es causante de mermas en la producción de plantas.

En los cultivos establecidos, varios grupos de patógenos originan podredumbres radiculares, del disco basal (verdadero tallo) y de la base de las vainas de las hojas. Entre los hongos formadores de esclerocios, es *Sclerotium cepivorum*, el más importante teniendo *Macrophomina phaseolina* y *Sclerotium rolfsii* una actividad más limitada geográficamente. A. *Pyrenochaeta terrestris* que origina la micosis conocida como "raíces rosadas" por los tonos de rosa a rojo vino que adquieren las raíces afectadas, se le da una trascendencia creciente en la climatología mediterránea, especialmente en sus calurosos veranos. Sin embargo, no es el único micromiceto capaz de teñir las raíces con esos tintes rojizos. Ha sido designado *Fusarium roseum* var. *culmorum* por MESSIAEN *et al.*, (1991), el agente causal de la fusariosis del puerro, cuyo distintivo sintomatológico es, precisamente, la podredumbre rosa de las raíces. Otras especies de *Fusarium* que tornan rojiza la blancura de las raíces de cebollas y ajos son *Fusarium oxysporum* f.sp.

*cepae*, *Gibberella intricans* (anamorfo *F. equiseti*) y *Nectria hematococca* (anamorfos *F. solani*, *F. ventricosum*, fundamentalmente). Ninguna de estas especies han sido citadas en puerro (SMITH *et al.*, 1992). Poco más que sumar a este inventario. Quizás *Botrytis porri* que puede ocasionar podredumbres en la base de las hojas en el terreno de asiento y en puerros conservados en frigoríficos.

El trabajo de investigación que aquí se presenta responde a la necesidad de conocer la etiología del problema de podredumbres radiculares y decaimiento de plantas de puerro observadas, de manera generalizada en la comarca de Villena. Comarca cuya prosperidad agrícola se debe, en parte, al cultivo del puerro y de la zanahoria. Desde no hace más de cuatro años, las técnicas culturales se han modificado con el propósito de incrementar la cantidad y la calidad de la producción. En esencia, esas modificaciones se han fundamentado en dos de los procesos. La producción de plantas se hacía en almácigos en la provincia de Cádiz, aprovechando las buenas condiciones ambientales y los suelos arenosos. El transplante, a raíz desnuda, se realizaba en los campos de Villena. En la actualidad, se tiende a realizar todo el proceso en Villena y para no perder precocidad se producen las plantas en bandejas alveoladas de poliestireno bajo invernadero. El segundo cambio notable se refiere a la introducción de variedades híbridas de puerro que han sustituido a las que tradicionalmente producían los agricultores.

Todo el proceso señalado, ha dado lugar a ligeras modificaciones que pueden trascender a la producción final, en las prácticas culturales efectuadas en pleno campo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Muestreo

Durante ocho meses (mayo de 2003 a enero de 2004), y con frecuencia mensual, se realizaron diversos muestreos. El material vegetal se agrupó para su análisis de la siguiente manera: 1. Semillas de cada una de las variedades utilizadas en el campo. 2.



Muestras aleatorias de sustrato antes y después de usarlo en el semillero. 3. Plántulas de semillero escogidas al azar y 4. Plantas del terreno de asiento con síntomas de podredumbre radicular y decaimiento del follaje.

### ***Análisis de semillas***

Se analizaron semillas de las tres variedades (Lancelot, Nepal y Sabina) utilizadas, mediante la colocación en placas de Petri sobre medio agarizado (PDA) utilizando el método del Ulster (MUSKETT y MALONE, 1941), sembrando 10 semillas en cada placa, hasta un total de 100 semillas por variedad. Las placas se incubaron a temperatura ambiente del laboratorio durante 6 a 8 días, realizando lecturas periódicas cada dos días.

### ***Análisis de turba***

#### Turba antes de la siembra

Se realizó con el fin de determinar si la procedencia de los posibles hongos fitopatógenos fuera el sustrato. Para ello, se realizaron dos bloques de análisis correspondientes a las dos partidas de turba empleadas en los semilleros. Y a su vez, para cada bloque se realizó un análisis con trampas vegetales (pétalos de clavel) para *Pythium* y *Phytophthora* y otro selectivo para *Fusarium* (TELLO *et al.*, 1991).

#### Turba después del crecimiento de plantas en el semillero

Se practicaron los mismos análisis que los indicados para la turba sin utilizar, mencionados anteriormente.

### ***Análisis de plantas***

Las plantas seleccionadas de cada una de las explotaciones, se agruparon en lotes, según unidades de muestreo. Se realizaron análisis del sistema radicular en el caso de plántulas de semillero, puesto que en este caso no había exteriorización de síntomas foliares, y análisis del sistema radicular, bulbos y hojas para las plantas de campo. Para ello, las partes dañadas se lavaron con agua del grifo hasta eliminar restos de suelo o sustrato, así como otras impurezas, y se dejaron

secar sobre papel de filtro a temperatura ambiente. A continuación, se agruparon las plantas de acuerdo a los síntomas. A cada tipo de síntoma se le asoció un número, y seguidamente se tomaron muestras de raíces (3 raíces por planta) que se analizaron en PDA y medio selectivo para *Fusarium* (TELLO *et al.*, 1991). En el caso de los análisis de hojas, se utilizaron cámaras húmedas estériles. Las placas se incubaron a temperatura ambiente del laboratorio (20-25°C), realizando lecturas cada 48 horas. La identificación se realizó mediante observación directa de la placa al microscopio. Para la identificación de los hongos encontrados, se siguieron los criterios de distinta bibliografía (BARNET y HUNTER, 1972; TELLO, 1984; SMITH, *et al.*, 1992; ELLIS, 1961; ELLIS 1976; MESSIAEN *et al.*, 1991). Para la identificación de *Pythium* se utilizaron los criterios de VAN DER PLAT-NITERINK (1981) y para el género *Fusarium*, los de NELSON *et al.* (1983). Fueron analizadas un total de 1135 plantas, de las cuales 825 procedían de los semilleros.

### ***Inoculaciones***

Las inoculaciones se realizaron sobre tres variedades de puerro empleadas en las explotaciones: Lancelot, Nepal y Sabina. El inóculo, en todos los casos estuvo compuesto por un triturado de la colonia fúngica que había alcanzado el borde de la placa de Petri (90 mm de diámetro) conteniendo 20 ml de PDA en 100 ml de agua destilada. La unidad de inóculo consistió en una placa de Petri con el aislado a evaluar para cada ocho plantas, es decir, una placa por maceta y variedad. En todos los ensayos de inoculación se utilizaron dos testigos para cada una de las variedades (16 plantas por variedad). A éstos, se le añadió en lugar del inóculo con el patógeno, un triturado en agua destilada de 20 ml de medio de cultivo PDA.

Los distintos hongos ensayados para determinar su poder patógeno fueron los siguientes: *Rhizoctonia solani* (6 aislados), *Macrophomina phaseolina* (1 aislado), *Fusarium oxysporum* (8 aislados), *Fusarium roseum* var. *gibbosum* (*F. equiseti*) (9 aisla-

dos), *Fusarium solani* (5 aislados), *Fusarium moniliforme* (3 aislados), *Pythium* (9 aislados), *Phoma* sp. (6 aislados), *Stemphylium botryosum* (2 aislados). Se llevaron a cabo tres tipos de inoculaciones diferentes para cada uno de los hongos antes nombrados. Inoculación tipo I: se rellenaron las macetas con 0,5 l de vermiculita desinfectada (1 h, 120°C, en autoclave) dando un riego a saturación para humedecer, tras lo cual, se compactó el sustrato para conseguir una mayor consistencia y se sembraron las semillas de puerro de las tres variedades a inocular. Transcurrida una semana y con las ocho plantas de cada maceta claramente emergidas, se añadió el inóculo. Se realizaron controles periódicos cada tres días, durante los 50 días siguientes para evaluar síntomas visibles. Transcurrido este periodo de tiempo se arrancaron las plantas y se pasó a la observación del estado sanitario del disco basal y de las raíces. La inoculación tipo II: consistió en obtener plántulas de las tres variedades en bandejas con capacidad para unas 200 plantas usando como sustrato vermiculita desinfectada (1h, 120°C). Estas plantas se mantu-

vieron durante 50 a 70 días, hasta alcanzar una altura aproximada de 20 cm y un grosor de unos 3 mm de diámetro. Para proceder a la inoculación, se arrancaron las plántulas de las bandejas y agrupándolas en grupos de ocho, se introdujeron en unos contenedores desinfectados donde anteriormente se había añadido la unidad de inóculo. Las raíces de las plántulas permanecieron sumergidas en el inóculo de los contenedores durante una hora, y transcurrido este tiempo fueron trasplantadas a macetas con 0,5 l de vermiculita desinfectada, como se indicó anteriormente. El inóculo sobrante de los contenedores fue vertido, seguidamente, a cada una de las macetas correspondientes. Las lecturas periódicas se hicieron cada tres días, hasta un total de 30 días. Transcurrido este periodo de tiempo se arrancaron las plantas de las macetas y se paso a la observación de su estado sanitario. La inoculación tipo III se desarrolló de igual modo que la inoculación tipo II, pero el tiempo de inmersión de las raíces en el inóculo fue de 24 h. Todos los ensayos fueron realizados en cámara climatizada con una luminosidad de 12000 lux,

Cuadro 1. Sintomatología observada en las plantas de campo y de semillero en raíces, bulbos y hojas.

Síntomas en raíces	
Síntoma 0	Raíz sana, de color blanca y turgente.
Síntoma 1	Podredumbre blanda, raíz vacía por dentro; coloración marrón clara en algunos casos.
Síntoma 2	Meristemo terminal necrosado de color negro.
Síntoma 3	Podredumbre marrón seca y alterna.
Síntoma 4	Podredumbre grisáceo-verdosa de forma aislada en algunas raíces.
Síntoma 5	Raíces de color rosa claro.
Síntoma 6	Raíces engrosadas y corchosas, principalmente en raíces centrales.
Síntoma 7	Lesión deprimida de color rojo intenso.
Síntoma 8	Podredumbre de color violeta, de forma aislada en alguna raíz.
Síntoma 9	Podredumbre rosácea oscura.
Síntomas en bulbos	
Síntoma 10	Podredumbre blanda y de color marrón clara.
Síntoma 11	Podredumbre rosácea oscura.
Síntoma 12	Podredumbre de color rojo intenso.
Síntomas en hojas	
Síntoma 13	Amarillamiento de la hoja más vieja y secado de alguna de éstas.
Síntoma 14	Podredumbre en forma de ojales con colores grisáceos y anaranjados.

mantenida con un fotoperiodo diario de 16 h y una temperatura que osciló entre 26 y 28°C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La sintomatología observada, tanto en las plantas de campo como de semillero, se muestra en el cuadro 1. Asimismo, en la

figura 1, se pueden ver algunos de los síntomas más característicos. En las plántulas de semillero, cabe destacar que el síntoma 1, es el que representa el mayor daño, siendo además el causante de las podredumbres más graves observadas. Conforme las plántulas estaban más desarrolladas se incrementa la presencia de este síntoma 1. Asimismo, destacar cómo el síntoma 6 aparece asociado

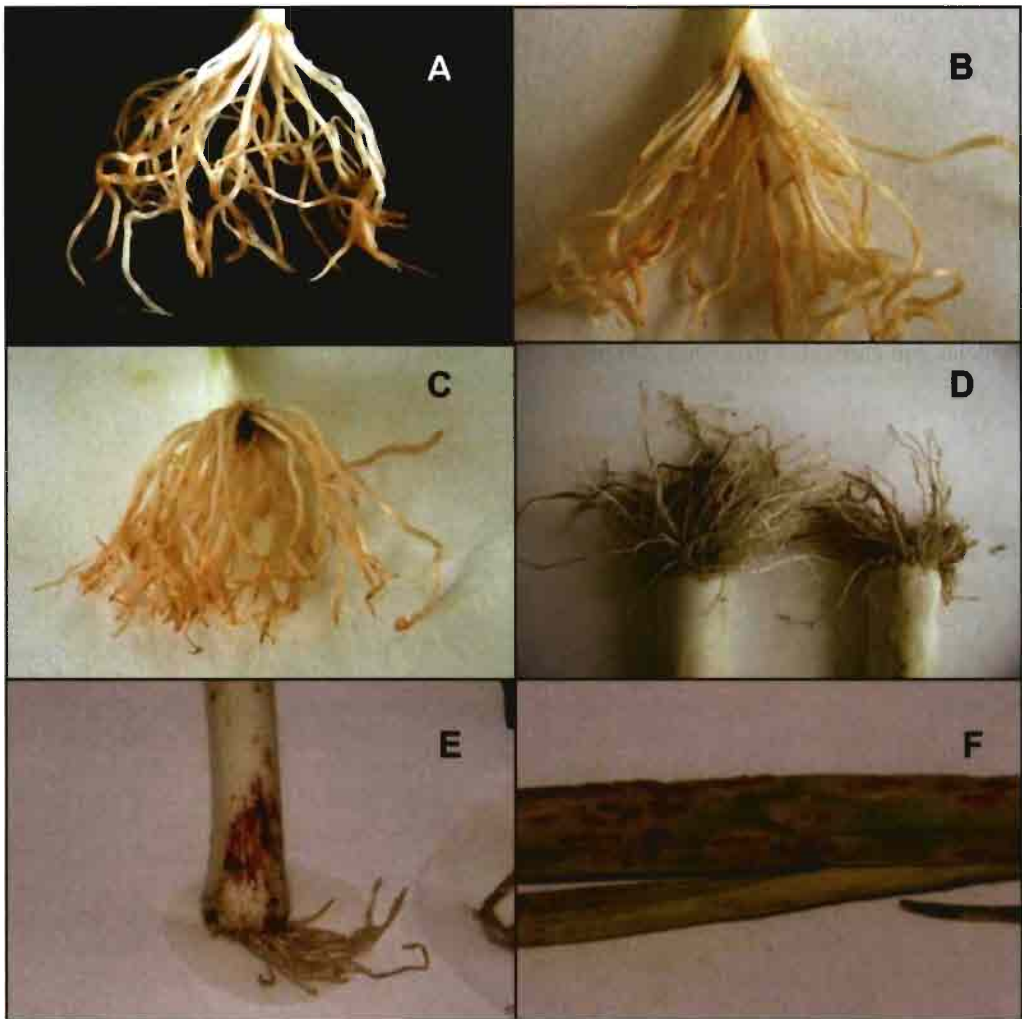


Figura 1. Diversos síntomas en plantas de puerro. A) podredumbre blanda (síntoma 1). B) podredumbre marrón seca (síntoma 3). C) raíces de color rosa claro (síntoma 5). D) podredumbre rosácea oscura (síntoma 9). E) podredumbre de color rojo intenso (síntoma 12). F) ojales anaranjados en hojas (síntoma 14).

Cuadro 2. Análisis de plántulas y plantas con síntomas en raíces. S0 al S9, síntomas descritos en la tabla 1.

Meses	Plántulas analizadas	Plántulas con síntomas									
		S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
Mayo 2003	125	30	8	26	12	1	50	6	2	0	0
Junio	235	19	117	62	8	0	104	41	0	0	0
Julio	160	65	68	19	24	0	13	45	2	0	0
Agosto	220	24	194	58	2	0	4	40	0	0	7
Septiembre	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Noviembre	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Diciembre	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Enero 2004	85	58	20	0	0	0	2	0	0	0	0
Total	825	196	407	165	46	1	173	132	4	0	7
Total (%)		23,8	49,3	20,0	5,6	0,1	21,0	16,0	0,9	0,0	0,8

Meses	Plántulas analizadas	Plántulas con síntomas									
		S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
Mayo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Junio	45	1	43	9	2	0	10	23	0	1	0
Julio	45	2	38	0	1	0	3	19	0	0	0
Agosto	85	0	85	5	3	0	1	31	0	0	7
Septiembre	10	0	10	0	0	0	1	3	0	0	4
Noviembre	57	0	57	0	0	2	1	9	0	1	35
Diciembre	38	0	38	0	0	0	2	2	0	0	22
Enero 2004	30	0	15	0	0	0	4	3	0	0	8
Total	310	3	286	14	6	2	22	90	0	2	76
Total (%)		1,0	92,3	4,5	1,9	0,6	7,01	29,0	0,0	0,6	24,5

normalmente a los casos donde se detecta el síntoma 1. Respecto a los análisis de plantas de campo existe un descenso en el porcentaje de aparición del síntoma 2, un aumento del porcentaje de aparición del síntoma 1, y un incremento considerable en la aparición del síntoma 9 (Cuadro 2, Figura 3). Lo que parece claro es que el síntoma consistente en una podredumbre blanda de las raíces (síntoma 1) es el más generalizado, tanto en las plantas de semillero como en las cultivadas en el terreno de asiento y cualquiera que sea la fecha de muestreo.

Los resultados obtenidos tras el análisis de las raíces de las plántulas y plantas afectadas se muestran en el cuadro 2.

De igual manera que los síntomas, la microbiota fúngica aislada de las raíces difiere poco entre las plantas procedentes de las recogidas en el terreno de asiento (Cua-

dro 3). La presencia de hongos con potencial patógeno sobre el puerro, a tenor de la revisión presentada en este trabajo, es muy escasa por no decir nula. Entre los patógenos citados del género *Allium*, *Macrophomina phaseolina* ha tenido una presencia testimonial. Las especies *Fusarium solani* y *F. roseum*, han sido señaladas como patógenos de las raíces de la cebolla en Israel, Bulgaria e Italia (SMITH *et al.*, 1992) y su poder patógeno en nuestras condiciones se comentan más adelante. De igual manera que se comentará el de *F. moniliforme* (*F. verticilloides*) y de *F. oxysporum*. Esta última especie ha sido la más frecuente en todos los casos y sintomatologías observadas, rebasando su presencia el 75% en las plántulas de semilleros y un 65% en las procedentes del cultivo al aire libre. Ni de *F. moniliforme* ni de *F. oxysporum* hemos encontrado refe-

Cuadro 3. Porcentaje de colonias fúngicas obtenidas de las raíces con podredumbre.

Aislado Género/especie	Plántulas del semillero (Total: 825 plantas)	Plantas del cultivo (Total: 310 plantas)
<i>Alternaria</i> sp.	22,4	12,8
<i>Aspergillus</i> sp.	0,0	0,6
<i>Cladosporium</i> sp.	23,1	6,7
<i>Fusarium moniliforme</i>	6,1	3,7
<i>Fusarium oxysporum</i>	60,3	98,7
<i>Fusarium equiseti</i>	2,5	23,9
<i>Fusarium solani</i>	0,4	13,5
<i>Penicillium</i> sp	17,0	0,0
<i>Phoma</i> sp	14,8	1,2
<i>Pythium</i> sp	7,6	25,7
<i>Rhizoctonia bataticola</i>	0,0	0,6
<i>Rhizoctonia solani</i>	0,0	9,2
<i>Rhizopus</i> sp.	30,7	19,0
<i>Stemphylium</i> sp.	0,0	14,1
<i>Syzygytes</i> sp	4,7	0,0
<i>Trichoderma</i> sp	20,2	0,6

Cuadro 4. Número de colonias fúngicas obtenidas tras el análisis de plántulas de semillero y plantas de campo.

F.o.: *Fusarium oxysporum*; Pho.: *Phoma*; F.r.: *Fusarium roseum*; Pyt.: *Pythium*; Alt.: *Alternaria*; Rhiz.: *Rhizopus*; Pe.: *Penicillium*; Trich.: *Trichoderma*; Syzyg.: *Syzygytes*; Cl.: *Cladosporium*; F.s.: *Fusarium solani*; F.m.: *Fusarium moniliforme*; R.s.: *Rhizoctonia solani*; Asp.: *Aspergillus*; R.bat.: *Rhizoctonia bataticola*; St.: *Stemphyllium*.

		Géneros de hongos detectados							
		F.o.	Pho.	F.r.	Pyt.	Alt.	Rhiz.	Pe.	Trich.
Plántulas		413	51	13	29	94	129	83	78
		Syzyg.	Cl.	F.s.	F.m.	R.s.	Asp.	R.bat.	St.
		17	102	2	23	0	0	0	0
Plantas		F.o.	Pho.	F.r.	Pyt.	Alt.	Rhiz.	Pe.	Trich.
		364	2	51	49	31	38	0	4
		Syzyg.	Cl.	F.s.	F.m.	R.s.	Asp.	R.bat.	St.
	1	11	32	9	27	1	1	29	

rencias que los señalen como patógenos en puerro. Sí en cebolla, donde *F. oxysporum* f.sp. *cepae* ocasiona graves daños en Italia y otros países (MESSIAEN *et al.*, 1991).

La presencia de un hongo del género *Phoma* en los semilleros evocaba a un agente causal de las raíces rosas: *Pyrenochaeta terrestris*, pero su presencia en los cultivos establecidos fue muy puntual y sus caracte-

rísticas morfológicas no coincidían con las descritas para la especie (BERRA LERCHUNDÍ, 1999).

Los demás micromicetos no han aparecido en nuestra revisión bibliográfica con connotaciones patogénicas sobre raíces de puerro, pese a ello *Stemphylium botryosum* fue inoculado. La elevada presencia de *Fusarium oxysporum* en plántulas de semilleros,

Cuadro 5. Número de plantas con síntomas en bulbos y pseudotallos.

Meses	Nº Plantas analizadas	Síntomas		
		S1	S7	S9
Septiembre	8	5	2	2
Noviembre	7	5	1	5
Diciembre	5	4	0	2
Enero	4	3	0	2
Total	24	17	3	11
Total %		70,8	12,5	45,8

motivó ensayos adicionales para conocer su origen. El análisis de las semillas comerciales de las variedades de puerro comercializadas (Lancelot, Nepal y Sabina) no permitieron aislar el hongo y *Alternaria* y *Cladosporium* mostraron en presencia en el 42% de las semillas. Los análisis de dos muestras de turba, correspondientes a los lotes de turba empleadas en el semillero, antes de ser usada como sustrato, no reveló la presencia de *Fusarium* ni de *Pythium*. Sin embargo, una vez analizada para producir plantas, en las 32 muestras analizadas, tanto *F. oxysporum* como *Pythium* se mostraron abundantemente.

Un análisis de las partes verdes de las hojas revelaron la presencia de *Puccinia porri* acompañada de *Stemphylium* sp y *Aspergillus* sp.

Los resultados de las inoculaciones realizadas con 49 aislados de hongos (*Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *Fusarium roseum* var. *gibbosum* (*F. equiseti*), *F. solani*, *Phoma* sp. *Pythium* sp. *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Stemphylium botryosum*, no revelaron en ninguna de las 3528 plantas inoculadas síntoma alguno.

Tampoco, comparando con los testigos, fue posible detectar mermas en el vigor de las plantas. Este comportamiento de diversas especies de *Fusarium* en raíces de especies de *Allium*, especialmente *Fusarium oxysporum* ha sido referido desde antiguo, en la literatura especializada. Así, el agente causal de la raíz rosada de la cebolla fue descrito como *Fusarium malli* (TAUBENHAUS y MALLY, 1917, 1921). Posteriormente, HANSEN (1929) eliminó toda la responsabilidad parasitaria en raíces de cebolla a diversas especies de *Fusarium*. Pese a los años transcurridos lo descrito por Hansen para la cebolla se reproduce en nuestros experimentos, para el puerro y en la bibliografía más actual, como se indicó en la introducción de este artículo.

El trabajo presentado no ha permitido atribuir a ningún hongo de los estudiados, la causalidad de las podredumbres radiculares y decaimiento de las plantas de puerro. Este hecho permite que la planificación sanitaria de las explotaciones agrícolas pueda hacerse con mayor racionalidad. Pero, además, autorizan los resultados a

Cuadro 6. Hongos detectado sen los análisis de bulbos y pseudotallos. Fo.: *Fusarium oxysporum*; Pho.: *Phoma*; Fr.: *Fusarium roseum*; Pyt.: *Pythium*; Alt.: *Alternaria*; Rhiz.: *Rhizopus*; Pe.: *Penicillium*; Trich.: *Trichoderma*; Syzyg.: *Syzygytes*; Cl.: *Cladosporium*; Fs.: *Fusarium solani*; F.m.: *Fusarium moniliforme*; R.s.: *Rhizoctonia solani*; Asp.: *Aspergillus*; R.bat.: *Rhizoctonia bataticola*; St.: *Stemphyllium*.

Bulbos y pseudotallos	Géneros de hongos detectados							
	F.o.	Pho.	Fr.	Pyt.	Alt.	Rhiz.	Pe.	Trich.
	45	0	9	4	3	0	0	0
	Syzyg.	Cl.	Fs.	F.m.	R.s.	Asp.	R.bat.	St.
	2	0	2	0	3	0	0	1

plantear una especulación que puede trascender a las prácticas culturales. Como se indicaba en la introducción, las siembras para obtener plántulas de puerro se hacían en los suelos arenosos de Cádiz y las mismas, a raíz desnuda, se llevaban a los terrenos de asiento al aire libre en Villena (Alicante). En la actualidad, se siembra sobre turba, en bandejas de "poliexpan" con forma troncopiramidal, siendo el modelo empleado el de 384 alvéolos por bandeja, manteniendo las plántulas en semillero hasta conseguir el tamaño adecuado de trasplante en campo. Como sustrato se emplea turbas mezcladas con perlita. Paralelamente, han sido cambiadas las variedades tradicionales por variedades híbridas. Estos cambios en las técnicas de producción han dado lugar la aparición de los síntomas de podredumbre radicular evaluados y descritos en este trabajo. Analizando el sistema, se puede observar, cómo el cepellón en el que son producidas las plántulas, parece dificultar el crecimiento de las raíces. Las muestras examinadas durante los meses de junio, julio y agosto con plántulas que estaban en diferentes estados de desarrollo y la misma fecha de siembra, se observaba en las más desarrolladas como el sistema radicular fasciculado, característico de esta especie, iba formando agrupaciones enmarañadas de raíces en la zona central, y era en estas agrupaciones donde se intensificaban las podredumbres, sobre todo la designada con el síntoma 1 (Cuadro 1, Figura 1), caracterizada por una podredumbre blanda (y con ausencia total de cilindro central) normalmente transparente o marrón clara en algunos casos. Este proceso de descomposición parece agravarse, cuando estas plántulas son transplantadas a terreno definitivo en campo, donde no sólo se produce un estrés por el trasplante sino una excesiva profundidad al trasplantar en suelos muy pesados y excesivamente regados. Observando las plantas de campo se ve en un gran número de casos, cómo la zona central del disco basal había perdido parte del sistema radicular, o no tenía un desarrollo óptimo.

Además, se solía observar cómo en plantas en el campo, las raíces crecían hacia arriba, como intentando salir al exterior, incluso por el interior de las vainas más exteriores de la planta (Figura 2)

Por otro lado, si analizamos estudios recientes sobre el cultivo del puerro en el mundo, aunque en gran parte de las zonas productoras de puerro, se siga utilizando el trasplante, la tendencia actual promovida por las compañías productoras de semillas de puerro más importantes del mundo es la siembra directa. Esta recomendación, junto con la utilización de semillas híbridas da como resultado un mayor rendimiento de la cosecha y una mayor uniformidad del cultivo.

Todos estos hechos y observaciones nos permiten plantear la siguiente hipótesis: El problema detectado en campo no parece deberse directamente a ningún agente patógeno. La coincidencia en el tiempo de la detección del problema con el cambio a variedades híbridas y la producción de planta en semillero junto con la observación del



Figura 2. Estado de las raíces de las plantas en el campo.

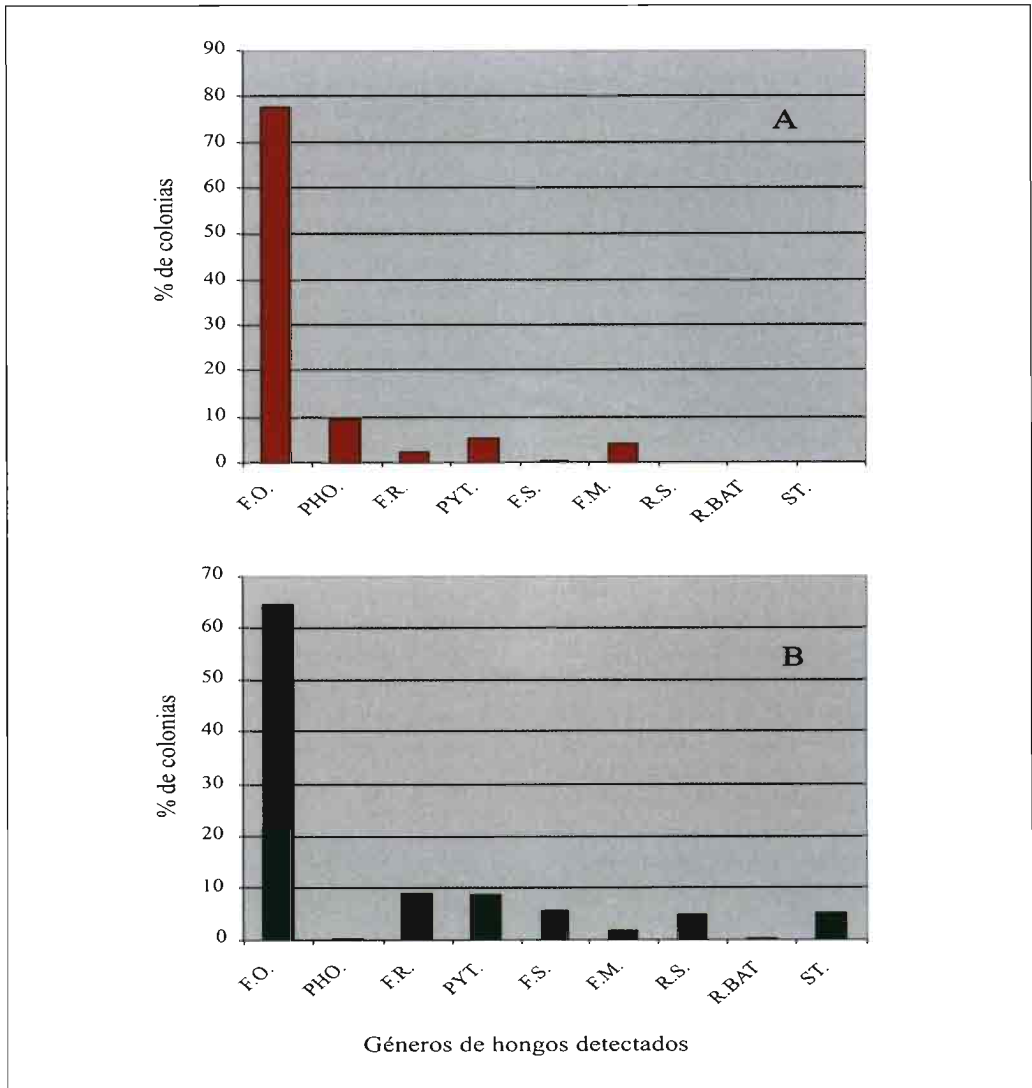


Figura 3. Porcentaje de hongos encontrados en plántulas (A) y plantas de campo (B).

deficiente desarrollo del sistema radicular de las plántulas en cepellón, parece situarnos ante un mal manejo cultural, pues estas nuevas variedades de mayor vigor no parecen adaptarse correctamente a las bandejas de siembra utilizadas, arrastrando de esta forma unas deficiencias que se agravan en campo por un riego excesivo y un mal drenaje, permitiendo así la presencia de ciertos hongos

que cumplen con su papel de descomponedores de los tejidos radiculares muertos o debilitados.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se acoge como proyecto al programa PRODER del Alto Vinalopó (Alicante).



## ABSTRACT

MARTÍNEZ-RESTOY R. E., F. DIÁNEZ, M. SANTOS, M. DE CARA, J. FERRÁNDIZ HERNÁNDEZ, J. C. TELLO. 2006. Fungal microbiota associated with leek root rot in Villena. *Bol. San. Veg. Plagas*, 32: 673-683.

In this paper we present a study of the etiology of root rot in leeks. The study comprises analyses carried out on 825 plants grown in seedbeds on peat substrate and in alveolated trays and on 310 plants from different growing plots in the Villena (Alicante, Spain) fields. In both cases the roots of the plants showed fundamentally a soft rotteness, which sometimes acquired a light brown or pinkish colouring whatever the leek variety (Lancelot, Nepal and Sabina). Sixteen species or genera of fungi were isolated, the most frequent being: *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*), *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Phoma* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Stemphylium botryosum*. A total of 49 of the isolated fungi mentioned were inoculated in seedlings of three leek varieties (Lancelot, Nepal and Sabina) in controlled environmental conditions within an air-conditioned chamber. None of the symptoms observed in the field were replicated in the 3528 plants inoculated using three different techniques. This article presents a possible explanation for the root rot studied, based on the production techniques of plants grown in seedbeds, using alveolated trays with peat substrate and the outdoor crop management on soil.

**Key words:** *Allium porrum*, *Fusarium* sp. *Macrophomina phaseolina*, *Phoma* sp., *Pythium* sp.

## REFERENCIAS

- BARNET, H. L., HUNTER, B. B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company, Minneapolis: 241 pp.
- BERRA-LERCHUNDI, D. 1996. *Phytophthora porri*. Mildiu del puerro. En: Fichas de diagnóstico en laboratorio de organismos nocivos de los vegetales. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, p 62.
- BERRA-LERCHUNDI, D. 1999. *Pyrenochaeta terrestris*. Enfermedad de las raíces rosas. En: Fichas de diagnóstico en laboratorio de organismos nocivos de los vegetales. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, p 196.
- DE ANDRÉS, M. F., GARCÍA-ARENAL, F., LÓPEZ, M. M., MELGAREJO, P. 2000. Patógenos de plantas descritos en España. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, 526 pp.
- ELLIS, M. B., 1961. Dematiaceous hyphomycetes. III. *Mycological Papers*, 82: 1-55.
- ELLIS, M. B. 1976. More dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England: 507 pp.
- GARCÍA-MORATO, M. 2003. Plagas y enfermedades y fisiopatías de la cebolla en la Comunidad Valenciana. Ed: Generalitat Valenciana. Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación. 111 pp.
- HANSEN, N. H. 1929. Etiology of the pink-root disease of onions. *Phytopathology*, 19: 691-704.
- MESSIAEN, C. M., BLANCARD, D., ROUXEL, F., LAFON, R. 1991. Les maladies des plantes maraichères. INRA. París. 551 pp.
- MOHAN, S. K., SCHWARTZ, H. F. 2000. Diseases of onion (*Allium cepa* L.). Common Plant Diseases. Ed. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, 67 pp.
- MUSKETT, A. E., MALONE, J. P. 1941. The Ulster method for the examination of flax seed for the presence of seed-borne parasites. *Ann. Appl. Biol.*, 28: 8-13.
- NELSON, P. E., TOUSSOUN, T. A., MARASAS, W. F. O. 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, Pennsylvania, USA: 193 pp.
- SMITH, I. M., DUNEZ, J., LELLIOTT, R. A., PHILLIPS, D. H., ARCHER, S. A. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid: 671 pp.
- TAUBENHAUS, J. J., MALLY, F. W. 1917. Pink root, a new root disease of onions in Texas. *Phytopathology*, 7: 59.
- TAUBENHAUS, J. J., MALLY, F. W. 1921. Pink root disease of onions and its control in Texas. *Texas Agr. Exp. Sta. Bul.* 273.
- TELLO, J. C. 1984. Enfermedades criptogámicas en hortalizas. Comunicaciones INIA. Servicio de publicaciones agrarias. M.A.P.A.: 342 pp.
- TELLO, J. C., VARÉS, F., LACASA, A. 1991. Análisis de muestras. En: Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos. MAPA, Madrid. pp: 39-72.
- VAN DER PLAT-NITERINK, A. J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology*, 20: 241 pp.

(Recepción: 24 abril 2006)

(Aceptación: 23 junio 2006)



## Acción preventiva y curativa del fosfonato en el control de *Phytophthora cinnamomi* Rands en encina y alcornoque

R. M<sup>a</sup>. NAVARRO CERRILLO, A. I. TERÁN BOCERO, M. E. SÁNCHEZ

El fosfonato es un fertilizante con función de fungicida sistémico que ha sido utilizado con éxito en el control de *P. cinnamomi* en varias especies forestales. El objetivo principal de este trabajo es estudiar el efecto preventivo y curativo de la aplicación de fosfonato en brinzales de *Quercus ilex* y *Quercus suber* en el control de *Phytophthora cinnamomi*. El diseño experimental se realizó para verificar si el fosfonato es capaz de prevenir y/o controlar la infección de *P. cinnamomi*, por lo que se optó por un ensayo multifactorial con dos factores, el tipo de fosfonato, y el momento de aplicación. A lo largo del ensayo se midió la altura de la parte aérea, el diámetro del cuello de la raíz, y el peso seco de la raíz secundaria, así como la fluorescencia de la clorofila.

La altura y el diámetro al final del ensayo no mostraron diferencias significativas entre tratamientos tanto para encina como para alcornoque, siendo más sensible el peso de la raíz secundaria. El control inoculado presentó los valores menores de fluorescencia relativa, frente al resto de tratamientos, indicando un mayor estrés. Los tratamientos con fosfonatos y el control presentaron valores superiores. Los resultados de este trabajo parecen confirmar el efecto positivo de los fosfonatos en el control de *Phytophthora* en especies del género *Quercus*.

R. M<sup>a</sup>. NAVARRO CERRILLO, A. I. TERÁN BOCERO. Dpto. Ingeniería Forestal, ETSIAM. Universidad de Córdoba.

M. E. SÁNCHEZ. Grupo de Patología Agroforestal, ETSIAM. Universidad de Córdoba. irInacer@uco.es; Apartado de Correos 3048 (14080 Córdoba-España). Teléfono: 34-957-218657; Fax: 34-957-218563

**Palabras clave:** *Quercus ilex*, *Q. suber*, decaimiento forestal, tratamiento.

### INTRODUCCIÓN

El principal problema fitosanitario de las masas de *Quercus* en la península ibérica es la afección de la "seca" de encina y alcornoques, que daña gravemente a un gran número de dehesas y bosques desde comienzos de los años 80 (RUPÉREZ y MUÑOZ, 1980). La etiología de la seca parece tener un origen multi-causal, es decir, que en las masas afectadas se da la confluencia de varios factores más o menos conocidos que parecen interactuar entre sí. El proceso se explica actualmente según un modelo que comprende tres tipos de factores: factores de predisposición (crean

una situación de pérdida de vigor que se va manifestando con gran lentitud), factores de incitación o detonadores (actúan en un periodo corto de tiempo y dejan a las masas en una situación de enorme fragilidad) y factores de contribución o catalizadores (son causa directa de la muerte de los árboles). Sin embargo, en muchos casos el diagnóstico de las zonas afectadas ha permitido identificar agentes causales únicos, siendo el caso más frecuente la presencia de *Phytophthora cinnamomi* Rands (SÁNCHEZ *et al.*, 2003).

*Phytophthora cinnamomi* Rands es un hongo Oomiceto de la familia de los Phy-

tophthoraceae y está considerado uno de los parásitos de plantas leñosas más agresivo y destructivo del mundo (BRASIER *et al.*, 1993), cuya patogenicidad en encina y alcornoque se demostró en 1996 (TUSET *et al.*, 1996) aunque sus ataques a estas especies ya se conocían desde 1991 (BRASIER *et al.*, 1993). Es un parásito facultativo que puede vivir en el suelo, de carácter acuático hasta que infecta las raíces del huésped. El proceso de infección tiene lugar cuando hay agua libre en el suelo y su temperatura es relativamente alta (BRASIER *et al.*, 1993). Cuando el hongo penetra en la planta se multiplica rápidamente, produciendo zoosporas infectivas que alcanzan raíces adyacentes, bajo condiciones de saturación hídrica del suelo (COFFEY, 1991).

El control de la enfermedad se basa en impedir la infección y limitar la dispersión mediante medidas culturales, biológicas y químicas (HARDY *et al.*, 2001). Entre las medidas culturales se propone la eliminación de los pies infectados, el acotamiento de zonas afectadas y sobre todo la desinfección de las herramientas para las labores al suelo. La lucha biológica consiste en el empleo de organismos antagonistas, habiéndose empleado *Trichoderma* spp y *Mycothecium verrucaria* (PÉREZ *et al.*, 1990). Los procedimientos químicos son muy diversos: pulverización de la copa del árbol infectado con fungicidas y abonos foliares (GARCÍA y POZO, 1993); inyecciones en el tronco del árbol enfermo (FERNÁNDEZ-ESCOBAR *et al.*, 1994), y la aplicación de fosfonatos a las plantas y el suelo (FAIRBANKS *et al.*, 2000; NAVARRO *et al.*, 2004).

El fosfonato es un fertilizante con función de fungicida sistémico que ha sido utilizado con éxito en el control de *P. cinnamomi* en varias especies forestales (WILKINSON *et al.*, 2001) y también en especies mediterráneas (NAVARRO *et al.*, 2004). El fosfonato se trasloca a través tanto del floema como del xilema, y una vez dentro del floema es traslocado a través de la planta en relación con los foto-asimilados (GUEST y GRANT, 1991), mostrando una mayor concentración en las

raíces y ramillos terminales. El mecanismo mediante el cual los fosfonatos protegen a estas especies de la acción del hongo no se conoce suficientemente, aunque parece que están relacionados con la acumulación de compuestos fenólicos (CANDELA *et al.*, 1995).

El objetivo principal de este trabajo es estudiar el efecto preventivo y curativo de la aplicación de fosfonato en brinzales de *Quercus ilex* y *Quercus suber* en el control de *Phytophthora cinnamomi*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

El material vegetal utilizado en este trabajo fueron brinzales de encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) y de alcornoque (*Quercus suber* L.), de procedencia Sierra Morena Occidental (Región 11 Extremadura). El cultivo de la planta se realizó en el umbráculo de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes (ETSIAM) de la Universidad de Córdoba. Al final de la fase de cultivo en vivero, y previamente al trasplante a los envases definitivos, la planta de encina presentaba una altura de  $35,58 \pm 1,33$  cm., y un diámetro en el cuello de la raíz de  $5,42 \pm 0,64$ , y los de alcornoque tenían una altura de  $35,8 \pm 2,88$ , y un diámetro de  $3,58 \pm 0,27$ .

### *Diseño experimental*

El diseño experimental se realizó para verificar si el fosfonato es capaz de prevenir y/o controlar la infección de *P. cinnamomi*, por lo que se optó por un ensayo multifactorial con dos factores. El primer factor hace referencia al tipo de fosfonato utilizado como fungicida, seleccionándose el Brifos-K (50%) (Panreac) y un fosfonato elaborado que se preparó mezclando 2,8 g/100 ml de ácido fosforoso y 2,8 g/100 ml de KOH. El segundo factor hizo referencia al momento de aplicación del tratamiento con dos niveles, un tratamiento preventivo (anterior a la inoculación) y un tratamiento curativo (posterior a la inoculación) de *P. cinnamomi*. Se

incluyen dos controles, uno regado con agua y otro inoculado de *Phytophthora cinnamomi*, lo que supone seis tratamientos por especie. El número de plantas utilizado en el ensayo fue de 60 para encina y 36 para alcornoque.

El día 11 de Marzo de 2004 se empezó con el tratamiento preventivo. Este tratamiento consistió en aplicar Brifos-K (50%) y la solución preparada de fosfonato en 10 encinas y 6 alcornoques por tratamiento. Para tratar a la totalidad de las plantas se utilizó una pistola dosificadora que permite aplicar la solución sobre las hojas. Se hicieron dos repeticiones en las cuales se pulverizaba las hojas con el producto hasta gotear, se dejaba secar y se volvía a pulverizar. Los días 12 y 13 de Marzo de 2004 las plantas fueron inoculadas con *Phytophthora cinnamomi* en condiciones controladas. A partir del día 14 de Marzo en adelante se empezó a tener un control de riego de todas las plantas inoculadas. El tratamiento curativo, se realizó el día 26 de Marzo de 2004, mediante la aplicación a 10 encinas y 6 alcornoques de Brifos-K y la solución de fosfonato en iguales condiciones que el tratamiento preventivo.

La inoculación se realizó mediante la aplicación a los cepellones de las plantas de una suspensión acuosa de micelio y clamidosporas (SÁNCHEZ *et al.*, 2000, 2003). El inóculo se obtuvo a partir del *P. cinnamomi* (PE-90) caracterizado y conservado en la micoteca del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba. El inóculo se preparó batiendo en agua estéril el micelio de PE 60 producido en medio de extracto de zanahoria (SÁNCHEZ *et al.*, 2003) durante un mes a 20° C en oscuridad, tras ser separado del medio nutritivo y lavado en agua estéril. La presencia de abundantes clamidosporas se comprobó mediante la preparación de montajes microscópicos de pequeñas cantidades de inóculo teñidas con fucsina ácida en lactofenol al 0,005%, y su posterior observación al microscopio óptico. La concentración del inóculo correspondió a la biomasa producida en 3 placas de Petri/100 ml de agua. Para la inoculación se añadieron

100 ml de esta suspensión al cepellón de cada plantón a inocular, cuidando de que su distribución fuese homogénea (SÁNCHEZ *et al.*, 2000). Los plantones inoculados se transplantaron a macetas individuales Teku-Tainer (150 x 150 x 200 mm) previamente desinfectadas con lejía comercial diluida al 10%. El sustrato necesario para completar el volumen de los nuevos envases fue una mezcla formada por turba, arena y limo (1:1:1 en volumen). El suelo no era estéril, aunque la arena y el limo habían sido previamente desinfectados. Las plantas testigo no inoculadas fueron tratadas de la misma manera, añadiendo a sus cepellones 100 ml de agua estéril libre de material fúngico.

Una vez realizados los tratamientos, todas las macetas se colocaron en bandejas, de forma que en cada bandeja sólo hubiese plantones inoculados con el mismo tratamiento y el mismo tipo de inóculo. Las plantas testigo se colocaron en bandejas separadas. Posteriormente se añadió agua a todas las bandejas, de forma que el nivel se situara en unos 5 cm por debajo del borde de las macetas. Las plantas permanecieron encharcadas dos días dentro de las bandejas y el resto de días se sacaban de las mismas, así durante tres meses hasta que empezaron a mostrar alguna sintomatología evidente de afectación.

Las plantas fueron colocadas en el invernadero de la ETSIAM (Córdoba) donde permanecieron hasta el final del ensayo, que se extendió desde marzo hasta mitad de julio de 2004. El invernadero permitía un mejor control de la temperatura y de la humedad, que son factores fundamentales para el desarrollo de *Phytophthora cinnamomi*, el aislado PE 90 tiene una temperatura óptima de crecimiento de 25,2°C (SÁNCHEZ *et al.*, 2003). Durante todo el ensayo se mantuvo un programa de riego constante para mantener hidratado el sustrato.

#### *Variables morfológicas*

A lo largo del ensayo se midió en tres ocasiones la altura de la parte aérea, y el diámetro del cuello de la raíz. Los días 28 y 29 de

julio de 2004 se procedió a levantar el ensayo. El desarrollo de la raíz secundaria y/o los daños producidos en ella por *Phytophthora cinnamomi*, se evaluó a través del peso seco. Las raíces de las plantas se lavaron cuidadosamente con agua para eliminar cualquier resto de sustrato, pero evitando dañar las raicillas para no producir pérdida de biomasa radical. Todo el material vegetal se introdujo en sobres de papel y éstos en una estufa de convección natural para desecación (P SELECTA), en la que permanecieron durante 76 horas a una temperatura de 65°C hasta peso constante. Cada fracción de la planta (hojas, tallo y raíz) fue pesada en una balanza de precisión Mettler Toledo PB203 (Máx. = ± 310g, min. = ± 0,02 g, e = ± 10 mg, d = ± 1 mg). Los datos registrados fueron el peso seco de la parte aérea y el peso seco de la raíz secundaria.

#### *Medición de la fluorescencia.*

La fluorescencia de la clorofila se determinó utilizando un fluorímetro *Plant Efficiency Analyser* (PEA, Hansatech, Reino Unido). La fluorescencia basal ( $F_0$ ) se midió con una luz de 650  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , y para obtener la emisión máxima de fluorescencia ( $F_m$ ), se aplicó un pulso saturante de 10.000  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y un segundo de duración. Se usaron unas pinzas especiales, que forman parte del equipo del fluorímetro, para el periodo de adaptación a la oscuridad (30 minutos) que permite obtener el máximo grado de oxidación de la quinona A ( $Q_A$ ). Se determinó la relación entre la fluorescencia variable ( $F_v$ ) y la máxima ( $F_m$ ):  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ ; según STRASSER *et al.* (2000). La razón  $F_v/F_m$  es proporcional a la eficiencia fotoquímica máxima de las hojas, y es una de las variables más empleadas por numerosos autores en estudios de respuesta a estrés. La medición de la fluorescencia se realizó en dos ocasiones, 29 de Abril y 26 de Julio de 2004. Las mediciones se realizaron al mediodía, (12:00 hora solar) en cuatro plantas por tratamiento y especie, y se ha medido siempre en la misma hoja seleccionada en el tercio medio de cada planta.

#### *Análisis de datos*

El análisis estadístico se inició con la comprobación de que los datos cumplen el requisito de normalidad y la homogeneidad de la varianza (homocedasticidad). La normalidad se ha comprobado mediante el test de Komologorov-Smirnov, y la homocedasticidad por el test de Levene. Una vez realizada la comprobación de los requisitos básicos de los datos, se ha procedido a un análisis de la varianza (ANOVA) para las variables normalizadas. Cuando el análisis de la varianza fue significativo se realizó un test de Tukey de comparación múltiple de las medias para un nivel de significación del 5% ( $P \leq 0,05$ ). Los resultados se presentan en las tablas y en las figuras como media y error estándar de cada tratamiento.

## RESULTADOS

#### *Altura y diámetro*

La altura y el diámetro al final del ensayo no mostraron diferencias significativas entre el control, el control inoculado (*P. cinnamomi*) y los distintos tratamientos tanto para encina como para alcornoque. Las alturas medias obtenidas para cada uno de los tratamientos de encina durante el ensayo oscilaron entre el valor máximo de Brifos Preventivo (BP) ( $h=28$  cm) y el valor mínimo de *Phytophthora* ( $h=22,3$  cm). Tras el análisis de la varianza ANOVA realizado ( $F=1,315$ ,  $P=0,272$ ), no se observaron diferencias significativas entre las distintas medias, por lo que no se distinguió grupos estadísticamente diferentes. No obstante, se observa una reducción del crecimiento de la parte aérea en el tratamiento *P. cinnamomi*.

El máximo diámetro medio correspondió al Control ( $d_{cr}=6,1$  mm), mientras que el valor mínimo medio de este atributo fue obtenido para *Phytophthora* ( $d_{cr}=5$  mm) aunque tampoco para este atributo las diferencias no fueron significativas al igual que ocurre con las alturas ( $F=1,442$ ,  $P=0,224$ ), aunque se mantuvo la tendencia a una pérdida de crecimiento en diámetro del tratamiento de *P. cinnamomi*. También debe destacar-

se la reducción en diámetro de los tratamientos curativos frente a los tratamientos preventivos. En el caso del alcornoque los valores de altura oscilaron entre un máximo alcanzado por *Phytophthora* (h=44,1 cm) y un mínimo valor que lo presenta el tratamiento FP (h=33,9 cm). Las diferencias no fueron significativas (F=0,644, P=0,668). El diámetro también sigue una evolución similar, sin que se detecten diferencias significativas (F=0,741, P=0,599). El Control es el que presenta un valor de diámetro más alto (dcr=5,5 mm) mientras que es el FC el que presenta un valor mínimo (dcr=4 mm). En el alcornoque la respuesta a la inoculación no parece producir un efecto depresor de la altura y el diámetro tan evidente frente a los tratamientos con fosfonatos.

#### *Pesos secos*

Los pesos secos de parte aérea no presentaron diferencias significativas. El valor máximo y mínimo de las medias tanto para encina como para alcornoque lo alcanzó el tratamiento Control y el tratamiento *Phytophthora* respectivamente. En el caso de la encina (F=2,189, P=0,069), el valor máximo de la media para el Control presenta un valor de peso seco aéreo de 5,2 g y el valor mínimo correspondiente a *Phytophthora* con de 3,3 g. El alcornoque tampoco presentó diferencias significativas (F=0,621, P=0,685), correspondiendo el valor máximo también al control con un valor de peso seco aéreo de 6,4 g y el valor mínimo al control inoculado con *Phytophthora* (peso de 4 g). Al igual que con los anteriores atributos morfológicos, los

pesos secos parecen indicar una reducción del crecimiento para el tratamiento inoculado, frente a los tratamientos con fosfonatos. Por otro lado, y aunque con diferencias entre especies y tratamientos, parece mantenerse la tendencia de un mayor peso seco de los tratamientos preventivos frente a los curativos.

En cuanto a los valores de la raíz secundaria para encina se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos (F=4,309, P=0,01) (Cuadro 1). El tratamiento Brifos K preventivo (peso seco raíz secundaria de 5,5 g) alcanzó el máximo valor con respecto al resto de tratamientos, presentando el resto de los tratamientos con fosfonatos valores intermedios de aproximadamente 3,4 g. El valor mínimo correspondió al control inoculado con *Phytophthora* (2,7 g). En el caso del alcornoque también se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (F=3,004, P=0,017). El valor máximo de raíz secundaria lo presentó también el tratamiento Brifos K preventivo (10,9 g) y el valor mínimo correspondió también al control inoculado (3,9 g). El resto de tratamientos presentan valores intermedios ( $\approx$  6 g), con un valor ligeramente inferior para el caso del tratamiento con fosfonato curativo (4,6 g) (Cuadro 1).

#### *Medición de la fluorescencia*

En el caso de la encina (Figura 1) se observa como los valores de la relación Fv/Fm fueron menores en la segunda medición en todos los tratamientos. En la segunda medida las diferencias fueron estadísticamente significativas, siendo el control el que

Cuadro 1. Peso seco de raíz secundaria y error típico para cada tratamiento de *Quercus ilex* y *Q. suber* al final del ensayo. Letras iguales indican pertenencia a un mismo subconjunto según el método para comparaciones múltiples de Tukey para un nivel de significación de 0,05.

Tratamiento	<i>Quercus ilex</i>	<i>Quercus suber</i>
Control	4,87 (0,27)ab	6,65 (0,89)ab
Control inoculado	2,71 (0,47)c	3,99 (0,63)b
Brifos K preventivo	5,53 (1,41)a	10,97 (4,38)a
Brifos K curativo	3,37 (0,79)abc	6,08 (2,22)ab
Fosfonato preventivo	3,53 (0,79)abc	5,99 (0,67)ab
Fosfonato curativo	3,50 (1,77)abc	4,68 (0,78)b

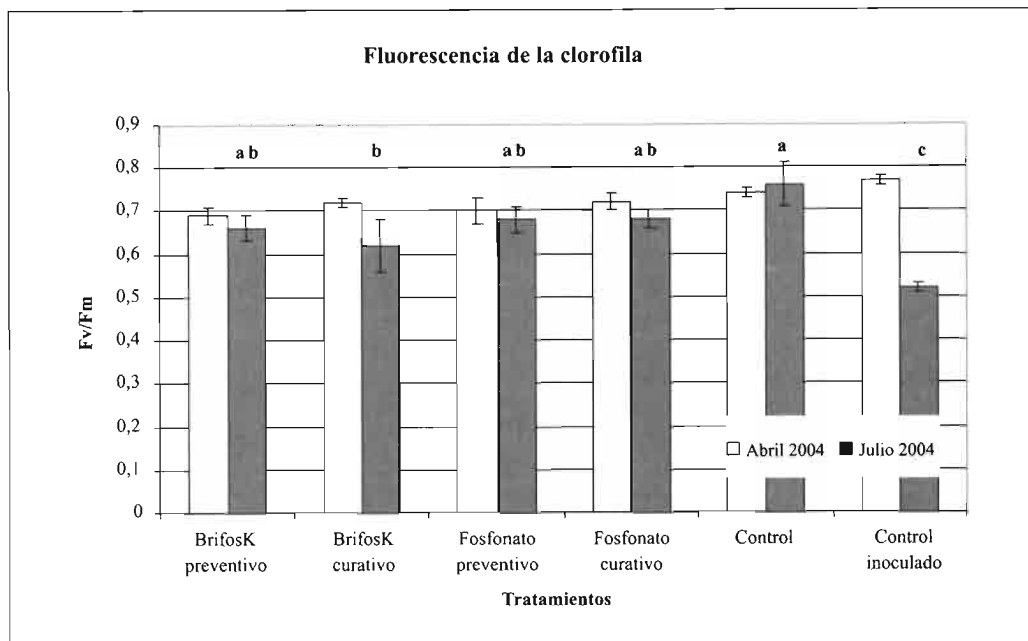


Figura 1. Valor medio de  $F_v/F_m$  y error típico para cada tratamiento de *Quercus ilex* en las dos mediciones realizadas durante los días 29 de abril y 26 de julio. Letras iguales indican pertenencia a un mismo subconjunto según el método para comparaciones múltiples de Tukey para un nivel de significación de 0,05.

presentó un nivel mínimo de estrés ( $F_v/F_m = 0,75$ ) ( $F = 3,620$ ,  $P = 0,008$ ). Comparando entre tratamientos se ve como el descenso fue mucho mayor en el caso del control inoculado con *Phytophthora* (0,52), mientras que el control no inoculado presentó un descenso muy poco acusado. Los tratamientos con fosfonatos presentaron en todos los casos un patrón similar ( $F_v/F_m \approx 0,64$ ), excepto para Brifos-K curativo (0,56) que tuvo valores similares al control inoculado.

En el alcornoque (Figura 2) también se produjo un aumento progresivo del estrés en todos los tratamientos, y por tanto una disminución del valor de la fluorescencia relativa entre la medida de julio respecto a abril, excepto en el tratamiento Brifos Preventivo ( $F_v/F_m \approx 0,70$ ) en el cual se observó que la relación  $F_v/F_m$  fue casi idéntica en ambas medidas. En la medición de abril todos los tratamientos presentaron un valor similar ( $F_v/F_m \approx 0,70$ ), con un ligero incremento en

el caso del control inoculado con *Phytophthora* ( $F_v/F_m \approx 0,73$ ), aunque las diferencias no fueron significativas ( $F=0,39$ ,  $P=0,846$ ). La medición de fluorescencia durante la segunda medición mostraron diferencias significativas entre tratamientos ( $F=7,56$ ,  $P<0,001$ ). Al igual que con la encina, el control inoculado presentó los valores menores de fluorescencia relativa ( $F_v/F_m=0,57$ ), frente al resto de tratamientos. Los tratamientos con fosfonatos y el Control presentaron valores de  $F_v/F_m$  superiores a 0,67, excepto el Brifos-K curativo que tuvo valores menores ( $F_v/F_m=0,63$ ), próximos al tratamiento control inoculado.

## DISCUSIÓN

Recientemente, el fungicida fosfonato, ha demostrado su eficacia en el control de daños de *P. cinnamomi* en brinzales de especies mediterráneas europeas (NAVARRO *et al.*,



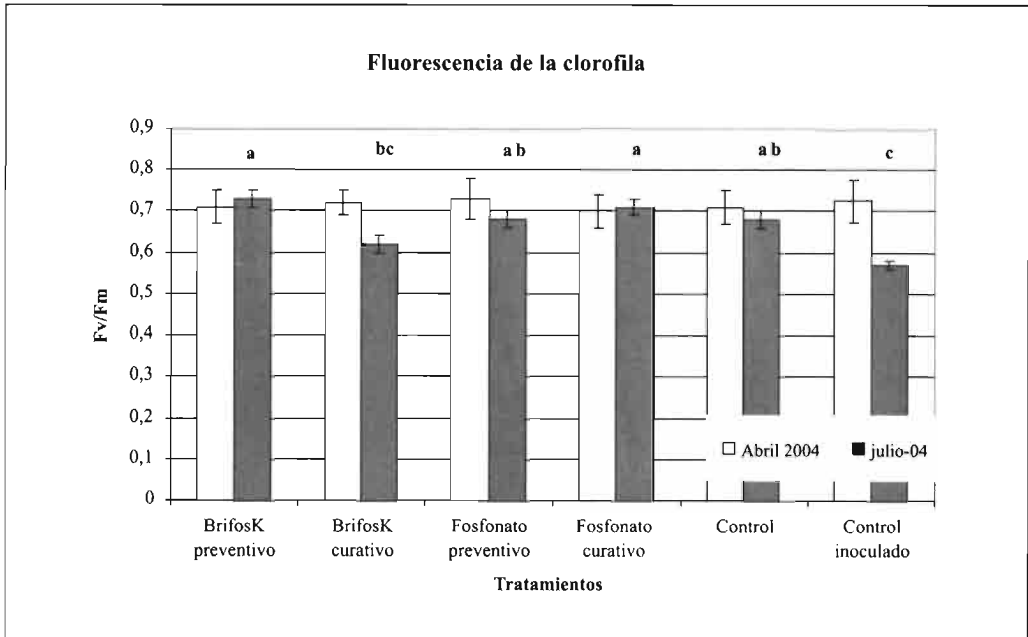


Figura 2. Valor medio de Fv/Fm y error típico para cada tratamiento de *Quercus suber* en las dos mediciones realizadas durante los días 29 de abril y 26 de julio. Letras iguales indican pertenencia a un mismo subconjunto según el método para comparaciones múltiples de Tukey para un nivel de significación de 0,05.

2004). El fosfonato es un fertilizante que actúa como un fungicida sistémico, el cual es trasladado en la planta a través del xilema y del floema y es trasladado a través de la planta en asociación con los foto asimilados en una relación fuente-sumidero (GUEST y GRANT, 1991). Los foto asimilados, y de la misma manera el fosfonato, parecen concentrarse más en las partes de la planta que presentan un mayor crecimiento, tales como las raíces finas y los crecimientos apicales (WHILEY *et al.*, 1995).

En este trabajo se ha evaluado la eficacia de dos tratamientos de fosfonatos (Brifos-K y fosfonato elaborado) con carácter preventivo y curativo en la encina y el alcornoque. La respuesta a estos tratamientos se ha estudiado a través de atributos morfológicos y fisiológicos. La morfología de los brinzales no se vio afectada significativamente tras la fertilización con fosfonatos, lo que coincide con los resultados obtenidos en ensayos previos

(BROWN, 2002; NAVARRO *et al.*, 2004), aunque las concentraciones empleadas han sido muy inferiores a las recomendables para especies forestales (HARDY *et al.*, 2001) y la duración del ensayo fue sólo de siete meses. Los incrementos de alturas y diámetros, no manifestaron diferencias significativas entre el control, y ninguno de los diferentes tratamientos incluido el control inoculado. Estudios realizados con ejemplares adultos muestran que la infección de *P. cinnamomi* produce parada de crecimiento y pérdidas de biomasa aérea (MAUREL *et al.*, 2001). Sin embargo, la falta de efecto en este caso puede deberse a que en los brinzales de *Quercus*, especialmente en la encina, se puede explicar porque éstas se producen en fases avanzadas de la enfermedad, y en este ensayo la duración total fue sólo de siete meses. El escaso crecimiento del diámetro y de la altura, dificultarían apreciar diferencias asociadas a la podredumbre radical en las fases iniciales de la enfermedad.

El atributo morfológico más afectado por la inoculación con *P. cinnamomi* fue el peso seco de la raíz secundaria. El análisis de la biomasa radical secundaria mostró diferencias significativas entre los tratamientos, tanto en encina como en alcornoque, aunque la separación entre grupos no fue muy clara. *P. cinnamomi* actúa sobre el sistema radical en general, pero especialmente sobre las raicillas finas (MARKS y SMITH, 1992). Los resultados obtenidos indican que el hongo sí infectó el sistema radical, aunque no se mostraran síntomas aéreos. En ambas especies, el tratamiento Brifos K preventivo alcanzó una mayor biomasa de raíz secundaria frente al control, lo que indica que *P. cinnamomi* no ha causado daños en el sistema radical de los brinzales que han recibido este tratamiento. Estos resultados coinciden con las experiencias de control de *P. cinnamomi* mediante fosfonato realizadas por otros autores (WILKINSON *et al.*, 2001; TYNAN *et al.*, 2001). Los tratamientos Brifos curativo, fosfonato preventivo y fosfonato curativo presentan entre ellos unos valores muy parecidos y ligeramente más bajos que el control, por lo que parece que el efecto protector ha sido menor, en particular en el caso del alcornoque. En conjunto para esta especie, no se ha producido una diferencia tan clara entre el desarrollo del control y el resto de tratamientos en términos de biomasa de raíz secundaria. La diferencia es mayor en el caso de la encina, por lo que parece confirmarse los resultados de RODRÍGUEZ MOLINA *et al.* (2002), que señalan a la encina como más sensible a *P. cinnamomi*, si bien, hay que tener en cuenta que en ese trabajo se trataba de ejemplares adultos, mientras que en este ensayo se trabajó con brinzales.

La fluorescencia de la clorofila permite estudiar las limitaciones a la fotosíntesis de origen no estomático (WERNER *et al.*, 2001). La fluorescencia relativa  $F_v/F_m$  es un índice adecuado para la evolución del nivel de estrés de una planta (STRASSER *et al.*, 2000). El parámetro más frecuentemente utilizado es la relación  $F_v/F_m$  (STRASSER *et al.*, 2000). Los valores de la fluorescencia entre los días de medición (29 de abril y 26 de julio) en

este trabajo presentaron un descenso de la relación  $F_v/F_m$  en todos los tratamientos. Esto indica que el estrés aumentó con la llegada del verano, y el incrementó de la demanda hídrica de las plantas, encontrándose diferencias significativas entre tratamientos en la segunda medición. En la encina, los valores de fluorescencia ( $F_v/F_m$ ) disminuyeron a medida que progresó el ensayo y la planta aumentó su nivel de estrés. El control inoculado con *Phytophthora*, junto con el tratamiento Brifos K curativo presentaron un nivel máximo de estrés, aunque las diferencias fueron muy pequeñas respecto al resto de los tratamientos. Por otra parte, el resto de tratamientos mantuvieron unos niveles de estrés menor, presentando el control en julio un nivel de estrés moderado. En el alcornoque los valores de fluorescencia ( $F_v/F_m$ ) variaron de forma parecida a la encina. El control inoculado con *Phytophthora* alcanzó el valor máximo de estrés, seguido del tratamiento Brifos K curativo, presentando el resto de tratamientos un valor de estrés moderado. Los resultados de fluorescencia obtenidos parecen corroborar los resultados obtenidos para raíz secundaria, pudiéndose establecer una relación entre afectación al sistema de raíces finas de la planta y nivel de estrés hídrico expresado a través de la fluorescencia relativa.

La efectividad de los fosfonatos parece que aumenta cuando se aplica con carácter preventivo, aunque MARKS y SMITH (1992) encontraron un efecto positivo en la reducción de daños de *P. cinnamomi* en *Leucadendron* cuando se hacen los tratamientos de forma simultánea a la infección, e incluso se ha documentado el efecto protector de los fosfonatos cuando se aplican 24 horas después de la infección (ROHRBACH y SCHENCK, 1985). En este trabajo los fosfonatos como tratamiento preventivo parecen haber contribuido a controlar la acción de *P. cinnamomi*, en particular cuando se ha utilizado Brifos-K con carácter preventivo. La escasa diferencia de tiempo entre el tratamiento curativo y la infección parece demostrar que el uso de fosfonato protege a la raíz de la invasión del patógeno.

no de forma casi inmediata, debido posiblemente a la rápida actividad del fosfonato (GUEST y GRANT, 1991). Aunque en este trabajo no se han medido las concentraciones de fosfonato en ningún tejido vegetal, parece que la protección del fosfonato podría estar relacionada con una rápida traslocación desde las hojas a la raíz. Sin embargo, DAVIS (1989) encontró que el efecto del fosfonato decrece cuando el intervalo de tiempo entre el tratamiento y la inoculación aumenta por lo que los tratamientos curativos pueden ser poco eficaces. La protección frente a *Phytophthora parasitica* fue mínima cuando el tratamiento de fosfonato se aplicó 3-4 semanas después de la inoculación, incluso cuando se hicieron aplicaciones múltiples (DAVIS, 1989).

Los resultados de este trabajo parecen confirmar el efecto positivo de los fosfonatos en el control de *Phytophthora* en especies del género *Quercus*. En cuanto al tiempo que dura la acción protectora del fosfonato, diversos autores la sitúan alrededor de los 6 meses, aunque varía con muchos factores (WILKINSON *et al.*, 2001). En este caso, entre el tratamiento preventivo y la inoculación pasaron pocos días, pero el efecto se mantuvo durante los 7 meses que duró el ensayo. El carácter

preventivo observado en este ensayo parece recomendar el uso de la fertilización con fosfonatos en especies del género *Quercus* dada el efecto preventivo contra daños de *P. cinnamomi*, de acuerdo a lo que se viene realizando con otras especies forestales. Su efecto en individuos adultos, y posteriormente en masas naturales y repoblaciones, deben ser estudiados, ajustando las dosis adecuadas para evitar problemas de fototoxicidad (WILKINSON *et al.*, 2001), y desarrollando los procesos operativos más adecuados para su aplicación en campo de forma sencilla y económica (HARDY *et al.*, 2001).

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado con el apoyo del Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía a través del Convenio *Seguimiento de los daños de seca sobre masas de Quercus en Andalucía. Propuesta de soluciones*, y los proyectos AGL2002-00530. Bases biológicas, epidemiológicas y selvícolas para el control de las principales enfermedades asociadas a la seca de los *Quercus* en Andalucía.

## ABSTRACT

NAVARRO CERRILLO R. M<sup>a</sup>, A. I. TERÁN BOCERO, M. E. SÁNCHEZ. 2006. Preventive and curative effect of the application of phosphonate in the control of *Phytophthora cinnamomi* Rands in holm and cork oak seedlings. *Bol. San. Veg. Plagas*, 32: 685-694.

Phosphonate is a fertilizer with a systemic fungicidal function, which has been successfully used in the control of *P. cinnamomi* in several forest species. The main objective of this work was to study the preventive and curative effect of the application of phosphonate in seedlings of *Quercus ilex* and *Quercus suber* in the control of *Phytophthora cinnamomi*. The experiment was designed so as to verify if the phosphonate was capable of preventing and/or controlling *P. cinnamomi* infection, for which a multifactorial assay was opted for with two factors, the type of phosphonate and the moment of application. Throughout the trial, measurements were made of the aerial part, the diameter of the root neck and the dry weight of the secondary root, as well as the chlorophyll fluorescence.

At the end of the experiment no significant differences were observed in height or diameter between treatments, either for the ilex or the cork oak, the secondary root weight being the most sensitive. The inoculated control had the lowest relative fluorescence values compared to the rest of the treatments, indicating greater stress. The treatments with phosphonates and the control showed higher values. The results of this work seem to confirm the positive effect of phosphonates in the control of *Phytophthora* in species of the genus *Quercus*.

**Key words:** *Quercus ilex*, *Q. suber*, forest decline, treatment.

## REFERENCIAS

- BRASIER, C. M., ROBREDO, F., FERRAZ, J. F. P. 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. *Plant Pathology*, **42**: 140-145.
- BROWN, K. R. 2002. Effects of Phosphorus Additions on growth, mineral nutrition, and gas exchange of Red Alder (*Alnus Rubra*) seedlings grown in outdoor sandbeds. *Western Journal of Applied Forestry*, **17**, (4): 209-215.
- CANDELA, M. E., ALCÁZAR, M. D., ESPIN, A., EGEA, C., ALMELA L. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology*, **44**: 16-123.
- COFFEY, M.. 1991. Strategies for integrated control of soilborne *Phytophthora* species. En: *Phytophthora*. Lucas, J.A., Shattock, R.C., Shaw, D.S., Cooke, L.R.I (Eds). Cambridge Univ. Press, Cambridge. 411-432 pp.
- DAVIS RM. 1989. Effectiveness of fosetyl-AI against *Phytophthora parasitica* on tomato. *Plant Disease*, **73**: 215-217.
- FAIRBANKS, M., HARDY, G., MCCOMB, J. A. 2000. Comparisons of phosphite concentrations in *Corymba (Eucalyptus) calophylla* tissues after spray, mist or soil drench applications with the fungicide phosphite. *Australasian Plant Pathology*, **29**: 96-101.
- FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R., GALLEGO, F. J., BENLLOCH, M., MEMBRILLO, J., INFANTE, J., PÉREZ DE ALGABA, A., 1999. Treatment of oak decline using pressurized injection capsules of antifungal materials. *Eur. J For. Path.*, **29**: 29-38.
- GARCÍA, F., POZO, J. D. 1993. *Ensayo de eficacia de un fungicida y un abono foliar para el control de "seca de la encina"*. Servicio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura y Comercio. Junta de Extremadura. 10 pp.
- GUEST, D. I., GRANT, B. R., 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Review*, **66**: 159-87.
- HARDY, G. E., BARRETT, S. R., SHEARER, B. L. 2001. The future of phosphite as a fungicide to control the soil-borne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology*, **30**, (2): 133-139.
- MARKS, G. C., SMITH, I. W., 1992. Metalaxyl and phosphonate as prophylactic and curative agents against stem infection of *Leucadendron* caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **32**: 255-259.
- MAUREL, M., ROBIN, C., CAPRON, G., DESPREZ-LOUSTA, M. L. 2001. Effects of root damage associated with *Phytophthora cinnamomi* on water relations, biomass accumulation, mineral nutrition and vulnerability to water deficit of five oak and chestnut species. *Forest Pathology*, **31** (6): 353-369.
- NAVARRO CERRILLO, R. M; GALLO, L.; SÁNCHEZ, E.; TRAPER, A.; FERNÁNDEZ, P. 2004. Efecto de distintas fertilizaciones de fósforo en la resistencia de brinzales de encina y alcornoque a *Phytophthora cinnamomi* Rands.. *Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales*, **13** (3): 550-557.
- PÉREZ DE ALGABA, A., CABEZUELO, P., FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, J. 1990. La "seca de la encina". Experiencia con *Phytophthora cinnamomi* y *Trichoderma harzianum* en distintos tipos de suelo. Sección de Sanidad Vegetal. Delegación Prov. De Agricultura y Pesca (Córdoba). Junta de Andalucía. 15 pp.
- RODRÍGUEZ-MOLINA, M.C., TORRES-VILA, L.M., BLANCO-SANTOS, A., NÚÑEZ, E.J.P. y TORRES-ÁLVAREZ, E. 2002. Viability of holm and cork oak seedlings from acorns sown in soils naturally infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Forest Pathology*, **32** (6): 365-372.
- ROHRBACH, K.G., SCHENCK, S., 1985. Control of pine-apple heartrot, caused by *Phytophthora parasitica* and *P. cinnamomi*, with metalaxyl, fosetyl-AI, and phosphorous acid. *Plant Disease* **69**: 320-343.
- RUPÉREZ, A., MUÑOZ, M. 1980. Grave enfermedad de las encinas. *Bol. San. Veg. Plagas*, **6**: 107-108.
- SÁNCHEZ, M.E., CAETANO, P., FERRAZ, J. y TRAPER, A. 2000. El decaimiento y muerte de encinas en tres dehesas de la provincia de Huelva. *Bol. San. Veg. Plagas*, **26**: 447-464.
- SÁNCHEZ, M.E., SÁNCHEZ, J.E., NAVARRO, R.M.; FERNÁNDEZ, P.; TRAPER, A. 2003. Incidencia de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en masas de *Quercus* en Andalucía. *Bol. San. Veg. Plagas*, **29**: 87-108.
- STRASSER, R., SRIVASTAVA, A., TSIMILLI-MICHAEL, M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. En: M. Junus, U. Parte y P. Mohantray (Eds.), *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*. 445-483 pp.
- TUSET, J., HINAREJOS, C., MIRA, J., COBOS, J. 1996. Implicación de *Phytophthora cinnamomi* Rands en la enfermedad de la seca en encinas y alcornoques. *Bol. San. Veg. Plagas*, **22**: 491-499.
- TYNAN, K. M., WILKINSON, C. J., HOLMES, J. M., DELL, B., COLQUHOUN, I., MCCOMB, J. A., HARDY, G. E. 2001. The long-term ability of phosphite to control *Phytophthora cinnamomi* in two native plant communities of Western Australia. *Australian Journal of Botany*, **49**, (6): 761-770.
- WERNER, C., RIEL, R.J., CORREIA, O., BEYSCHLAG, W. 2001. Effects of photoinhibition on whole plant carbon gain assessed with a photosynthesis model. *Planta Cell Environ*, **24**: 27-40.
- WHILEY AW, HARGREAVES PA, PEGG KW, DOOGAN VJ, RUDDLE LJ, SARANAH JB, LANGDON PG, 1995. Changing sink strengths influence translocation of phosphonate in avocado (*Persea americana* Mill.) trees. *Australian Journal of Agricultural Research*, **46**: 1079-90.
- WILKINSON, C. J., HOLMES, J. M., TYNAN, K. M., COLQUHOUN, I., MCCOMB, J. A. HARDY, G. E., DELL, B. 2001. Ability of phosphite applied in a glasshouse trial to control *Phytophthora cinnamomi* in five plant species native to Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, **30** (4): 343-351.

(Recepción: 2 junio 2006)

(Aceptación: 16 agosto 2006)

## Estudio de patogenicidad a melón de hongos del suelo causantes de colapso

R. BELTRÁN, J. ARMENGOL, J. GARCÍA-JIMÉNEZ

El síndrome del “colapso” en los cultivos de melón y sandía puede venir asociado a la presencia en las raíces de las plantas afectadas de distintos hongos del suelo, como *Monosporascus cannonballus*, *Acremonium cucurbitacearum*, *Rhizopycnis vagum* y *Plectosporium tabacinum*. En este trabajo se ha estudiado el comportamiento del melón frente a inoculaciones en suelo esterilizado y no esterilizado. Los resultados obtenidos en el peso fresco de la parte aérea indican que éste no es un parámetro adecuado para evaluar la patogenicidad de estos hongos. El índice de daños en raíces se presenta como un parámetro más fiable y, dentro de él, las combinaciones con *M. cannonballus* y/o *A. cucurbitacearum* presentaron daños más severos que las inoculaciones de *R. vagum* y/o *P. tabacinum*.

R. BELTRÁN, J. ARMENGOL, J. GARCÍA-JIMÉNEZ. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n, 46022-Valencia.

**Palabras clave:** *Acremonium cucurbitacearum*, *Cucumis melo*, *Monosporascus cannonballus*, *Rhizopycnis vagum*, *Plectosporium tabacinum*.

### INTRODUCCIÓN

El síndrome del “colapso” es uno de los principales problemas fitosanitarios que afectan a los cultivos de melón (*Cucumis melo* L.) y sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai) a nivel mundial (MARTYN y MILLER, 1996; COHEN *et al.*, 2000). Esta afección está causada por múltiples agentes patógenos entre los que se incluyen hongos, bacterias y virus (BRUTON, 1998).

Uno de los más importantes es el hongo ascomiceto del suelo *Monosporascus cannonballus* Pollack *et Uecker*, que fue citado por primera vez en España afectando a melón en el año 1989 (LOBO-RUANO, 1990), siendo actualmente uno de los principales factores limitantes del cultivo de cucurbitáceas en algunas de las zonas productoras de nuestro país (BELTRÁN *et al.*, 2005). Otros

hongos del suelo asociados a este síndrome son *Acremonium cucurbitacearum* Alfaro-García, W. Gams *et J. García-Jiménez*, *Rhizopycnis vagum* D. F. Farr y *Plectosporium tabacinum* (van Beyma) M. E. Palm, W. Gams *et Nirenberg* (ALFARO-GARCÍA *et al.*, 1996; GARCÍA-JIMÉNEZ *et al.*, 2000; ARMENGOL *et al.*, 2003).

Uno de los síntomas del ataque de *M. cannonballus* es la presencia de necrosis y podredumbres en la raíz principal y raíces secundarias (MARTYN y MILLER, 1996). El ataque de *A. cucurbitacearum* se caracteriza por la destrucción de raicillas absorbentes y la presencia de acorchamientos en la raíz principal y secundarias (ALFARO-GARCÍA *et al.*, 1996). Estos daños reducen la capacidad de absorción de agua por parte de la planta, produciéndose un desequilibrio hídrico que provoca en pocos días la marchitez completa

de la parte aérea (MERTELY *et al.*, 1991). *R. vagum* y *P. tabacinum* han sido descritos como hongos secundarios que, con su ataque a las raíces afectadas por los hongos anteriores, contribuyen al deterioro del sistema radical de la planta (PÉREZ-PIQUERES, 2002; ARMENGOL *et al.*, 2003).

Hasta la fecha, se han efectuado ensayos de patogenicidad con estas cuatro especies fúngicas en diversos hospedantes. En los primeros años de la aparición de los problemas de "colapso", MERTELY *et al.* (1993) comprobaron la patogenicidad de *M. cannonballus* a diversas especies de cucurbitáceas. ALFARO *et al.* (1996) estudiaron la patogenicidad de *A. cucurbitacearum* a melón, y posteriormente, ARMENGOL *et al.* (1998) y BRUTON *et al.* (2000b) realizaron ensayos de patogenicidad con este hongo en varias especies de cucurbitáceas, otros cultivos y malas hierbas, completando así la información sobre su rango de hospedantes. Más adelante se realizaron ensayos de patogenicidad a melón que sirvieron para comprobar la implicación en el síndrome del "colapso" de *R. vagum* (ARMENGOL *et al.*, 2000; 2003) y de *P. tabacinum* (PÉREZ-PIQUERES, 2002). Recientemente, ANDRADE *et al.* (2005) efectuaron ensayos de patogenicidad a melón de *M. cannonballus* evaluando diversos parámetros y estudiando la correlación entre ellos.

Por otro lado, BRUTON *et al.* (2000a) estudiaron la patogenicidad a melón de *M. cannonballus* y *A. cucurbitacearum*, comparando ambos hongos, pero siendo inoculados también por separado. BIERNACKI y BRUTON (2001) efectuaron un ensayo similar al anterior, añadiendo a *R. vagum* entre los hongos ensayados. En otros estudios, se comparó la patogenicidad de *A. cucurbitacearum*, *M. cannonballus* y *R. vagum*, junto a otros hongos que también provocan podredumbres en las raíces de cucurbitáceas, tales como *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani* y *Pythium* spp. (AEGERTER *et al.*, 2000).

Todos estos estudios tienen en común que fueron realizados inoculando cada una de estas especies individualmente. Hasta la

fecha no se ha realizado ningún estudio que analice el efecto de inoculación conjunta de estas especies, lo que se aproximaría más a la situación que se da en ambientes naturales, donde lo común es que se presenten a la vez varios de estos hongos.

El objetivo de este trabajo es estudiar el comportamiento del melón frente a inoculaciones con los hongos del suelo implicados en el síndrome del "colapso" en sus distintas combinaciones.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Aislados fúngicos utilizados

Los ensayos se realizaron utilizando los aislados fúngicos mostrados en el Cuadro 1, en el que se indica su procedencia y el cultivo del cual fueron obtenidos.

La conservación de estos aislados se efectuó en tubos con turba autoclavada almacenada a temperatura ambiente y para la realización de los ensayos se hicieron crecer en placas Petri con medio Patata Dextrosa Agar (PDA) durante 15 días a una temperatura de 26°C en ciclos alternantes de oscuridad y 12 horas de luz día + ultravioleta cercano (Sylvania F-40 BLB).

### Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo, se mezclaron 1000 ml de arena lavada (0,5 mm de diámetro) y 91,5 g de salvado de avena, poniendo 500 ml de esta mezcla en frascos de cristal de 1 litro. Se añadieron 75 ml de agua destilada a cada recipiente, se agitaron y se esterilizaron al autoclave tres veces a 120°C durante 1 hora, con una separación entre cada autoclavado de 24 horas como mínimo.

Cada uno de los frascos de cristal fue inoculado con dos fragmentos de PDA en los que había crecido el hongo a inocular, incubándose a 25°C hasta que la mezcla colonizada tenía unos 5 cm de diámetro. En este momento, se agitó el recipiente con el fin de distribuir uniformemente el hongo por toda la mezcla, y se abrió en cámara de flujo para favorecer la aireación y el crecimiento del

Cuadro 1. Origen de los aislados.

Especie	Aislado	Localidad	Provincia	Hospedante
<i>M. cannonballus</i>	M1	Xilxes	Castellón	Calabaza
<i>A. cucurbitacearum</i>	A419	Llanos del Caudillo	Ciudad Real	Melón
<i>R. vagum</i>	R25	Argamasilla de Alba	Ciudad Real	Melón
<i>P. tabacinum</i>	P467	Ciudad Real	Ciudad Real	Melón

hongo. Posteriormente, la incubación de los frascos se prolongó a 25°C durante otros 21 a 28 días.

El conteo de los propágulos presentes en la mezcla de arena y salvado de avena se realizó mediante el método de las diluciones sucesivas, utilizando una solución al 1% de hidroxietil celulosa (HEC) como diluyente y placas Petri con medio PDA + 500 ppm de estreptomycin (PDAS). Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de inóculo (DHINGRA y SINCLAIR, 1995).

### Sustrato

Se escogió como sustrato de crecimiento de las plantas un suelo natural procedente de Calasparra (Murcia), de una parcela en la que nunca se había cultivado melón, ni se ha detectado la presencia de "colapso" en la comarca. Este suelo se empleó sin autoclavar y esterilizado al autoclave, tres veces a 120°C durante una hora en días sucesivos.

### Preparación e inoculación de macetas

Para la inoculación se utilizaron macetas de 16 cm de diámetro y 1,5 litros de capacidad. A cada una de ellas se les añadió el sustrato y el inóculo adecuado para conseguir los siguientes niveles indicados en otros estudios de patogenicidad: 20 UFC/g de suelo para *M. cannonballus* (BRUTON, 1995), 50.000 UFC/g de suelo para *A. cucurbitacearum* (ARMENGOL *et al.*, 1998), 1.000 UFC/g de suelo para *R. vagum* (MILLER *et al.*, 1996; ARMENGOL *et al.*, 2000) y 150.000 UFC/g de suelo para *P. tabacinum* (PÉREZ-PIQUERES, 2002).

Se realizaron cinco repeticiones (macetas) para cada una de las tesis consideradas (16 combinaciones de hongos, incluyendo el

control no inoculado), y todas éstas para los dos tipos de suelo empleados, resultando un total de 160 macetas. Las combinaciones fueron las siguientes:

- Control sin inocular: C.
- Combinaciones primarias: Ac, Mc, Rv, Pt.
- Combinaciones secundarias: Ac+Mc, Ac+Rv, Ac+Pt, Mc+Rv, Mc+Pt, Rv+Pt.
- Combinaciones terciarias: Ac+Mc+Rv, Ac+Mc+Pt, Ac+Rv+Pt, Mc+Rv+Pt.

- Combinación cuaternaria: Ac+Mc+Rv+Pt.

(Siendo: C = control sin inocular; Ac = *A. cucurbitacearum*; Mc = *M. cannonballus*; Rv = *R. vagum* y Pt = *P. tabacinum*)

Este estudio se efectuó en dos años consecutivos (2002 y 2003). El tipo de suelo y las combinaciones consideradas fueron las mismas durante los dos años; la única excepción fue la combinación Rv+Pt, que solamente se realizó en el año 2003, para los dos suelos. La variedad de melón empleada en este ensayo fue Temprano Rochet. Las semillas fueron esterilizadas superficialmente con una solución de hipoclorito sódico (1,5% de cloro activo durante 1 minuto) y, posteriormente, se sembraron cinco de ellas por maceta. Las macetas se llevaron a un invernadero controlado con unas condiciones ambientales de 25-30°C. Tras la germinación, se dejó una planta por maceta.

### Parámetros evaluados

A los 45 días se extrajeron las plantas cuidadosamente, lavando las raíces, y evaluando los siguientes parámetros: peso fresco de la parte aérea, índice de daños en raíces (IDR) y la frecuencia de aislamiento de hongos en raíces.

Para la medición del peso fresco de la parte aérea y con el fin de estandarizar el

método, se realizó un corte en la planta al nivel de los cotiledones. En la evaluación de daños en raíces se utilizó la escala de valores siguiente (Bruton, comunicación personal):

0: El hipocotilo, la raíz primaria y las raíces secundarias no muestran ningún tipo de síntomas de la afeción

1: El hipocotilo, la raíz primaria y las raíces secundarias comienzan a mostrar un ligero pardeamiento

2: El hipocotilo presenta un pardeamiento moderado y comienza a notarse una reducción del córtex alrededor del cilindro vascular. En la raíz primaria empieza a observarse un pardeamiento moderado, y se ven algunas pequeñas lesiones. Las raíces secundarias también presentan un pardeamiento moderado y empieza a notarse una reducción de barbada.

3: El hipocotilo presenta un pardeamiento severo y empiezan a estar expuestos los haces vasculares. En la raíz primaria se observa un pardeamiento severo y lesiones abundantes. Las raíces secundarias también presentan un pardeamiento severo y la reducción de barbada es del 25-50%.

4: El hipocotilo se encuentra muy dañado, en algunos casos con consistencia blanda; el córtex suele estar completamente ausente y los haces vasculares completamente expuestos. La raíz primaria está muy dañada y se ven áreas necróticas. Las raíces secundarias están muy afectadas, con necrosis abundantes, la reducción de barbada es muy acentuada. Ocasionalmente la planta se marchita y muere.

El valor de IDR para cada una de las tesis es la media de los valores de las cinco plantas estudiadas.

Una vez efectuada la evaluación de daños, se tomaron pequeños trozos de raíz, hipocotilo y raíces secundarias, preferentemente de las zonas en que se veían lesiones o zonas sospechosas de estar afectadas por los hongos inoculados; estos fragmentos se sembraron en medio de cultivo PDAS. Se sembraron un total de 14 puntos de aislamiento por cada una de las plantas, distribuidos entre el hipocotilo, raíz principal y raíces secunda-

rias. Las placas sembradas se incubaron en estufa a 25-27° C durante 3-4 días, al cabo de los cuales se pasaron a medio PDA las distintas colonias fúngicas obtenidas. Para proceder a su identificación, estas placas se incubaron durante 15 días a 26° C en ciclos alternantes de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz día + ultravioleta cercano (Sylvania F-40 BLB), para inducir la esporulación.

### **Análisis estadístico**

Los datos de peso fresco de la parte aérea y de daños en raíces fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), usando el test LSD ( $P=0,05$ ) para realizar la comparación entre medias, realizándose un análisis multifactorial y de interacciones considerando como factores a cada uno de los hongos inoculados en el trabajo. Asimismo, se realizó una regresión lineal entre los parámetros "peso fresco de la parte aérea" e "índice de daños en raíces", para estudiar su relación. Todos estos análisis se efectuaron mediante el software Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., Englewood Cliffs, NJ, USA).

## **RESULTADOS**

### **Peso fresco de la parte aérea**

Tras la comparación estadística de los datos de peso fresco y daños en raíces, se determinó que existían diferencias significativas entre los dos años de estudio, por lo que se procedió a su análisis tomando los datos de cada año por separado.

En el Cuadro 2 aparecen las medias de los valores de peso fresco de la parte aérea para los dos tipos de suelo durante los dos años de duración del estudio, así como el análisis estadístico de estos datos. Asimismo, en estos cuadros se representa la comparación estadística de los datos totales en ambos tipos de suelo para cada uno de los años de estudio.

En el ensayo de 2002, el menor valor de peso fresco de la parte aérea en el suelo auto-clavado lo presentó la combinación cuater-



Cuadro 2. Media de peso fresco de la parte aérea para cada tipo de suelo y año de estudio (Años 2002 y 2003).

Combinación <sup>x</sup>	Año 2002				Año 2003			
	Suelo autoclavado		Suelo no autoclavado		Suelo autoclavado		Suelo no autoclavado	
Control	11,81 <sup>y</sup>	b <sup>z</sup>	6,57	cde	30,29	a	26,06	a
Ac	16,46	a	9,21	abcde	18,77	c	17,52	bcde
Mc	3,33	def	9,27	abcde	4,52	d	22,33	ab
Rv	4,64	cdef	9,60	abcde	20,34	bc	16,53	bcde
Pt	11,25	ab	10,02	abcd	17,7	c	14,27	defg
Ac+Mc	2,23	ef	8,80	bcde	19,82	c	12,21	defg
Ac+Rv	8,62	bc	5,40	de	29,14	ab	18,94	abcd
Ac+Pt	11,81	b	11,64	ab	15,49	c	21,45	abc
Mc+Rv	9,67	cde	9,71	abcde	21,66	c	15,62	cdef
Mc+Pt	1,11	f	13,82	a	22,69	abc	11,34	efg
Rv+Pt	-	-	-	-	20,27	c	9,19	fg
Ac+Mc+Rv	3,94	def	8,53	bcde	-	-	22,65	bcde
Ac+Mc+Pt	2,60	def	11,62	abc	16,53	c	8,76	fg
Ac+Rv+Pt	6,19	cd	11,04	abc	18,25	c	13,76	defg
Mc+Rv+Pt	3,34	def	7,22	bcde	18,57	c	7,00	g
Ac+Mc+Rv+Pt	0,87	f	4,67	e	14,83	c	12,39	defg
Media	6,09	B	9,03	A	17,95	A	15,50	B

<sup>x</sup>Ac = *A. cucurbitacearum*; Mc = *M. cannonballus*; Rv = *R. vagum*; Pt = *P. tabacinum*

<sup>y</sup>Peso fresco de la parte aérea en gramos (media de cinco plantas)

<sup>z</sup>Números en la columna seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P=0,05$ ). Las letras minúsculas corresponden a la comparación entre tratamientos. Las letras mayúsculas corresponden a la comparación entre tipos de suelo.

na (Ac+Mc+Rv+Pt), con 0,87 g. Las siguientes tesis con menor peso fresco fueron Mc+Pt, Ac+Mc y Ac+Mc+Pt, con 1,11 g, 2,23 g y 2,60 g, respectivamente. En cambio, el mayor valor de peso fresco en la parte aérea correspondió a la tesis Ac, con 16,46 g. Se encontraron diferencias significativas entre los cuatro valores superiores y los menores valores de peso fresco en la parte aérea. Asimismo, también se encontraron diferencias significativas entre la tesis Mc y el control sin inocular.

En el suelo no autoclavado, el menor valor de peso fresco en la parte aérea también correspondió a la combinación cuaternaria (Ac+Mc+Rv+Pt), con 4,67 g. Por otro lado, los mayores valores de peso fresco se obtuvieron con las tesis Ac+Pt y Ac+Mc+Pt, con 11,64 g y 11,62 g, respectivamente. De igual forma, se observaron diferencias signi-

ficativas entre la combinación cuaternaria y las dos combinaciones de mayor valor de peso fresco.

En el año 2003, las plantas de la combinación Ac+Mc+Rv en el suelo autoclavado se secaron antes de la finalización del periodo de estudio, no pudiéndose determinar las causas de su muerte, de ahí que su peso fresco no fue considerado. En el suelo autoclavado, la combinación sólo con Mc fue la de menor peso fresco, con 4,52 g. En cambio, la combinación que obtuvo mayor peso fresco en la parte aérea fue el control sin inocular, con 30,29 g. Se hallaron diferencias significativas entre las tesis con mayor peso fresco (control sin inocular, Ac+Rv), y las de menor peso fresco en la parte aérea (Mc, Ac+Mc+Rv, Ac+Pt y Ac+Mc+Pt).

Para el suelo no autoclavado, la combinación con mayor peso fresco fue el control sin

Cuadro 3. Análisis de la varianza para el efecto de los diferentes hongos inoculados en el peso fresco de la parte aérea de las plantas, en los ensayos realizados durante los años 2002 y 2003, en suelo autoclavado y no autoclavado.

Factores	Año 2002		Año 2003	
	Suelo autoclavado	Suelo no autoclavado	Suelo autoclavado	Suelo no autoclavado
A: <i>A. cucurbitacearum</i>	0,7320 <sup>x</sup>	0,0643	0,2743	0,0831
M: <i>M. cannonballus</i>	0,0000	0,2403	0,0002	0,0139
R: <i>R. vagum</i>	0,0607	0,4950	0,0008	0,0000
P: <i>P. tabacinum</i>	0,3648	0,0058	0,0001	0,0033
Interacciones				
AxM	0,2970	0,8375	0,4437	0,2298
AxR	0,1429	0,0708	0,0022	0,1984
AxP	0,0864	0,5434	0,0002	0,0033
MxR	0,0002	0,0256	0,0009	0,8557
MxP	0,2892	0,0355	0,0063	0,1030
RxP	0,5801	0,3302	0,4143	0,4012
AxMxR	0,8699	0,0477	0,0777	0,1885
AxMxP	0,0207	0,7916	0,0001	0,3210
AxRxP	0,2079	0,7200	0,0075	0,0000
MxRxP	0,0545	0,0041	0,9603	0,6003
AxMxRxP	-	-	0,0000	0,8325

<sup>x</sup>Valor de *P* (<0,05) ó probabilidad ANOVA.

inocular con 26,06 g; en cambio, la tesis con menor peso fresco fue Mc+Rv+Pt con 7,00 g. Asimismo, se hallaron diferencias significativas entre el control sin inocular y las combinaciones de menor peso fresco.

Respecto a los datos medios de peso fresco en la parte aérea del total de plantas en cada suelo, en el año 2002, las plantas cultivadas en el suelo autoclavado obtuvieron un valor medio de 6,09 g, que difería significativamente de las cultivadas en el suelo no autoclavado, que llegaron a alcanzar una media de 9,03 g. Por el contrario, en el año 2003, la media de peso fresco en la parte aérea para el suelo autoclavado fue de 17,95 g, significativamente superior a la media de peso fresco en el suelo no autoclavado, que se quedó en 15,50 g.

En el Cuadro 3 se muestran los resultados del análisis multifactorial para el parámetro del peso fresco, calculando el efecto de los hongos inoculados para cada tipo de suelo, durante los dos años de duración del estudio.

En el año 2002, para el suelo autoclavado

solamente fue significativo *M. cannonballus*, así como algunas de las interacciones en las que estaba presente este hongo, que fueron las que menor peso fresco obtuvieron. En ese mismo año, para el suelo no autoclavado, el único hongo que resultó significativo fue *P. tabacinum*, junto con algunas de las interacciones en las que estaba presente, pero en este caso por ser las que mayor peso fresco presentaron. En el año 2003, para el suelo autoclavado fueron considerados significativos *M. cannonballus*, *R. vagum* y *P. tabacinum*, al igual que algunas de las interacciones con estas especies, teniendo muchas de las combinaciones donde se encontraban estos hongos un peso fresco significativamente menor que el control. En ese mismo año, para el suelo no autoclavado, también fueron considerados significativos *M. cannonballus*, *R. vagum* y *P. tabacinum*, teniendo también la mayor parte de las combinaciones entre estos hongos un peso fresco significativamente menor que el control.

**Evaluación de daños en raíces**

Los resultados de la evaluación de daños en las raíces de las plantas inoculadas (IDR) se muestran en el Cuadro 4, para todas las combinaciones y suelos considerados, durante los dos años de estudio. En estos mismos cuadros se observan también los valores medios de IDR para el total de plantas cultivadas en cada suelo y año de estudio.

Respecto a los resultados del año 2002, en el suelo autoclavado, la combinación que obtuvo un IDR significativamente menor al de todas las demás fue el control sin inocular, con un valor de 0,92. En cambio, las combinaciones que dieron un mayor IDR fueron Ac+Mc+Rv+Pt, Ac+Mc+Rv, Ac+Mc y Mc+Pt, todas ellas con el máximo valor en la escala de daños (4). Se encontraron diferencias significativas entre estas combina-

ciones y las que obtuvieron menor IDR, comentadas anteriormente.

En el suelo no autoclavado, la combinación que obtuvo menor índice de daños en raíces también fue el control no inoculado, con un valor de IDR de 0,42. Por otra parte, la combinación con mayor IDR fue Mc+Rv+Pt, con un valor de 3,83. De la misma forma, se encontraron diferencias significativas entre todas estas combinaciones.

En el año 2003 y suelo autoclavado, la tesis que tuvo un menor valor de IDR fue el control sin inocular, con ausencia de daños en todas las raíces evaluadas. Por otro lado, la combinación con mayor IDR fue la de Ac, con un valor de IDR de 3,6. Se hallaron diferencias significativas entre las combinaciones que presentaron menor IDR y las que presentaron un mayor IDR.

**Cuadro 4. Media de índice de daños en raíces (IDR) para cada tipo de suelo y año de estudio (Años 2002 y 2003).**

Combinación <sup>x</sup>	Año 2002				Año 2003			
	Suelo autoclavado		Suelo no autoclavado		Suelo autoclavado		Suelo no autoclavado	
Control	0,92 <sup>y</sup>	a <sup>z</sup>	0,42	a	0	a	0	a
Ac	3,33	d	1,92	b	3,60	k	2,50	de
Mc	3,92	e	2,83	e	3,50	jk	2,50	de
Rv	2,17	b	2,33	c	2	c	1,50	b
Pt	2,33	b	2,5	cd	1,80	bc	1,90	c
Ac+Mc	4	e	3,17	fg	3,50	jk	3	fg
Ac+Rv	3,25	c	3	ef	2,90	ef	2,90	g
Ac+Pt	2,75	c	2,75	de	3,30	hij	2,50	de
Mc+Rv	3,83	e	2,5	d	2,80	de	2,30	d
Mc+Pt	4	e	3,17	fg	2,60	d	2,90	g
Rv+Pt	-	-	-	-	1,60	b	1,90	c
Ac+Mc+Rv	4	e	3,42	g	-	-	2,60	ef
Ac+Mc+Pt	3,83	e	2,75	de	3,20	ghi	2,90	g
Ac+Rv+Pt	3,5	d	3,42	g	3,40	ijk	2,90	g
Mc+Rv+Pt	3,25	d	3,83	h	3,10	fgh	2,70	efg
Ac+Mc+Rv+Pt	4	e	3,33	g	3	efg	2,80	fg
Media	3,27 <sup>d</sup>	A	2,76	B	2,77	A	2,36	B

<sup>x</sup>Ac = *A. cucurbitacearum*; Mc = *M. cannonballus*; Rv = *R. vagum*; Pt = *P. tabacinum*

<sup>y</sup>Índice de daños en raíces en una escala de 0 a 4 (media de cinco plantas)

<sup>z</sup>Números en la columna seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ( $P=0,05$ ). Las letras minúsculas corresponden a la comparación entre tratamientos. Las letras mayúsculas corresponden a la comparación entre tipos de suelo.

Cuadro 5. Análisis de la varianza para el efecto de los diferentes hongos inoculados en el índice de daños en raíces, en los ensayos realizados durante los años 2002 y 2003, en suelo autoclavado y no autoclavado.

Factores	Año 2002		Año 2003	
	Suelo autoclavado	Suelo no autoclavado	Suelo autoclavado	Suelo no autoclavado
A: <i>A. cucurbitacearum</i>	0,0000 <sup>x</sup>	0,0109	0,0000	0,0000
M: <i>M. cannonballus</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
R: <i>R. vagum</i>	0,0000	0,0000	0,0003	0,0000
P: <i>P. tabacinum</i>	0,0009	0,0000	0,3811	0,0000
Interacciones				
AxM	0,0000	0,1495	0,0000	0,0000
AxR	0,1177	0,0021	0,0000	0,0947
AxP	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
MxR	0,0000	0,0000	0,0020	0,0000
MxP	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012
RxP	0,5280	0,0457	0,0105	0,0002
AxMxR	0,0000	0,0000	0,0000	0,0270
AxMxP	0,0000	0,0847	0,1503	0,0000
AxRxP	0,0023	0,0229	0,0021	0,0000
MxRxP	0,0137	0,0109	0,0000	0,0000
AxMxRxP	-	-	0,0000	0,0002

<sup>x</sup>Valor de  $P$  ( $<0,05$ ) ó probabilidad ANOVA

Por otro lado, en el suelo no autoclavado, la inoculación con mayor IDR fue la de Ac+Mc con un valor de 3. La tesis que mostró un menor valor de IDR fue, al igual que en el suelo autoclavado, el control sin inocular, también con un IDR de 0 (ausencia de síntomas en raíces). Se encontraron diferencias significativas entre estas últimas tesis de menor IDR, y las tesis con mayor valor de índice de daños.

Por último, según los valores del índice de daños medio para el total de plantas de cada suelo, en el año 2002, el IDR medio de las plantas cultivadas en el suelo autoclavado fue de 3,27, mientras que las cultivadas en el suelo no autoclavado obtuvieron un IDR de 2,76. De igual forma, en el año 2003, el IDR medio calculado para las plantas del suelo autoclavado fue de 2,77, mientras que en el suelo no autoclavado, solo llegó a 2,36. En ambos años el valor de IDR fue superior en el caso del suelo autoclavado, encontrándose diferencias significativas para el valor de IDR entre ambos suelos considerados.

En el Cuadro 5 se muestran los resultados del análisis multifactorial para el índice de daños en raíces, calculando el efecto de los hongos inoculados para cada tipo de suelo durante los dos años de estudio.

Durante el año 2002 todos los hongos inoculados tuvieron un efecto significativo, al igual que la mayoría de sus interacciones, tanto para el suelo autoclavado como para el suelo no autoclavado. Sin embargo, hay que distinguir entre *M. cannonballus* y *A. cucurbitacearum*, cuyas inoculaciones individuales y conjuntas fueron las que presentaron mayores valores de IDR, y entre *R. vagum* y *P. tabacinum*, cuyas inoculaciones individuales y el conjunto de ambas obtuvieron menores valores de IDR, aunque superiores siempre respecto al control sin inocular. Este mismo resultado se dio en el año 2003, excepto con la inoculación de *P. tabacinum* en suelo autoclavado, que no resultó significativa.

En el estudio de regresión lineal efectuado entre los parámetros de peso fresco en la

parte aérea y el índice de daños en raíces (datos no mostrados), se obtuvieron índices de correlación inferiores al 35%, significativos en todos los casos durante los dos años de duración del estudio y para los dos suelos considerados.

### Reaislamiento de hongos

Tanto en el año 2002 como en el 2003, todos los hongos inoculados en todas las combinaciones fueron posteriormente reaislamados. De esta manera se verificaron los postulados de Koch, demostrándose que las inoculaciones fueron correctas.

## DISCUSIÓN

Esta es la primera vez que se realiza un ensayo de patogenicidad con los principales hongos causantes de "colapso" descritos en España, realizando inoculaciones conjuntas de todos ellos, en todas las combinaciones posibles.

Respecto al peso fresco de la parte aérea, en general se obtuvieron resultados contradictorios. En este sentido, el resultado obtenido para el control sin inocular en el suelo no autoclavado en el año 2002 fue precisamente uno de los valores más bajos (6,57 g). Asimismo, en el suelo autoclavado también del año 2002, el peso fresco de la parte aérea del control fue inferior al conseguido en algunas de las inoculaciones, como por ejemplo Ac.

Es destacable también que los valores de peso fresco en la parte aérea obtenidos para la tesis cuaternaria (Ac+Mc+Rv+Pt), fueron en algunos casos superiores a los de otras combinaciones de menor grado. Asimismo, tanto en el año 2002 como en el año 2003 y para los dos tipos de suelo, algunas combinaciones binarias e incluso terciarias no presentaron diferencias significativas con respecto al control sin inocular, mientras que algunas combinaciones de hongos en solitario sí las presentaron.

También destacan los diferentes resultados obtenidos entre los dos tipos de suelo en los dos años de duración del estudio. Así, en

el año 2002, al comparar los valores medios totales de peso fresco en la parte aérea, se observó que en el suelo no autoclavado el peso fresco medio en la parte aérea (9,03 g) era significativamente mayor que en el no autoclavado (6,09 g). En 2003 se dio el caso contrario, observándose diferencias significativas entre ambos suelos, con una media total de peso fresco en la parte aérea para el suelo autoclavado de 17,95g, superior a la del suelo no autoclavado que fue de 15,50g.

Los resultados obtenidos en el análisis multifactorial también denotan cierta contradicción entre los dos ensayos, puesto que en el año 2002 únicamente fueron significativas las inoculaciones con *M. cannonballus* en el suelo autoclavado (como el hongo que dio menor peso fresco) y *P. tabacinum* en el suelo no autoclavado (como el hongo que dio mayor peso fresco). Por otro lado, en el año 2003 fueron significativas las inoculaciones con *M. cannonballus*, *R. vagum* y *P. tabacinum*, así como la mayoría de las interacciones entre ellos, para los dos tipos de suelo, por tener valores bajos de peso fresco.

Por el contrario, en cuanto al índice de daños en raíces (IDR), se obtuvieron resultados similares para cada tipo de suelo en los dos años de duración del estudio. Así, en 2002, el IDR medio total para todas las combinaciones del suelo autoclavado fue significativamente mayor que para el suelo no autoclavado, con valores de 3,27 y 2,76, respectivamente. En el año 2003, también se presentaron diferencias significativas a favor del suelo autoclavado, comparado con el suelo no autoclavado, con valores medios totales de IDR de 2,77 y 2,36, respectivamente.

Resulta destacable la importancia que tuvieron las inoculaciones con *M. cannonballus*, por sí solo o en sus combinaciones con otros hongos. Así, en el año 2002 en el suelo autoclavado, las combinaciones que incluyeron a *M. cannonballus* presentaron valores elevados de IDR, oscilando entre 3 y 4, a diferencia de otras combinaciones que no presentaban este hongo, cuyo IDR fue inferior. En ese mismo año, para el suelo sin

autoclavar se obtuvieron valores similares de IDR, aunque ligeramente inferiores. En el año 2003, los valores de IDR fueron inferiores para los dos tipos de suelo, aunque también se observó que las combinaciones con *M. cannonballus* poseyeron mayor IDR. Del mismo modo, se obtuvieron valores elevados de IDR en las combinaciones con *A. cucurbitacearum*, excepto en algunos casos, como el suelo sin autoclavar del año 2002, en el que la inoculación únicamente con *A. cucurbitacearum* fue la que obtuvo el menor valor de IDR después del control sin inocular (1,92).

En cambio, respecto a *R. vagum* y *P. tabacinum*, se observa cómo en los dos tipos de suelos, y para los dos años de estudio, sus inoculaciones individuales y binaria fueron las que menor valor de IDR presentaron, con la salvedad del control. Se puede afirmar por tanto que, en general, las plantas que a priori mostraron menos daños en raíces fueron las que se inocularon únicamente con estos hongos, sin la presencia de *A. cucurbitacearum* y *M. cannonballus*. Además, el análisis multifactorial de los datos de IDR, reveló que todas las inoculaciones de todos los hongos, así como de la mayoría de sus interacciones fueron significativas, exceptuando a *P. tabacinum* en el suelo autoclavado, en el año 2003.

A la vista de estos resultados, se podría decir que el factor limitante en esta afección es la presencia en el suelo de *M. cannonballus* y *A. cucurbitacearum*, siendo menos importante la presencia de *R. vagum* y *P. tabacinum*. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en otros trabajos, en los que se cita a *M. cannonballus* y *A. cucurbitacearum* como los principales agentes fúngicos causante de “colapso” en cucurbitáceas (MERTELY *et al.*, 1991; GARCÍA-JIMÉNEZ *et al.*, 1994a y b; MARTYN y MILLER, 1996).

Los resultados obtenidos en la regresión entre los dos parámetros considerados, peso fresco de la parte aérea e IDR, mostraron una correlación muy baja entre ellos. Como ya se ha comentado respecto al análisis multifactorial efectuado para ambos parámetros, destaca que en el caso del índice de daños en

raíces, todas las especies fúngicas inoculadas fueron importantes en los dos años y los dos tipos de suelo, salvo *P. tabacinum* en el suelo autoclavado durante 2003. En cambio, para el peso fresco en la parte aérea, esto no fue así, puesto que en el año 2002 sólo resultaron significativos *M. cannonballus* y *P. tabacinum*, en el suelo autoclavado y sin autoclavar, con mayor y menor peso fresco, respectivamente, mientras que en 2003, *A. cucurbitacearum* no fue significativo en ningún tipo de suelo, a diferencia de los otros hongos inoculados. Así pues, no parece que exista una relación clara entre el peso fresco en la parte aérea y los daños causados por los hongos en las raíces. ANDRADE *et al.* (2005) tampoco encontraron una correlación significativa entre el peso fresco de la parte aérea y la severidad de síntomas de “colapso” en un ensayo de patogenicidad de *M. cannonballus* a melón llevado a cabo en Brasil.

Para poder explicar estos resultados, hay que hacer referencia a otros trabajos que relacionan este síndrome con la fructificación de la planta (PIVONIA *et al.*, 2002). El término “colapso” alude a la marchitez que tiene lugar en la planta en la época cercana a la maduración del fruto. En este momento, los frutos son un importante sumidero de agua para la planta; este hecho, unido al notable deterioro de la raíz tras la infección causada por los hongos del suelo, hace que en la planta se produzca un estrés hídrico que provoque la marchitez y muerte de la parte aérea de la planta en unos pocos días (BRUTON, 1998).

Se debe tener en cuenta que en este ensayo de inoculación de hongos del suelo en condiciones de invernadero, al cultivarse las plantas en macetas pequeñas, no es posible obtener la fructificación, con lo cual no se debe considerar al peso fresco en la parte aérea como un buen indicador de la enfermedad en melón cultivado en maceta. En cambio, el valor de peso fresco de la parte aérea tendría mayor importancia en plantas de mayor edad y cultivadas en mejores condiciones, ya que entonces sería posible obtener fructificación. En este sentido, se ha

demostrado que al disminuir la carga de frutos de las plantas de melón infectadas por *M. cannonballus* mediante aclareo, se consigue evitar la marchitez de la parte aérea, puesto que de esta manera se reduce la demanda de agua por parte de la planta (PIVONIA *et al.*, 2002). Por todo ello, el IDR se presenta como el parámetro más fiable, a la hora de explicar los efectos de cada uno de los hongos inoculados y de los tipos de suelo. Se estima, por tanto, que el peso fresco de la parte aérea no es un buen parámetro para medir la incidencia y severidad de los síntomas de “colapso” en ensayos de patogenicidad llevados a cabo en invernadero, en plantas de menos de 60 días.

Como ya se ha comentado, para el IDR no se observaron los resultados contradictorios entre los dos tipos de suelo que sí se presentaron para el peso fresco en la parte aérea. Para la explicación de estos resultados, hay que tener en cuenta la presencia en el suelo de otros hongos que podrían actuar de modo antagónico frente a los hongos asociados al “colapso”. En este sentido, se conocen bien las aptitudes de algunos géneros de hongos para el control biológico de otros agentes fúngicos, como es el caso de *Trichoderma* o de *Chaetomium* (DOMSCH y GAMS, 1972), que se aislaron en el suelo no autoclavado (datos no mostrados).

También se aislaron en el suelo no autoclavado otros hongos de carácter saprofítico como *Fusarium* y *Pythium*. Algunas especies de este género han sido citadas por algunos autores como propiamente asociadas al síndrome, y no sólo como saprofitas (PIVONIA *et al.*, 1997; TELLO *et al.*, 1990). En cual-

quier caso, el aislamiento de diversas especies de *Fusarium* y *Pythium* es un resultado que también ha aparecido en otros estudios de patogenicidad con *A. cucurbitacearum* y *M. cannonballus* (GARCÍA-JIMÉNEZ *et al.*, 1992; GARCÍA-JIMÉNEZ *et al.*, 1994b; BRUTON *et al.*, 2000a; SALES *et al.*, 2001), ya que cuando las raíces se hallan muy deterioradas, estos hongos pueden presentarse como saprofitos.

Por último, no parece que la presencia de todos los hongos asociados al colapso conjuntamente suponga un mayor deterioro de la raíz y una mayor incidencia de “colapso”; visto de otra manera, con la presencia en suelos de cultivo de melón y sandía de *M. cannonballus* o *A. cucurbitacearum*, aun por sí solos, es más que suficiente para que se produzcan ataques a las raíces de las plantas con el posterior desarrollo de los síntomas típicos de “colapso”, y con la gravedad que ha conseguido elevar a estos hongos dentro de los principales problemas de sanidad del cultivo de éstas cucurbitáceas (MERTELY *et al.*, 1991; GARCÍA-JIMÉNEZ *et al.*, 1994a y b; GARCÍA-JIMÉNEZ *et al.*, 2000). AEGERTER *et al.* (2000) destacan la idea que la presencia de los hongos causantes de “colapso” *A. cucurbitacearum*, *M. cannonballus* y *R. vagum* no es suficiente para el desarrollo del síndrome, pues hay que tener también en cuenta otros factores de tipo biótico, climático, etc. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio confirman la importancia de *M. cannonballus* y *A. cucurbitacearum*, que pueden causar daños más severos que otros hongos implicados en el síndrome del “colapso”.

#### ABSTRACT

BELTRÁN R., J. ARMÉNGOL, J. GARCÍA-JIMÉNEZ. 2006. Pathogenicity to muskmelon of soilborne fungi associated with cucurbit vine decline. *Bol. San. Veg. Plagas*, 32: 695-707.

Vine decline or collapse of muskmelon and watermelon can be associated to the presence on the root system of several soil-borne fungi, like *Monosporascus cannonballus*, *Acremonium cucurbitacearum*, *Rhizopycnis vagum* and *Plectosporium tabacinum*. In this study the behaviour of muskmelon inoculated with these fungi in all possible combinations among them has been studied. The inoculations were set up in sterilized and naturally infested soil. Fresh weight results showed that this is not an adequate parameter to

evaluate the pathogenicity of these fungi. Root damage index it shows like a more reliable parameter, concretely inoculations with *M. cannonballus* and/or *A. cucurbitacearum* showed more damage than inoculations with *R. vagum* and *P. tabacinum*.

**Keywords:** *Acremonium cucurbitacearum*, *Cucumis melo*, *Monosporascus cannonballus*, *Rhizopycnis vagum*, *Plectosporium tabacinum*.

#### REFERENCIAS

- AEGERTER, B. J., GORDON, T. R., DAVIS, R. M. 2000. Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon root rot and vine decline in California. *Plant Disease*, **84**: 224-230.
- ALFARO-GARCÍA, A., ARMENGOL, J., BRUTON, B. D., GAMS, W., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., MARTÍNEZ-FERRER, G. 1996. The taxonomic position of the causal agent of *Acremonium* collapse of muskmelon. *Mycologia*, **88**(5): 804-808.
- ANDRADE, D. E. G. T., MICHEREFF, S. J., BORGES, M. A. S., ARAÚJO, I. B., SALES, R. 2005. Influência da densidade de inóculo e de isolados de *Monosporascus cannonballus* na severidade do colapso do meloeiro. *Summa Phytopathologica*, **31**(2): 173-180.
- ARMENGOL, J., SANZ, E., MARTÍNEZ-FERRER, G., SALES, R., BRUTON, B. D., GARCÍA-JIMÉNEZ, J. 1998. Host range of *Acremonium cucurbitacearum*, cause of *Acremonium* collapse of muskmelon. *Plant Pathology*, **47**: 29-35.
- ARMENGOL, J., PELLICER, I., VICENT, A., SALES, R., BRUTON, B. D., GARCÍA-JIMÉNEZ, J. 2000. *Rhizopycnis vagum* D.F. Farr, un nuevo coelomycete asociado a raíces de plantas de melón con síntomas de colapso en España. *Bol. San. Veg. Plagas*, **26**: 103-112.
- ARMENGOL, J., VICENT, A., MARTÍNEZ-CULEBRAS, P., BRUTON, B. D., GARCÍA-JIMÉNEZ, J. 2003. Identification, occurrence and pathogenicity of *Rhizopycnis vagum* on muskmelon in Spain. *Plant Pathology*, **52**: 68-73.
- BELTRÁN, R., VICENT, A., SALES, R., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ARMENGOL, J. 2005. Population dynamics of *Monosporascus cannonballus* ascospores in marsh soils in eastern Spain. *European Journal of Plant Pathology*, **113**: 357-365.
- BIERNACKI, M., BRUTON, B. D. 2001. Quantitative response of *Cucumis melo* inoculated with root rot pathogens. *Plant Disease*, **85**: 65-70.
- BRUTON, B. D. 1995. Optimum CFU concentrations for testing pathogenicity of California cucurbit isolates of *Monosporascus cannonballus*. *Phytopathology*, **85**: 1119.
- BRUTON, B. D. 1998. Soilborne diseases in cucurbitaceae: pathogen virulence and host resistance. In: McCreight, J., Eds: Cucurbitaceae'98. American Society of Horticultural Science Press, Alex., Va. 143-166 pp.
- BRUTON, B. D., RUSSO, V. M., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., MILLER, M. E. 1998. Carbohydrate partitioning, cultural practices, and vine decline disease of cucurbits. In: Cucurbitaceae'98. McCreight, J., Ed. American Society of Horticultural Science Press, Alex., Va. 189-209 pp.
- BRUTON, B. D., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., POPHAM, T. W. 2000a. Assessment of virulence of *Acremonium cucurbitacearum* and *Monosporascus cannonballus* on *Cucumis melo*. *Plant Disease*, **84**: 907-913.
- BRUTON, B. D., POPHAM, T. W., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ARMENGOL, J., MILLER, M. E. 2000b. Disease reaction among selected Cucurbitaceae to an *Acremonium cucurbitacearum* isolate from Texas. *Hort Science*, **35**(4): 677-680.
- COHEN, R., PIVONIA, S., BURGER, J., EDELSTEIN, M., GAMLIEL, A., KATAN, J. 2000. Toward integrated management of *Monosporascus* wilt of melons in Israel. *Plant Disease*, **84**(5): 496-505.
- DHINGRA, O. D., SINCLAIR, J. B. 1995. Basic Plant Pathology methods. Ed. Lewis Publishers. Boca Ratón. Florida (USA). 355 pp.
- DOMSCH, K. H., GAMS, W. 1972. Fungi in agricultural soils. Ed. Longman, London. 290 pp.
- GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ARMENGOL, J., MARTÍNEZ-FERRER, G., VELÁZQUEZ, M. T., ALFARO-GARCÍA, A. 1992. Evolución del aspecto de la raíz de melón y de su micoflora asociada en una parcela afectada de muerte súbita. *Phytoma España*, **41**: 13-18.
- GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ARMENGOL, J., MARTÍNEZ-FERRER, J. 1994a. Puntos negros de las raíces de melón y sandía. En: Díaz-Ruiz, J.R., y García-Jiménez, J. Enfermedades de las cucurbitáceas en España. Ed: Phytoma-España, 155 pp.
- GARCÍA-JIMÉNEZ, J., VELÁZQUEZ, M. T., JORDÁ, C., ALFARO-GARCÍA, A. 1994b. *Acremonium* species as the causal agent of muskmelon collapse in Spain. *Plant Disease*, **78**(4): 416-419.
- GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ARMENGOL, J., SALES, R., JORDÁ, C., BRUTON, B. D. 2000. Fungal pathogens associated with melon collapse in Spain. *Bulletin-OEPP*, **30**: 169-173.
- LOBO-RUANO, M. 1990. Colapso del melón producido por hongos del género *Monosporascus*. *Bol. San. Veg. Plagas*, **16**: 701-707.
- MARTYN, R. D., MILLER, M. E. 1996. *Monosporascus* root rot and vine decline: an emerging disease of melons worldwide. *Plant Disease*, **80**(7): 716-725.
- MERTELY, J. C., MARTYN, R. D., MILLER, M. E., BRUTON, B. D. 1991. Role of *Monosporascus cannonballus* and other fungi in a root rot/vine decline disease of muskmelon. *Plant Disease*, **75**: 1133-1137.
- MERTELY, J. C., MARTYN, R. D., MILLER, M. E., BRUTON, B. D. 1993. An expanded host range for the muskmelon pathogen *Monosporascus cannonballus*. *Plant Disease*, **77**: 667-673.



- MILLER, M. E., BRUTON, B. D., FARR, D. F. 1996. Association of a *Stagonospora*-like fungus on roots of melons exhibiting vine decline symptoms. *Phytopathology*, (Suppl.) **86**: s3.
- PÉREZ-PIQUERES, A. 2002. Caracterización y análisis filogenético de *Plectosporium tabacinum* (van Beyma) M.E. Palm, W. Gams et Nirenberg. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- PIVONIA, S., COHEN, R., KAFKAFI, U., BEN ZE'EV, I.S., KATAN, J. 1997. Sudden wilt of melons in southern Israel: fungal agents and relationship with plant development. *Plant Disease*, **81**(11): 1264-1268.
- PIVONIA, S., COHEN, R., KATAN, J., KIGEL, J. 2002. Effect of fruit load on the water balance of melon plants infected with *Monosporascus cannonballus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **60**: 39-49.
- SALES, R., ARMENGOL, J., VICENT, A., GARCÍA-JIMÉNEZ, J. 2001. Evaluación de daños en raíces de melón y sandía y frecuencia de aislamiento de *Acremonium cucurbitacearum* y *Monosporascus cannonballus* en una parcela afectada de colapso. *Bol. San. Veg. Plagas*, **27**: 177-183.
- TELLO, J.C., GÓMEZ, J., CAMPOROTA, P., LACASA, A. 1990. Capacidades parasitarias de *Pythium aphanidermatum* y de *Rhizoctonia solani* sobre pepino y melón. *Bol. San. Veg. Plagas*, **16**: 733-741.

(Recepción: 21 julio 2006)

(Aceptación: 20 noviembre 2006)



## El Escudete de la aceituna I: Biología y daños en olivares de la provincia de Sevilla

N. GONZÁLEZ, E. VARGAS-OSUNA, A. TRAPERO

El Escudete de la aceituna, causado por el hongo *Camarosporium dalmaticum*, es una enfermedad ampliamente distribuida en la Cuenca Mediterránea pero de escasa importancia general, aunque en ocasiones se han observado graves ataques que suponen una merma considerable en la calidad de la aceituna de verdeo. La incidencia del patógeno se ha asociado a los daños previos causados por la mosca del olivo (*Bactrocera oleae*) y a la presencia de un posible agente vector, el díptero cecidómido *Prolasioptera berlesiana*, cuyas larvas pueden alimentarse de huevos de la mosca. En nuestras observaciones de campo y en los análisis de laboratorio no se observó *C. dalmaticum* ni *P. berlesiana* en las aceitunas sin daños de mosca. Los datos obtenidos de incidencia de Escudete y del cecidómido no permiten confirmar ni rechazar la hipótesis de que *P. berlesiana* sea vector de *C. dalmaticum*, ya que en un porcentaje elevado (77.5%) de aceitunas con Escudete no se encontró *P. berlesiana* y en el escaso número de larvas de cecidómido analizadas no se detectó *C. dalmaticum*. La mayor incidencia de *P. berlesiana* en picada de mosca no viva frente a picada viva, así como en lesiones de Escudete, sugiere el papel del mosquito como depredador de huevos de mosca y/o micófago, si bien habría que confirmar estas posibilidades con trabajos en condiciones controladas. El estado sexual del hongo, desconocido hasta ahora, no se ha podido obtener en condiciones controladas, aunque se produjeron cuerpos inmaduros que podrían corresponderse con ascomas de dicho estado. Las aceitunas afectadas de Escudete produjeron un aceite de calidad "Virgen Extra", aunque con mayor acidez e índice de peróxidos y menor estabilidad que el obtenido de aceitunas sanas.

N. GONZÁLEZ, A. TRAPERO. Grupo de Patología Agroforestal, Dpto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071-Córdoba, España. Dirección de correo electrónico: trapero@uco.es  
E. VARGAS-OSUNA. Grupo de Entomología Agroforestal. Dpto. Ciencias y Recursos Agrarios y Forestales, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071-Córdoba, España.

**Palabras clave:** *Bactrocera oleae*, *Botryosphaeria dothidea*, *Camarosporium dalmaticum*, *Prolasioptera berlesiana*, calidad de aceite.

### INTRODUCCIÓN

El Escudete de la aceituna, causado por el hongo *Camarosporium dalmaticum*, es una enfermedad ampliamente distribuida en la Cuenca Mediterránea, pero de escasa importancia general (TRAPERO y BLANCO, 2004). Las aceitunas afectadas presentan una lesión necrótica circular muy característica, que da

nombre a la enfermedad en español y en portugués, y que las inutiliza para mesa o verdeo (ANDRÉS, 1991). El efecto ocasionado en la extracción y calidad del aceite parece escaso, pero no ha sido suficientemente estudiado. SALGUES (1937) indica una disminución en el contenido de aceite en torno al 3 % y VERONA (1952) recomienda un trato separado para las aceitunas afectadas.

La enfermedad presenta generalmente una baja incidencia, aunque pueden darse condiciones determinadas en espacio y/o tiempo que le hagan cobrar un protagonismo destacado. Ello ocurrió en Brindisi (Italia), en el año 2002, donde las condiciones de temperatura y humedad mucho más elevadas que en años anteriores estuvieron asociadas con graves ataques de Escudete (LONGO *et al.*, 2004). En general, la enfermedad se desarrolla durante el verano, con tiempo muy seco y caluroso, lo que ha llevado implicar a otros agentes bióticos como vectores de *C. dalmaticum* (PETRI, 1915; HARPAPAZ y GERSON, 1966; ANDRÉS, 1991).

Las infecciones causadas por *C. dalmaticum* están relacionadas con las heridas de oviposición causadas por la plaga principal del olivo, la mosca *Bactrocera oleae*, especie que se caracteriza por estar asociada a un reducido número de enemigos naturales que regulen sus poblaciones (CIVANTOS, 1999). El díptero cecidómido *Prolasioptera berlesiana* es un tercer agente relacionado con los dos anteriores (LONGO *et al.*, 2004), forma parte del complejo de enemigos naturales de la mosca pues es citado como depredador de huevos de ésta y además se ha sugerido que pueda actuar como vector de *C. dalmaticum* (ARAMBOURG, 1986; FRAVAL, 1997), sobre todo en condiciones de humedad especialmente baja y elevada temperatura. Este cecidómido, al pasar el invierno en forma de pupa en el suelo, podría adquirir las esporas del hongo procedentes de frutos, hojas y ramitas de olivo caídas y llevar consigo el patógeno hasta las aceitunas, constituyendo así la fuente de inóculo primario (SAREJANNI y PAPAIOANNAU, 1952). LA GRECA y VRENNNA (1995) consideran a este cecidómido como el principal responsable de la dispersión del hongo al existir una relación saprofítica con éste y ectoparasitaria con *B. oleae* (Figura 1). Según esta hipótesis los ciclos secundarios de la enfermedad vendrían condicionados a nuevas generaciones del insecto, aunque las interacciones entre los tres agentes no se han probado suficientemente (ANDRÉS, 1991).

Ante la escasez de estudios sobre esta enfermedad en España, se planteó este trabajo inicial, cuyos objetivos han sido: 1) identificar y relacionar los agentes asociados a los daños en aceituna durante su crecimiento y maduración; 2) inducir el estado sexual de *C. dalmaticum* puesto que no se conoce y podría jugar un papel importante en la supervivencia, variabilidad y dispersión del patógeno; y 3) determinar los efectos que infecciones de *C. dalmaticum* podrían tener en la calidad del aceite.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Muestreos en campo

Para la toma de muestras se seleccionaron dos parcelas situadas en la Sierra Sur de Sevilla, una zona endémica de mosca que en años anteriores habían presentado una elevada incidencia de Escudete. La Parcela 1, situada en el término municipal de Algámitas, estaba plantada con la variedad 'Hojiblanca', pero tenía también algunos árboles de 'Manzanilla de Sevilla' y la producción se destinaba al verdeo. La Parcela 2, situada en Villanueva de San Juan, presentaba un mayor número de variedades entre las que destacaban 'Lechín de Sevilla' como principal y un cultivar local de Marchena, 'Tetuda', destinando la producción para aceite. Semanalmente, de julio a septiembre de 2004, se recogieron de 50 a 200 aceitunas entre ambas parcelas, muestreando una superficie de 3-4 has en cada una. El muestreo fue dirigido a frutos que presentaran algún tipo de daño (biótico o abiótico) y en los que posteriormente se intentaba detectar la presencia de *P. berlesiana* y el desarrollo de *C. dalmaticum*. Los muestreos iban encaminados también a la obtención de adultos del cecidómido para su determinación taxonómica y a la observación de los estados preimaginales (huevo, larva y pupa) del mismo. También se colocaron trampas cromotrópicas amarillas engomadas para hacer un seguimiento poblacional de los adultos del cecidómido aunque no se tenía constancia de su efectividad.

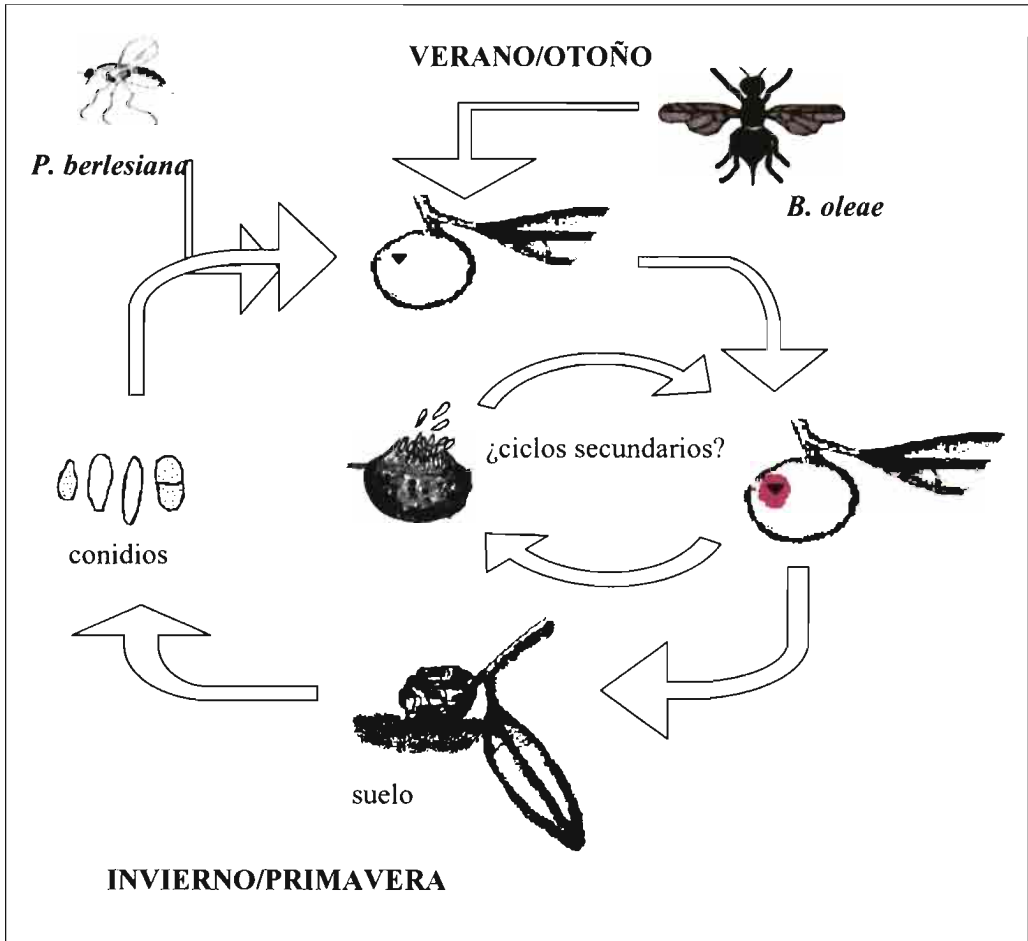


Figura 1. Ciclo biológico del hongo *Camarosporium dalmaticum* y su relación con la mosca (*Bactrocera oleae*) y el mosquito (*Prolasioptera berlesiana*) de la aceituna.

### Observaciones en laboratorio

Las aceitunas se lavaron bajo chorro de agua durante 30 minutos y se secaron en cámara de flujo laminar, lugar donde se hicieron todas las observaciones. A continuación se inspeccionaron en el microscopio estereoscópico cada una de las lesiones que presentaban las aceitunas. Con un escalpelo se retiraban finas láminas de la zona lesionada y se extraía un pequeño trozo de la zona interior dañada que se colocaba en una placa Petri de 6 cm de diámetro con un disco de papel estéril humedecido con agua destilada

desionizada (ADD) estéril para evitar la desecación. El tipo de lesión se clasificó en dos categorías principales: herida producida por *B. oleae* al realizar la puesta (picada de mosca) y herida producida por cualquier otro tipo de agente (biótico o abiótico). Estas dos categorías se dividían a su vez en otras dos, según hubiese o no presencia del cecidómido. Por último, en las aceitunas con picada de mosca se indicaba si era picada viva o no, llamando picada viva a la que llevaba asociada la presencia de la mosca en alguno de sus estados preimaginales. Las heridas de

salida de la mosca también se incluyeron como picada viva aunque no existiese ningún estado del insecto, ya que era evidente el desarrollo previo de la mosca en la aceituna. Tras las observaciones en el microscopio estereoscópico, las aceitunas se colocaban en una bandeja con perlita estéril humedecida con ADD. La bandeja, previamente lavada y desinfectada, se colocaba en una cámara de incubación a 25°C y se observaba durante las tres semanas siguientes el desarrollo de *C. dalmaticum*. Si durante las inspecciones de aceitunas se detectaba algún huevo, larva o pupa de *P. berlesiana*, esta aceituna se individualizaba en una cajita cerrada dejando evolucionar al insecto para obtener adultos.

#### **Aislamiento de *Camarosporium dalmaticum***

A partir de los trocitos de pulpa tomados en la observación de las lesiones en aceitunas y de larvas del cecidómido, se llevaron a cabo aislamientos de *C. dalmaticum* para los que se empleó como medio Patata-Dextrosa-Agar (PDA). Los cultivos puros obtenidos se mantuvieron en el medio PDA y, a partir de ellos, se prepararon aislados monoconídicos siguiendo la metodología habitual (DHINGRA y SINCLAIR, 1995).

De las larvas de *P. berlesiana* se intentó aislar el hongo mediante dos métodos: desinfectándolas superficialmente con lejía (15% durante 30 segundos) y sin desinfectar. Tras el tratamiento la larva se trituraba en un vidrio de reloj con 250 µl de ADD estéril y se hacía una siembra masal en PDA. Se sembraron 8 larvas desinfectadas y 12 larvas sin desinfectar. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 22°C bajo luz-oscuridad (12 h-12 h).

#### **Identificación de los agentes**

En la identificación de *B. oleae* se consideró suficiente la observación en los frutos de las heridas de puesta o salida características de este díptero y de los estados preimaginales (huevo, larva y pupa). Los adultos del cecidómido, obtenidos a partir de larvas

que se habían dejado evolucionar en condiciones controladas de 22° C y 12 h luz- 12 h oscuridad, fueron identificados mediante claves taxonómicas (ARAMBOURG, 1986). Por último, se realizaron montajes para la observación al microscopio de las estructuras del hongo (picnidios y conidios) formadas en las lesiones de las aceitunas o desarrolladas en el medio de cultivo PDA.

Para inducir el desarrollo del estado sexual de *C. dalmaticum* se llevó a cabo un ensayo inicial utilizando una suspensión de micelio y conidios obtenida a partir de la mezcla de 6 aislados monoconídicos procedentes de las parcelas de muestreo. En ella se introdujeron durante 45 min dos sustratos esterilizados: ramitas de olivo de un año de edad y palillos de higiene dental. Las ramitas fueron colocadas en cajas de plástico con un ambiente saturado de humedad (LÓPEZ-DONCEL *et al.*, 2000), mientras que los palillos se dispusieron en placas de Petri con el medio Czapek-Dox, colocándose tres palillos formando una "N" en cada placa (CORRELL *et al.*, 2000). En ambos casos las condiciones de incubación fueron 12 h luz- 12 h oscuridad a 22°C y se realizaron observaciones quincenales de los sustratos inoculados, así como montajes para observación microscópica de los cuerpos formados.

#### **Análisis de aceitunas y aceite**

En noviembre de 2004 se tomaron dos muestras de frutos de la variedad 'Manzanilla de Sevilla' de la parcela "Triángulo" del C.I.F.A.-Alameda del Obispo (Córdoba), una de aceitunas afectadas de Escudete con distinta severidad y otra de aceitunas sanas. Se determinó el índice de madurez (ANDRÉS, 1991) y el índice de severidad de las infecciones, considerando 4 clases en función de la superficie de la aceituna afectada por la enfermedad (1 = <25%, 2 = 25-50%, 3 = 50-75%, 4 = >75%). Las muestras se llevaron a la almazara experimental del Instituto de la Grasa de Sevilla en cuyo laboratorio se analizaron los siguientes parámetros: % Humedad, contenido en aceite parcial (ABENCOR) y aceite total (SOXHLET), contenido

en aceite sobre materia seca, acidez (% ácido oleico), índice de peróxidos (meqO<sub>2</sub>/kg), absorbancia a la radiación ultravioleta (K<sub>270</sub>, K<sub>232</sub>, Δ K), estabilidad (RANCI-MAT) y valoración sensorial (ANÓNIMO, 1999).

**Análisis de los datos**

Los datos de desarrollo del hongo en la placas de medio de cultivo se sometieron a un análisis estadístico de la Chi-cuadrado para comprobar si los valores de frecuencia obtenidos eran o no significativamente diferentes a los teóricos. El análisis se aplicó a la incidencia de *P. berlesiana* en relación al tipo de daño en las aceitunas y a la incidencia de *C. dalmaticum* según tipo de daño y presencia de *P. berlesiana*.

**RESULTADOS**

**Evaluación de síntomas y daños en aceitunas**

Los daños observados en las aceitunas se clasificaron en cuatro categorías: “picada viva” de mosca, “picada no viva” de mosca, Escudete y otros. En la categoría “Escudete” se incluyeron las aceitunas con claros síntomas de esta enfermedad (Figura 2). Todas las aceitunas afectadas de Escudete presentaron “picada” de mosca aproximadamente en el centro de la lesión necrótica (Figura 3). Finalmente, en la categoría “otros daños” se incluyeron pequeños daños o heridas del fruto que no se podían identificar como “picada” de *B. oleae*. En estas aceitunas no se detectó la presencia de ninguno de los agentes estudiados.



Figura 2. Aceitunas de la variedad ‘Tetuda’ afectadas de Escudete (izqda: frutos momificados de suelo; drcha. inferior: frutos momificados del árbol; y drcha. superior: frutos inmaduros). Nótese los picnidios de *C. dalmaticum* en el interior de las lesiones.

Los ataques de Escudete fueron más frecuentes en las variedades de mesa ('Manzanilla de Sevilla', 'Hojiblanca' y 'Tetuda') y en la orientación norte de la copa de los olivos. Se observaron dos síntomas: la mancha necrótica característica, más o menos circular, deprimida en el centro y con los bordes más elevados, y una podredumbre parcial que deshidratava y arrugaba al fruto de forma parecida al momificado producido por *Colletotrichum* spp. (Figura 2). La mancha necrótica se desarrolló durante el verano, en aceitunas verdes; mientras que la podredumbre lo hizo durante el otoño, en aceitunas maduras o en proceso de maduración. Generalmente, la podredumbre progresaba desde la mancha necrótica, pudiéndose apreciar la lesión original de Escudete en las aceitunas podridas. No obstante, muchas aceitunas afectadas de Escudete durante el verano llegaron a la madurez sin desarrollar la podredumbre.

#### Aislamiento de *Camarosporium dalmaticum*

El hongo *C. dalmaticum* se aisló muy consistentemente de las aceitunas con síntomas de Escudete. En cambio, el aislamiento del patógeno a partir de aceitunas sin síntomas resultó muy escaso, indicando que el periodo de incubación de las infecciones es muy corto, inferior a una semana, que fue el tiempo transcurrido entre las observaciones de campo. En las aceitunas asintomáticas el hongo sólo se aisló de las que presentaron daños de mosca, tanto de las que tenían heridas de oviposición como de las que presentaban orificios de salida.

En la siembra a partir de larvas de *P. berlesiana* no se desarrolló ningún microorganismo cuando se desinfestaron, mientras que en la siembra directa de las larvas sin desinfestar se obtuvieron bacterias en todas las placas y, en ocasiones, hongos de los géneros *Aureobasidium* y *Cladosporium*.

#### Identificación de los agentes

Los adultos del cecidómido, obtenidos todos ellos de las larvas recogidas en las



Figura 3. Lesión de Escudete con picnidios de *C. dalmaticum* y herida de puesta de *Bactrocera oleae*.

aceitunas, pues no se hallaron adultos en las trampas cromotrópicas, se clasificaron taxonómicamente como *Prolasioptera berlesiana*, en base a sus caracteres morfológicos externos, tales como antenas, oviscapto y sistema de venación alar.

La presencia del cecidómido coincidió con los ataques de *C. dalmaticum* en campo durante los meses de agosto y septiembre. En los meses de octubre y noviembre no se tomaron muestras aunque sí se detectó en frutos aislados afectados por el hongo. Se encontraron todos los estadios preimaginales: huevo similar al de *B. oleae* pero de menor tamaño (Figura 4a), larva al principio blanquecinas (Figura 4b) que se tornaban anaranjadas con la edad (Figura 4c), con un periodo de desarrollo larvario de 3 semanas (a 22° C con 12 h luz-12 h oscuridad) al final del cual abandonaban la aceituna para pupar (Figura 4d), pupa de color rosado (Figura 4e) y finalmente adulto (Figura 4f).

Las observaciones morfológicas de las estructuras fúngicas (picnidios y conidios) formadas en las lesiones de las aceitunas y en el medio de cultivo nos llevaron a identificar al hongo fitopatógeno como *Camarosporium dalmaticum* (ZACHOS Y TZAVELLA-KLONARI, 1979). Los conidios presentaron una gran variación en forma, tamaño y coloración, incluso dentro de un mismo aislado monoconídico, confirmando la elevada



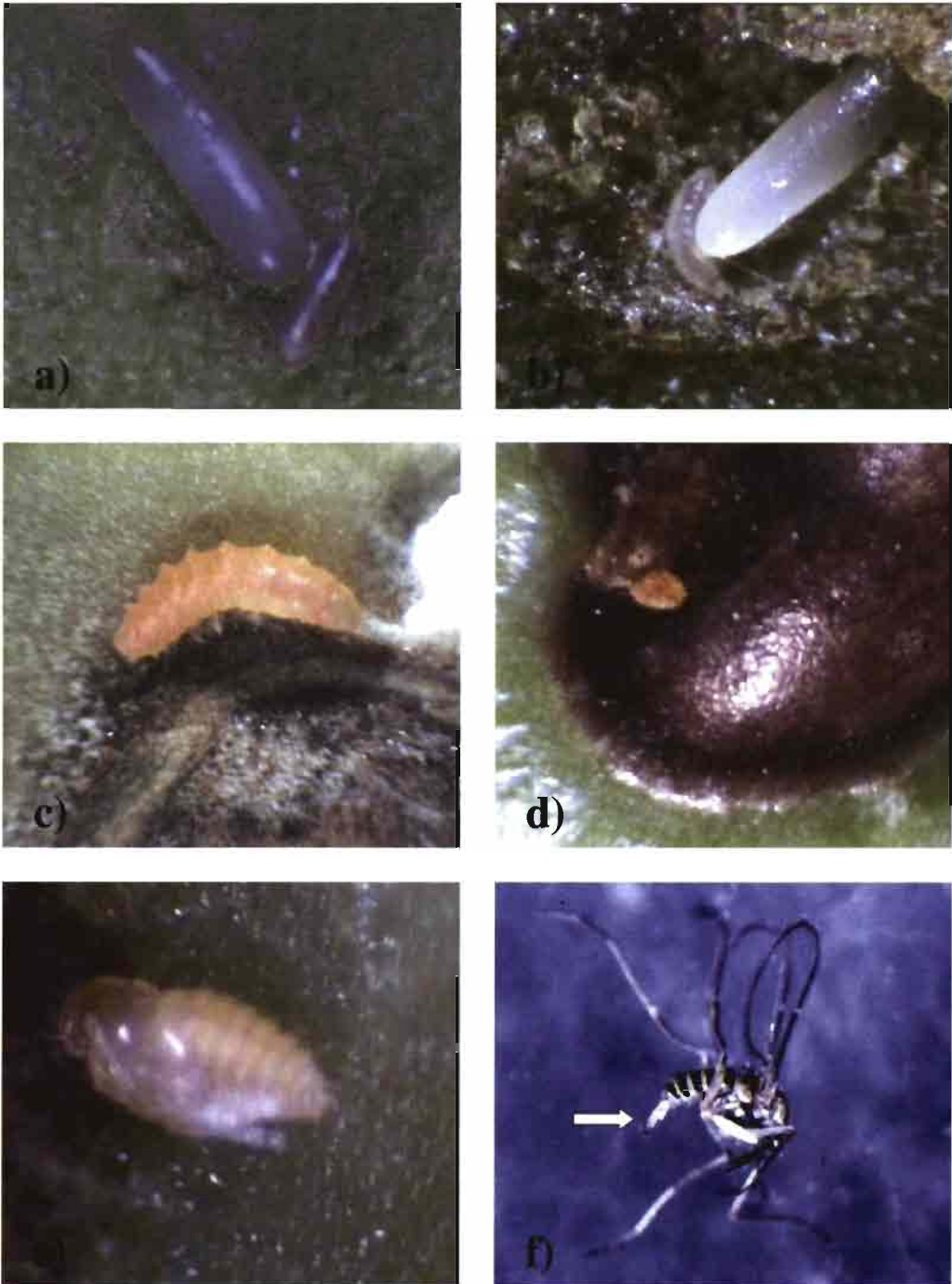


Figura 4. Fases de desarrollo de *P. berlesiana*: a) Huevo de *P. berlesiana* (menor tamaño) junto a un huevo de *B. oleae*, b) Larva junto a un huevo de *B. oleae*, c) Larva desarrollada, d) Larva de *P. berlesiana* abandonando el fruto por el orificio de puesta de *B. oleae*, e) Pupa, f) Hembra adulta (detalle del ovíscapo).

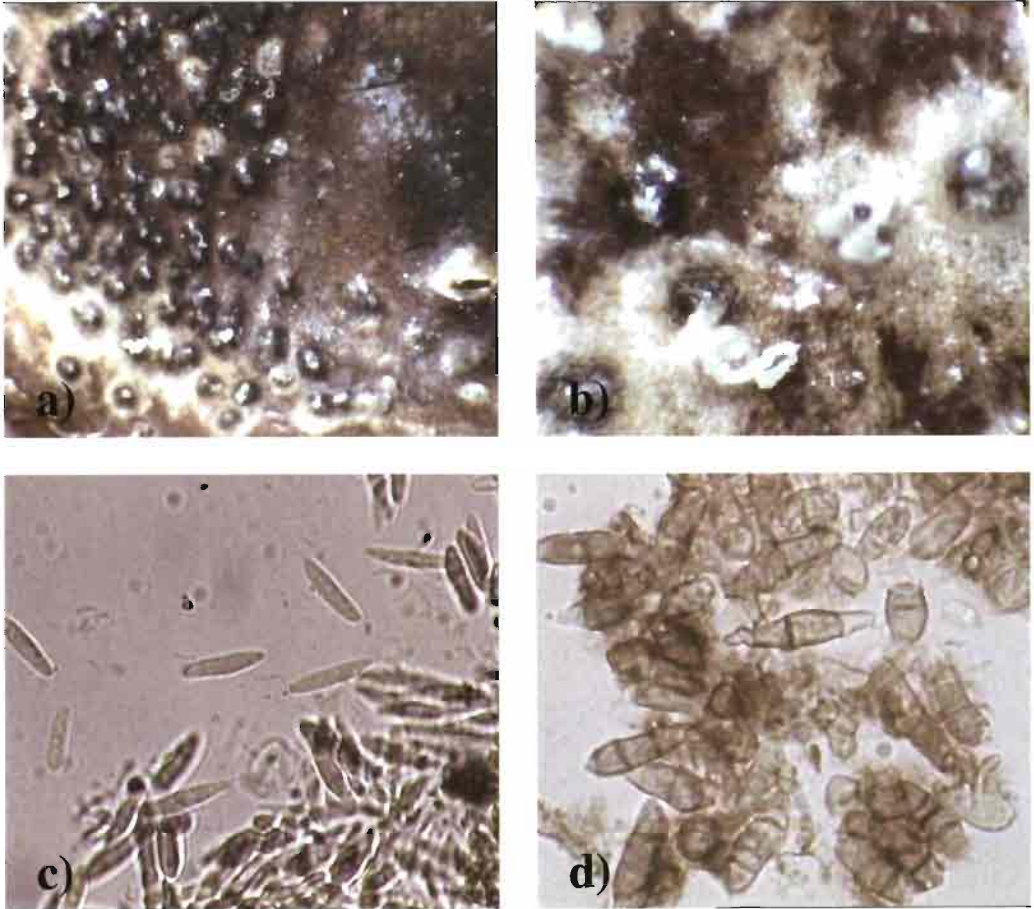


Figura 5. Picnidios y conidios de *Camarosporium dalmaticum* formados en las lesiones de Escudete: a) picnidios junto a herida de puesta de mosca, b) detalle de picnidios con filamentos blanquecinos (cirros) de conidios, c) conidios hialinos, fusiformes y aseptados, d) conidios oscuros, ovoides y septados.

variabilidad morfológica de este hongo (Figura 5).

El ensayo de reproducción sexual se mantuvo durante 3 meses al cabo de los cuales se obtuvieron, únicamente en las ramitas de olivo, picnidios con conidios de *C. dalmaticum* y algunos cuerpos inmaduros que podrían corresponderse con ascomas (pseudotecas) o espermogonios del hongo (Figura 6).

#### **Incidencia de los agentes**

Se determinó la incidencia de *C. dalmaticum* y de *P. belesiana* para cada categoría de

daño: picada viva de mosca, picada no viva, Escudete y otros daños (Cuadro 1). En primer lugar hay que destacar que no se observó ni *P. belesiana* ni *C. dalmaticum* en aceitunas catalogadas con otros daños, es decir, sin “picada” de mosca. La evolución temporal de los diferentes tipos de daños y agentes asociados (Figura 7) ha puesto de manifiesto que las heridas de puesta de la mosca comenzaron a observarse desde principios de julio, mientras que los síntomas de Escudete no se observaron hasta un mes después. No obstante, durante las primeras 5 semanas fueron

Cuadro 1. Incidencia de *Prolasioptera berlesiana* y *Camarosporium dalmaticum* en función de la categoría de daños observados en aceitunas

CATEGORÍA DE DAÑO <sup>1</sup>	N (nº casos)	%CADA CATEGORÍA DE DAÑO	INCIDENCIA DE <i>P. berlesiana</i> (%)	INCIDENCIA DE <i>C. dalmaticum</i> (%)	
				CON <i>P. berlesiana</i>	SIN <i>P. berlesiana</i>
Picada viva	845	49.8	5.1	1.1	1.3
Picada no viva	225	13.3	10.7	5.3	3.5
Escudete	396	23.3	22.5	22.5	77.5
Otros daños	230	13.6	0	0	0
<b>TOTAL</b>	1696	100	9.2	6.5	19.2
<b>TOTAL (sin contar otros daños)</b>	1466	100	10.6	7.5	22.2

<sup>1</sup>**Picada viva** = herida de puesta de la mosca (*Bactrocera oleae*) con algún estado imaginal (huevo, larva, pupa) o herida de salida de la mosca, **picada no viva** = herida de puesta de la mosca sin estados preimaginales, **Escudete** = aceitunas con lesiones típicas de esta enfermedad, **otros daños** = pequeñas heridas no asociadas con ninguno de los tres agentes estudiados.

muy abundantes los daños o heridas no asociados con ninguno de los agentes estudiados. A partir de la sexta semana el muestreo se dirigió principalmente a las aceitunas "picadas" de mosca, ya que en todas las aceitunas con lesión de Escudete se hallaron las heridas de oviposición.

En las aceitunas dañadas de mosca, la incidencia total de *P. berlesiana* resultó baja (10.6%), dándose el mayor valor en las que estaban afectadas con Escudete (22.5%). En frutos sólo atacados por *B. oleae* se obtuvo una mayor incidencia del cecidómido en

picada no viva (10.7%) que en picada viva (5.1%), sin poder descartar la posibilidad de que en un principio hubiese habido un huevo de mosca que habría sido devorado por la larva de *P. berlesiana*.

Por otro lado, la incidencia de *C. dalmaticum* se determinó para las mismas categorías de daño pero haciendo además la separación de con o sin presencia de *P. berlesiana*. La incidencia global de *C. dalmaticum* fue del 29.7%, 22.2% sin presencia de *P. berlesiana* y 7.5% con el cecidómido, aunque no podemos descartar que en algunas muestras el cecidómido podría haber abandonado ya la aceituna para pupar. Considerando separadamente por categoría de daño, *C. dalmaticum* se obtuvo en el 100% de las aceitunas afectadas de Escudete y en el 3.7% de las "picadas" de mosca (8.9% en picada no viva y 2.4% en picada viva).

El análisis estadístico de la Chi-cuadrado puso de manifiesto diferencias significativas respecto a la incidencia de *P. berlesiana* y *C. dalmaticum* para los diferentes tipos de daños. Así, la incidencia conjunta de ambos agentes (7.5%) fue mayor que la esperada por efecto del azar (3.2%,  $P = 0.05$ ); mientras que tanto *P. berlesiana* como *C. dalmaticum* tuvieron una mayor presencia relativa en la picada no viva que en la picada viva de mosca (Cuadro 1).

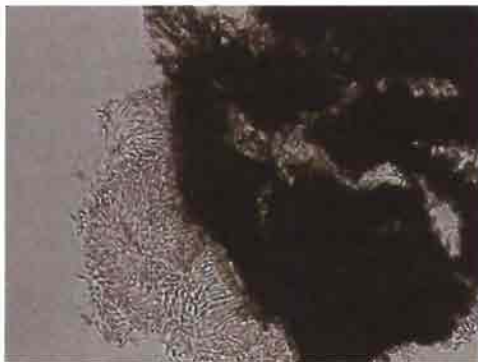


Figura 6. Cuerpos inmaduros (ascomas o espermatogonios) formados en las ramitas de olivo inoculadas con una mezcla de aislados de *C. dalmaticum*.

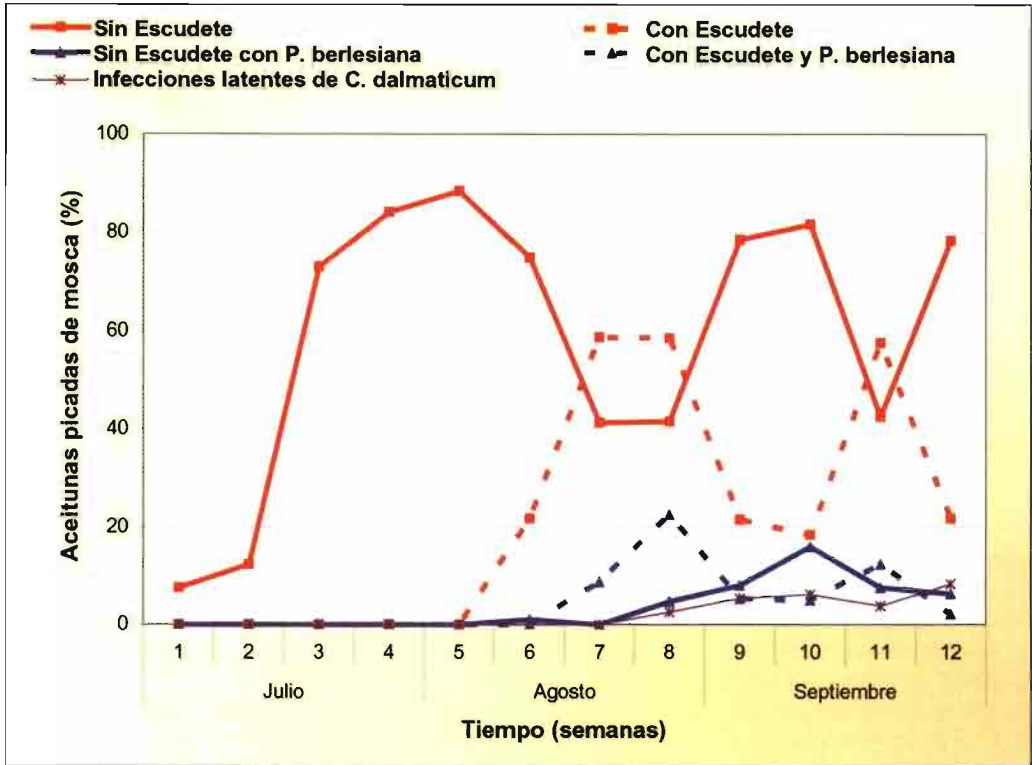


Figura 7. Evolución temporal de la incidencia de aceitunas “picadas” de mosca (*B. oleae*) en relación con la incidencia de Escudete (*C. dalmaticum*) y del cecidómido (*P. berlesiana*). La muestra semanal incluyó de 50 a 200 aceitunas dañadas.

### Análisis de aceitunas y aceite

Aunque no pudo realizarse ningún tipo de análisis estadístico debido a que no se repitieron los muestreos, ambos grupos de aceitunas (sanas y afectadas de Escudete) dieron resultados muy similares en casi todos los parámetros, incluso el contenido en aceite parcial según ABENCOR, el cuál se aproxima al rendimiento industrial, resultó similar en los dos casos. Tan sólo se observaron diferencias en acidez, índice de peróxidos y estabilidad de forma llamativa (Cuadro 2). Pese a ello, el aceite procedente de aceitunas con Escudete se catalogó como “Virgen Extra”.

### DISCUSIÓN

La presencia de Escudete estuvo asociada totalmente a la herida de oviposición carac-

terística de *B. oleae*, apoyando la correlación encontrada por HARPAY y GERSON (1966), de la cual se deduce que el hongo entra en el fruto a través de los orificios de puesta o de salida de la mosca. Los mayores daños se dieron en las variedades de verdeo y en la cara norte del olivo, observaciones ya indicadas por De Laurentiis (1993), La GRECA y VRENNA (1995) y LONGO *et al.* (2004). Aunque la relación entre daños de mosca y ataques de Escudete está generalmente aceptada (PETRI, 1915; ANDRÉS, 1991), diversos autores han observado ataques de Escudete sin heridas de mosca u otros agentes (NAVARRO, 1923; MATEO-SAGASTA, 1968). Es probable que en condiciones ambientales favorables la enfermedad pueda desarrollarse sin presencia de heridas, sobre todo durante la maduración de la aceituna en otoño, como

Cuadro 2. Caracterización del aceite de aceitunas sanas y afectadas de Escudete

Parámetro	Aceituna Sana	Aceituna con Escudete
Índice de madurez	1.99	2.21
Severidad	0	2.01
Humedad %	64.34	62.65
Aceite parcial: ABENCOR %	12.96	12.96
Aceite total: SOXHLET %	12.37	17.85
Aceite sobre materia seca %	48.70	47.8
Acidez: % ácido oleico	0.34	0.55
Índice de peróxidos: meqO <sub>2</sub> / kg	3.7	6.2
K <sub>270</sub>	0.16	0.15
Δ K	0	0
K <sub>232</sub>	1.73	1.74
Estabilidad (horas a 98° C)	97.9	71.8
Valoración sensorial	Propia de un virgen extra	Menor frescura y aroma a hierba

indican los resultados recientes de inoculaciones en condiciones controladas (GONZÁLEZ y TRAPER, 2006).

Las dos síndromes observados de la enfermedad, mancha seca y momificado, coinciden en tiempo y expresión a los descritos por otros autores y parecen estar relacionados con el estado de madurez y el contenido de agua en la aceituna (ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI, 1983). El desarrollo de la enfermedad en verano, en condiciones extremas de baja humedad y elevada temperatura, sugiere la participación de algún agente vector. Aunque los ataques de Escudete están relacionados con daños de mosca, este insecto no se ha considerado como vector de *C. dalmaticum* (ARAMBOURG, 1986; ANDRÉS, 1991), como sugieren los resultados de nuestras observaciones. En cambio, diversos autores señalan como posible vector de *C. dalmaticum* al cecidómido *P. berlesiana* (ARAMBOURG, 1986; LA GRECA y VRENA, 1995; FRAVAL, 1997). En nuestras observaciones, este cecidómido se halló en las lesiones de Escudete, pero su presencia no se detectó hasta después de los primeros síntomas de la enfermedad en campo. La incidencia de *C. dalmaticum* con presencia del cecidómido fue del 22.5%, un nivel que podría resultar bajo para considerarlo como un agente vector, sin embargo, ello es posible si

consideramos la opción de que en muchas muestras el cecidómido hubiese abandonado la aceituna para pupar. Nuestros resultados indican algún tipo de asociación entre *P. berlesiana* y *C. dalmaticum*, pero no pueden atribuirle al cecidómido la función de vector debido a los resultados negativos en el aislamiento del hongo a partir de las larvas y a la asociación completa entre daños de mosca y Escudete. Esta asociación entre *P. berlesiana* y *C. dalmaticum* podría explicarse por una mejor detección de las aceitunas afectadas de mosca, al presentar la lesión de Escudete, o por un hábito micófago de *P. berlesiana*. Sería necesario utilizar un mayor número de muestras durante varios años y experimentos en condiciones controladas para determinar con precisión la interacción entre los tres agentes estudiados en este trabajo.

La incidencia de *P. berlesiana* en aceitunas con picada de *B. oleae* no superó el 11% y fue mayor en picada no viva. En este caso, cabría suponer que la larva del cecidómido se alimenta de huevos de *B. oleae* enmascarando así el verdadero porcentaje de aceitunas con picada viva lo que explicaría la diferencia entre picada viva y no viva con presencia del cecidómido.

En cuanto al ciclo biológico del cecidómido, la fecha de emergencia y de actividad de los adultos no se puede concretar porque



no fueron atraídos por las trampas cromotrópicas. Carecemos de datos como para concretar un número de días o semanas de duración del desarrollo larvario, aunque en condiciones controladas (22°C) el desarrollo fue como mínimo de 3 semanas, lo que no se corresponde con lo señalado por ARAMBOURG (1986) quien cita periodos de desarrollo de 9 días en verano y 13 días en invierno. Se acepta generalmente que a partir del mes de octubre la especie inverna en fase de pupa hasta la próxima estación cálida (ARAMBOURG, 1986; HEFDURGUN y ONDER, 1999), pero nosotros observamos larvas hasta la 3ª semana de noviembre. Probablemente ésta fuese la generación que pasa el invierno como pupa y las diferencias en cuanto a fechas pueden deberse a las distintas temperaturas entre la zona de estudio de estos autores y la nuestra, mucho más cálida.

El hongo *C. dalmaticum* se aisló de todas las aceitunas afectadas de Escudete y en el 3.7% de los daños por mosca; mientras que no se obtuvo de las aceitunas con otros daños ni de muestras de aceitunas sanas. La baja proporción de infecciones latentes y su asociación exclusivamente con daños de mosca destacan la importancia de la interacción entre estos dos agentes en el desarrollo de la enfermedad, al menos durante el verano y principios del otoño cuando se tomaron la mayoría de las muestras. Asimismo, el escaso número de infecciones latentes durante todos los muestreos semanales sugiere un periodo de incubación de las infecciones relativamente corto, inferior a 1 semana.

Las características morfológicas de los picnidios y conidios formados en las lesiones de aceitunas y en el medio de cultivo se corresponden con el hongo *C. dalmaticum* descrito por ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI (1979). Las recientes reclasificaciones de este hongo como *Fusicoccum dalmaticum* (AA y VANEV, 2002) y *Botryosphaeria dothidea* (anamorfo *Fusicoccum aesculi*) (PHILLIPS *et al.*, 2005), junto a la gran variación observada en la forma, tamaño y coloración de los conidios, nos han llevado a realizar un

estudio más detallado sobre caracterización de este patógeno (GONZÁLEZ y TRAPERO, 2006).

El estado sexual de *C. dalmaticum* no se conoce y tampoco se ha podido inducir en condiciones artificiales. No obstante, se produjeron cuerpos inmaduros que podrían corresponderse con ascomas de dicho estado. Habría que continuar con estos ensayos, modificando las condiciones de incubación (temperatura, humedad relativa, etc.) para simular la fase de supervivencia del patógeno durante el invierno y primavera.

Son evidentes las pérdidas que *C. dalmaticum* ocasiona en el verdeo al quedar los frutos inutilizados para este fin y, por otro lado, apenas tenemos constancia del efecto que pudiera ocasionar en la calidad del aceite. Los resultados obtenidos, aunque necesitan confirmarse con un mayor número de muestras, indican que se produce un claro aumento en la acidez e índice de peróxidos de los aceites obtenidos y una disminución de su estabilidad, pero no por ello queda este aceite obtenido de frutos con Escudete fuera de la categoría de "Virgen Extra". No obstante, su menor estabilidad reduce el tiempo durante el que dicho aceite mantiene sus características organolépticas que lo catalogan como "Virgen Extra", respecto al obtenido de aceitunas sanas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a todos los miembros del grupo de investigación Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba y, en particular, a Paqui Luque por su excelente ayuda. El trabajo de campo ha sido posible gracias a la colaboración de los técnicos de las ATRIAS de olivar del Departamento de Sanidad Vegetal de Sevilla coordinados por Lola Ortega. Este trabajo forma parte de la Tesis de Master en Olivicultura y Elaiotecnia de Nazaret González Garrido y ha sido financiado por los proyectos CAO00-013 y AGL2004-7495.

## ABSTRACT

GONZÁLEZ N., E. VARGAS-OSUNA, A. TRAPERO. 2006. Dalmatian disease of olive fruits I: Biology and damages in olive orchards of the Seville province. *Bol. San. Veg. Plagas*. **32**: 709-722.

Dalmatian disease (DD) of olive fruits, caused by the fungus *Camarosporium dalmaticum*, is widespread in the Mediterranean basin but of little general importance, although sometimes serious attacks have been observed that suppose a considerable decrease in the quality of the table olives. The incidence of the pathogen has been associated to the previous damages caused by the olive fly (*Bactrocera oleae*) and to the presence of a possible vector agent, the cecydomiid *Prolasioptera berlesiana*, whose larvae can feed themselves on eggs of the olive fly. Field and laboratory observations indicated that *C. dalmaticum* and *P. berlesiana* did not cause any damage without fly attacks. Incidence of both agents did not let us to confirm or to reject the hypothesis of *P. berlesiana* as vector of *C. dalmaticum*, because a high percentage (77.5%) of olive fruits affected by DD did not bear *P. berlesiana*, and *C. dalmaticum* was not detected in isolations from cecydomiid larvae. Fruits damaged by olive fly had a higher incidence of *P. berlesiana* when they were free from olive fly eggs or larvae, or when they were affected by Dalmatian disease (DD), suggesting that *P. berlesiana* is a mycophagus and predator of olive fly. This suggestion needs to be confirmed under controlled conditions. Attempts to induce the sexual stage or teleomorph of *C. dalmaticum* under controlled conditions were unsuccessful, although we observed some pseudosclerotia like bodies that could be immature ascomata. Olive fruits affected by DD produced Extra Virgin oil, although it had higher acidity, higher peroxide index and lower stability than oil produced from healthy olive fruits.

**Keys words:** *Bactrocera oleae*, *Botryosphaeria dothidea*, *Camarosporium dalmaticum*, *Prolasioptera berlesiana*, olive oil quality.

## REFERENCIAS

- AA, H.A. VAN DER, VANEV, S. 2002. A revision of the species described in *Phyllosticta*. CBS, Utrecht, The Netherlands. 510 pp.
- ALVARADO, M., CIVANTOS, M., DURÁN, J. M. 2004. Plagas. In: El cultivo del olivo. Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. eds. Coedición Junta de Andalucía/Mundi-Prensa. Madrid. pp. 481-556.
- ANALYTICAL SOFTWARE. 2003. Statistix 8. User's manual. Tallahassee, FL. 359 pp.
- ANDRÉS CANTERO, F. 1991. Enfermedades y plagas del olivo. Riquelme y Vargas Ediciones. Jaén. 646 pp.
- ANÓNIMO, 1999. Analista de laboratorio de almazara. Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Sevilla. 111 pp.
- ARAMBOURG, Y. 1986. Traité d'entomologie oleicole. Consejo Oleícola Internacional, Madrid. 360 pp.
- CIVANTOS, M. 1999. Control de plagas y enfermedades de olivar. Consejo Oleícola Internacional, Madrid. 207 pp.
- CORRELL, J. C., GUEBER, J. C., WASILWA, L. A., SHERALL, J. F., MORELOCK, T. E. 2000. Inter- and intraspecific variation in *Colletotrichum* and mechanisms which affect population structure. In: *Colletotrichum*: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction. APS Press, St. Paul, MN. pp 145-179.
- DE LAURENTIIS, G. 1993. Attacchi di *Prolasioptera berlesiana* sulle olive in Abruzzo. *Informatore Agrario*, **49**: 49-50.
- DHINGRA, O. D., SINCLAIR, J. B. 1995. Basic plant pathology methods. CRC Press, Boca Raton, FL. 434 pp.
- FRAVAL, A. 1997. Olive fruit midge. [www.inra.fr/Internet/Produits/HYPYZ](http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYPYZ)
- GONZÁLEZ, N., TRAPERO, A. 2006. El Escudete de la aceituna II: Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica del agente causal. *Bol. San. Veg. Plagas*. **32**: xxx-xxx.
- HARPAZ, I., GERSON, U. 1966. The biocomplex of the olive fruit fly (*Dacus oleae* Gmel.), the olive fruit midge (*Prolasioptera berlesiana* Paoli), and the fungus *Macrophoma dalmatica* Berl.&Vogl. in olive fruits in the Mediterranean basin. *Scripta Hierosolymitana, Jerusalem*, **18**: 81-126.
- HEPDURGUN, B., ONDER, F. 1999. *Lasioptera berlesiana* Paoli (Diptera: Cecidomyiidae) (Zeytin Kzlkurdu) nn biyolojisi uzerinde arastramalar. *Turkiye Entomoloji Dergisi*, **23**: 191-202.
- IANNOTTA, N., PERRI, E., SIRIANNI, R., TOCCI, C. 1999. Influence of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig.) and *Camarosporium dalmatica* (Thüm.) attacks on olive quality. *Acta Horticulturae*, **474**: 573-576.
- LA GRECA, L., VRENNA, G. 1995. Danni da *Sphaeropsis dalmatica* in Calabria. *Informatore fitopatologico*, **45**: 32-33.
- LONGO, O., CAVALLO, C., D'AGNANO, G., SCHIAVONE, D., PORCELLI, F. 2004. Inusuale cascola di olive per azione combinata di tre parassiti. *Informatore Agrario*, **22**: 57-59.

- LÓPEZ-DONCEL, L. M., VIRUEGA, J. R., TRAPERO, A. 2000. Respuesta del olivo a la inoculación con *Spiroclaea oleagina*, agente del repilo. *Bol. San. Veg. Plagas*, **26**: 349-363.
- MATEO-SAGASTA AZPEITIA, E. 1968. Notas sobre un nuevo tipo de ataque criptogámico en aceitunas españolas posiblemente atribuible a una nueva forma de ataque del hongo *Macrophoma dalmatica*. *Bol. Patol. Veg. Entomol. Agric.*, **30**: 137-146.
- NAVARRO, L. 1923. Las enfermedades del olivo. Calpe, Madrid. 176 pp.
- PETRI, L. 1915. La malattia dell'olivo. Istituto Micrografico Italiano, Firenze. 169 pp. + XXI lam.
- PHILLIPS, A.J.L., RUMBOS, I.C., ALVES, A., CORREIA, A. 2005. Morphology and phylogeny of *Botryosphaeria dothidea* causing fruit rot of olives. *Mycopathologia*, **159**: 433-439.
- SALGUES, R. 1937. Affections parasitaires des olives et modifications physico-chimiques de l'huile extraite. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **124**: 817-819.
- SAREJANNI, J. A., PAPAIOANNOU, A. J. 1952. La pathologie des mycoses à *Macrophoma* des olives. *Annl. Inst. Phytopath. Benaki*, **6**: 37-50.
- STEEL, R. G. D., TORRIE, J. H. 1985. Bioestadística: principios y procedimientos. MacGraw-Hill, Bogotá. 622 pp.
- TRAPERO, A., BLANCO, M. A. 2004. Enfermedades. In: El cultivo del olivo. Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. eds. Coedición Junta de Andalucía/Mundi-Prensa. Madrid. pp. 557-614.
- VERONA, O. 1952. Notizie sopra una dannosa micosi delle Olive. *Boll. Tec. Ist. Pat. Veg. Pisa*, **5**: 8.
- ZACHOS, D. G., TZAVELLA-KLONARI, K. 1983. Recherches sur les causes des infections localisées ou généralisées des olives attaquées par le champignon *Camarosporium dalmatica*. I. Influence de l'humidité, de la pression osmotique et du pH des fruits. *Annl. Inst. Phytopath. Benaki*, **14**: 1-9.

(Recepción: 1 septiembre 2006)

(Aceptación: 29 septiembre 2006)



## El Escudete de la aceituna II: Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica del agente causal

N. GONZÁLEZ, A. TRAPERO

Las observaciones morfológicas del hongo causante del Escudete de la aceituna en Andalucía lo identifican con la especie *Camarosporium dalmaticum* descrita en Grecia y que ha sido reclasificada recientemente como *Botryosphaeria dothidea* (anamorfio: *Fusicoccum aesculi*). La caracterización fisiológica del patógeno determinó que se trata de un hongo con un amplio rango de temperaturas de crecimiento y germinación de conidios, con una temperatura óptima elevada (26°C para el crecimiento en medio de cultivo y 30°C para la germinación de conidios), mostrando así una buena adaptación para su desarrollo en la aceituna durante el verano y el principio del otoño. Los requerimientos de humedad son similares a los de la mayoría de los hongos, lo que indica que este patógeno no está adaptado a condiciones excepcionales de baja humedad, sino que obtiene los requerimientos de agua de la propia aceituna en la que se desarrolla. Las inoculaciones artificiales realizadas en aceitunas confirmaron la patogenicidad de *C. dalmaticum* y se obtuvieron resultados positivos incluso sin practicar herida en los frutos. En las aceitunas afectadas se produjo una podredumbre del fruto en lugar de la típica mancha circular, oscura y ligeramente deprimida observada en campo. La variedad 'Manzanilla de Sevilla' resultó más susceptible que 'Hojiblanca' en la inoculación artificial.

N. GONZÁLEZ, A. TRAPERO. Grupo de Patología Agroforestal, Dpto. Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edif. Celestino Mutis, 14071-Córdoba, España. Dirección de correo electrónico: trapero@uco.es

**Palabras clave:** *Camarosporium dalmaticum*, *Botryosphaeria dothidea*, temperatura, potencial hídrico, patogenicidad, 'Manzanilla de Sevilla', 'Hojiblanca'.

### INTRODUCCIÓN

El Escudete de la aceituna es una enfermedad ampliamente distribuida en la mayoría de los países donde se cultiva el olivo (*Olea europaea*) y, especialmente, en la Cuenca mediterránea (ANDRÉS, 1991). Las aceitunas presentan manchas más o menos circulares de color marrón, deprimidas en el centro y con el borde ligeramente más elevado y oscuro (NAVARRO, 1923). Esta sintomatología tan característica es la que da nombre a la enfermedad y puede observarse en las aceitunas verdes a lo largo del verano hasta principios de otoño. Durante el otoño e

invierno las aceitunas maduran y su contenido en agua disminuye teniendo entonces lugar el segundo síndrome de la enfermedad, un momificado parecido al producido por *Colletotrichum* spp. (= *Gloeosporium olivarum*) pero de menor gravedad (MATEO-SAGASTA, 1968; ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI, 1983).

El patógeno fue descrito por primera vez en 1883 en olivos de la región de Dalmacia (Croacia) por Von Thümen, quien lo nombró como *Phyllosticta dalmatica* Thüm., hongo imperfecto del grupo de los coelomicetos formadores de conidios en picnidios. Desde entonces la confusión sobre su correcta iden-

tificación ha sido la nota dominante, debido a la diversa morfología de los conidios y a la ausencia de reproducción sexual. Ello ha llevado a la inclusión de esta especie en diferentes géneros, como *Phoma*, *Macrophoma* y *Sphaeropsis* (ANDRÉS, 1991). En 1979, ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI realizaron un estudio detallado sobre este patógeno que los llevó a reclasificarlo como *Camarosporium dalmaticum* (Thüm.) Zach. et Tzav.-Klon., en base a la coloración y septación de los conidios. Estos autores describieron dos tipos principales de conidios, que se formaban en los mismos o en diferentes picnidios. Los conidios del primer tipo eran fusiformes, hialinos, aseptados o con varias septas, y de dimensiones 20-34 x 6.5-9 µm. Los del segundo tipo, formados en picnidios más pequeños, eran hialinos, amarillentos o marrones, ovoides, elipsoidales, limoniformes, o piriformes, con 0-5 septas transversales y 0-3 septas longitudinales, de dimensiones 10.5-23.5 x 6.5-9.5 µm. Las características peculiares de este segundo tipo de conidios, sobre todo la coloración oscura y la septación, sirvieron para reclasificar este hongo como *C. dalmaticum*, que es el nombre utilizado actualmente para referirse al patógeno causante del escudete de la aceituna (TRAPERO y BLANCO, 2004).

En una revisión reciente del género *Phyllosticta* (AA y VANEV, 2002), la especie descrita originalmente como *P. dalmatica* fue reclasificada como *Fusicoccum dalmaticum* (Thüm.) Vanev. Por ello, PHILLIPS *et al.* (2005) han realizado un estudio taxonómico comparativo, utilizando varios aislados de este patógeno procedentes de Grecia y otras especies del género *Botryosphaeria*, basándose en criterios morfológicos y moleculares. Los análisis filogenéticos, utilizando las secuencias de las regiones ITS y EF1- $\alpha$ , han demostrado que los aislados causantes del Escudete muestran una homología plena de estas regiones con el ascomiceto *Botryosphaeria dothidea* (Moug.:Fr.) Ces. & De Not., cuyo anamorfo es *Fusicoccum aesculi* Corda. Los datos morfológicos se correlacionan bien con *F. aesculi*, aunque los conidios oscuros y septados

observados en los aislados de aceitunas no son habituales para esta especie, lo que no ha sido un impedimento importante para su reclasificación como *F. aesculi*, ya que el oscurecimiento y septación de los conidios con la edad es una característica incluida en las enmiendas recientes del género *Fusicoccum* (CROUS y PALM, 1999; SLIPPERS *et al.*, 2004). Por tanto, PHILLIPS *et al.* (2005) proponen que el hongo causante del Escudete de la aceituna sea designado como *B. dothidea* y su anamorfo como *F. aesculi*.

Los estudios sobre fisiología y patogenicidad de este hongo son todavía más escasos, a pesar de que la enfermedad se desarrolla inicialmente durante el verano, con tiempo muy seco y caluroso, poco favorable para las micosis vegetales. De nuevo hay que destacar los trabajos de ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI (1979; 1983), quienes estudiaron el comportamiento *in vitro* de cultivos monoclónicos de los dos tipos de conidios. El crecimiento en el medio patata-dextrosa-agar a diferentes temperaturas fue similar para todos los cultivos, los cuales presentaron una tasa de crecimiento lineal de 5 a 30° C (máximo) y formaron los dos tipos de conidios. El tiempo requerido para la germinación de los conidios a 26° C fue de tres horas para los fusiformes y ocho para los ovoides-piriformes. El crecimiento también se vio afectado por la presión osmótica del medio, creada por adición de glucosa a una solución de Richards (YOSHIDA *et al.*, 2000). Este crecimiento resultó óptimo a 51 bares y satisfactorio entre 10-71 bares, pero no hubo diferencias entre aislados del hongo.

La infección de la aceituna por *C. dalmaticum* se ve favorecida enormemente por la presencia de heridas en los frutos y ha sido correlacionada positivamente con los ataques de la mosca (*Bactrocera oleae*) y con la incidencia de un parásito de ésta (*Prolasioptera berlesiana*), el cual se cree que actúa como vector del patógeno (ARAMBOURG, 1986; ANDRÉS, 1991; LA GRECA y VRENNA, 1995). No obstante, con frecuencia se han observado ataques de Escudete en ausencia de heridas o de otro agente parasitario distin-

to de *C. dalmaticum* (MATEO-SAGASTA, 1971). En 1934, GIGANTE llevó a cabo inoculaciones artificiales en aceitunas, peras y manzanas empleando una suspensión de conidios, concluyendo que los resultados eran positivos en todos los casos sólo si se practicaba una pequeña lesión. Ante estos resultados, ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI (1983) realizaron inoculaciones en aceitunas y manzanas empleando micelio en lugar de conidios y realizando una pequeña incisión, con resultados positivos en todos los casos. Aunque no se han desarrollado experimentos respecto a la resistencia varietal, son claras las diferencias encontradas por diversos autores (LONGO *et al.*, 2004), resultando más susceptibles las variedades de verdeo que las de aceite.

En España, la enfermedad es conocida desde antiguo, pero ha sido poco estudiada. Fue citada por primera vez por Paúl y Arozarena en Huévar, Sevilla (GONZÁLEZ FRAGOSO, 1914). Poco después GONZÁLEZ FRAGOSO (1914) menciona a *M. dalmatica* como agente del "escudete de la gordal" y lo incluye como un componente más de los cuatro hongos patógenos que los agricultores andaluces confundían bajo la denominación de "repilo". Posteriormente, hay referencias de graves pérdidas en aceituna de verdeo en Sevilla (NAVARRO, 1923; GONZÁLEZ FRAGOSO, 1927; BENLLOCH, 1942). Hasta el trabajo de MATEO-SAGASTA (1968), donde se pone de manifiesto que el patógeno origina también una podredumbre y momificado de la aceituna, parecido al causado por *Gloeosporium olivarum*, pero de menor gravedad. En las últimas décadas no se ha llevado a cabo ningún estudio sobre esta enfermedad en nuestro país (TRAPERO y BLANCO, 2004). Por ello, se planteó este trabajo sobre caracterización del patógeno por su morfología, crecimiento en diferentes medios de cultivo y temperaturas, y patogenicidad en aceitunas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Caracterización morfológica

Las observaciones sobre características morfológicas del patógeno se realizaron

sobre muestras de aceitunas con síntomas de Escudete (Figura 1) procedentes del campo y sobre cultivos puros en el medio Patata-Dextrosa-Agar (PDA). Las muestras de aceitunas, procedentes de las variedades 'Manzanilla de Sevilla', 'Hojiblanca' y 'Tetuda', fueron tomadas periódicamente en dos campos de la Sierra Sur de Sevilla, una zona endémica de mosca que en años anteriores había presentado una elevada incidencia de Escudete. Además, se incluyeron muestras de tres campos de la provincia de Córdoba: dos de la variedad 'Hojiblanca' situados en los términos de Montilla y de Córdoba, y uno de la variedad 'Gordal sevillana' situado en la finca Alameda del Obispo, Córdoba.

Las observaciones sobre cultivos puros se realizaron con 6 aislados monoconídicos obtenidos a partir de siembra de trozos de aceitunas afectadas de Escudete en el medio PDA. Los aislados procedían de las variedades 'Manzanilla de Sevilla' y 'Hojiblanca' de los dos campos de la provincia de Sevilla.

De cada muestra de campo o de cada aislado se observaron los picnidios formados en las aceitunas (Figura 1), o en el medio PDA, y se determinó la morfología y el tamaño de 30 conidios seleccionados. Para cada conidio se indicó además su coloración (hialino u oscuro) y el número de septas. El tamaño de los conidios se determinó midiendo su longitud y anchura a 400 aumentos y se calculó la relación longitud/anchura.

### Efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial

Se seleccionaron 6 aislados monoconídicos del patógeno cultivados en el medio PDA. Utilizando un sacabocados de 5 mm de diámetro se cortaron discos de la zona periférica en crecimiento activo del hongo para realizar la siembra en el medio PDA. Una vez sembradas, las placas se sellaron con parafilm y se metieron en doble bolsa de plástico. A continuación se sometieron a distintas temperaturas, de 5 a 40°C a intervalos de 5°C, en oscuridad. Al cabo de 3 días se midió el diámetro medio de la colonia con el que se obtuvo la tasa de crecimiento diaria

(mm/día). El diseño experimental fue factorial con dos factores (temperatura y aislado) y tres repeticiones (placas) completamente al azar. El experimento completo se repitió tres veces. Con los valores obtenidos se determinó la curva de crecimiento a distintas temperaturas de cada aislado y su temperatura óptima de desarrollo. Para la comparación entre aislados se realizó un análisis de la varianza de la Tasa máxima ajustada y del Área bajo la curva de crecimiento, utilizando

las repeticiones del ensayo como bloques. La comparación de medias se hizo según el test LSD protegido de Fisher ( $P=0.05$ ) (STEEL y TORRIE, 1985).

#### **Efecto de la temperatura sobre la germinación de conidios**

Para la realización de este ensayo se utilizó un cultivo en PDA de una mezcla de 5 aislados monoconídicos. Las conidias se obtuvieron por raspado de la colonia con un asa de

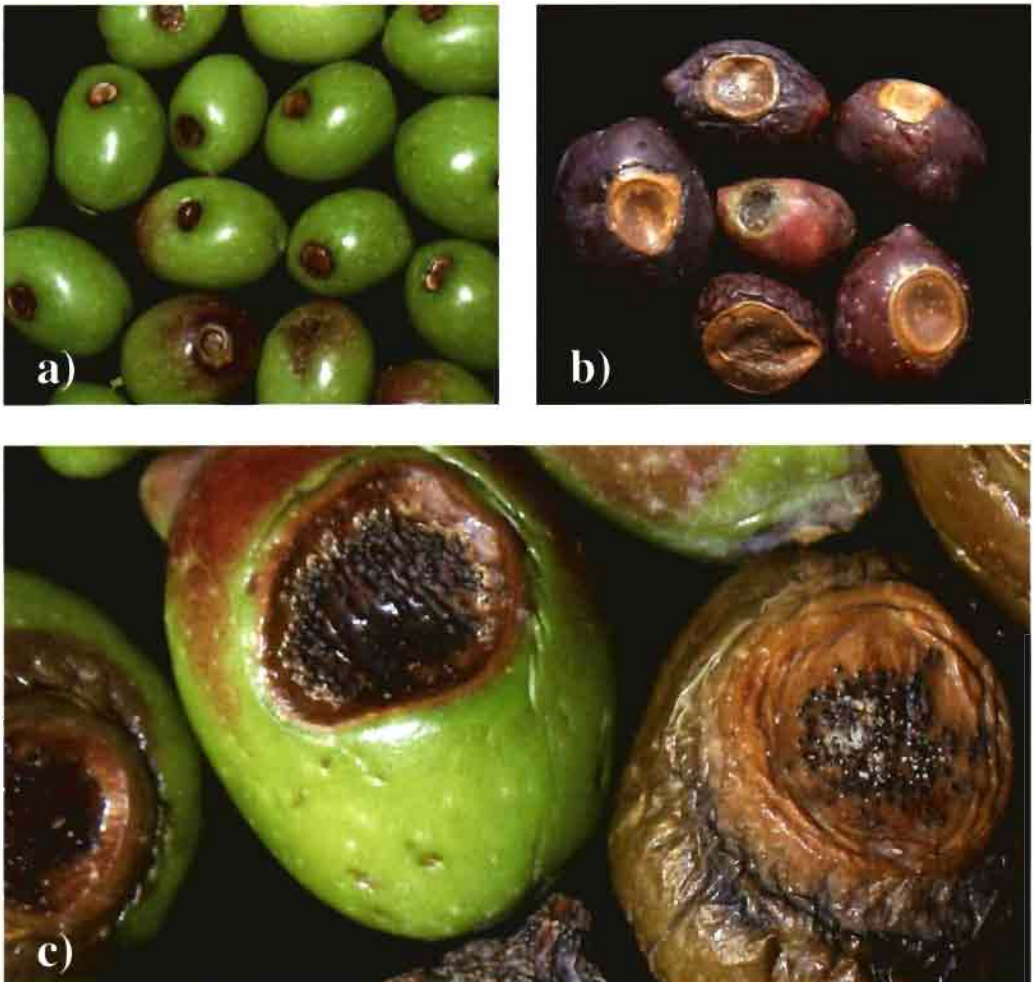


Figura 1. Síntomas de Escudete: a) lesiones en aceitunas verdes, b) lesiones en aceitunas maduras, c) lesión con picnidios característicos del patógeno y el daño de la mosca del olivo.

siembra y agua desionizada y destilada (ADD) estéril. La suspensión conidial se ajustó a  $10^5$  conidios  $\text{ml}^{-1}$ . Se realizaron cámaras húmedas que consistían en placas de Petri con una capa de agar-agua (2%) en la base y otra en la tapa. En el interior de la cámara húmeda se situaron 3 cubreobjetos de vidrio, en el centro de los cuales se depositó una gota de  $10 \mu\text{l}$  de la suspensión de conidios. Las cámaras húmedas se incubaron en oscuridad a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y  $50^\circ\text{C}$ . Como tiempos de incubación se utilizaron: 6, 12, 24 y 48 h para cada temperatura. Para cada par temperatura-tiempo se preparó una cámara húmeda con tres repeticiones (gotas).

Transcurrido el tiempo de incubación, los cubreobjetos de vidrio se situaron sobre portaobjetos con una gota de fucsina ácida en lactofenol para detener la germinación. El porcentaje de conidios germinados se determinó con el microscopio a 400 aumentos, contabilizando al azar de 100 a 200 conidios entre los tres cubreobjetos de cada combinación de temperatura-tiempo de incubación y sin tener en cuenta la morfología de los conidios. Otro parámetro utilizado para evaluar la germinación fue el tiempo medio de germinación (TMG) durante las 48 h que se calculó como:

$$TMG = \frac{1}{2G_n} \sum_{i=1}^{i=n} [(t_i - t_{i-1}) \times (G_i + G_{i-1})]$$

donde  $t_i$  = Tiempo de evaluación de la germinación de la conidios,  $G_i$  = Germinación (%) a tiempo  $i$ ,  $G_n$  = Germinación a las 48h.

El experimento se repitió tres veces y se determinaron las curvas de regresión que mejor ajustaban los valores del porcentaje de germinación y del TMG en función de la temperatura. Utilizando la ecuación resultante para el porcentaje de germinación, se calculó la temperatura óptima de germinación para la mezcla de aislados.

#### Efecto del potencial hídrico sobre el crecimiento micelial

Se llevó a cabo un ensayo preliminar para fijar un rango de potenciales basado en la

adición de un soluto al medio PDA (HARRIS, 1981) y que éste no tuviera un efecto perjudicial en el crecimiento. Se consideró un único aislado y dos solutos (glicerol y cloruro sódico) bajo condiciones de oscuridad a  $25^\circ\text{C}$ . Se hallaron diferencias en la tasa de crecimiento según el soluto empleado y por ello en los sucesivos ensayos se empleó glicerol por afectar menos al desarrollo del cultivo. En el experimento final se evaluaron 4 aislados monoconídicos y el siguiente rango de potenciales: 0 (testigo), -5, -10, -25, -50, -100, -150, -200, -250, y -300 bares. El experimento se repitió tres veces y se realizó un análisis de regresión lineal de la tasa diaria de crecimiento en función del potencial hídrico.

#### Patogenicidad en aceitunas

Se utilizaron frutos sanos y verdes recolectados en Septiembre de dos variedades de verdeo ('Manzanilla de Sevilla' y 'Hojiblanca') en la parcela "Triángulo" del C.I.F.A. "Alameda del Obispo" de Córdoba. Las aceitunas se lavaron y desinfectaron (15 min bajo chorro de agua corriente, baño de ultrasonidos con Tween-20 durante 4 min, inmersión en una solución al 10% de hipoclorito sódico por 1 min, y aclarado con agua destilada y desionizada estéril), se secaron, y se colocaron en cámaras húmedas para evitar su desecación.

Se utilizaron dos tipos de inóculo: micelio y conidios. En la inoculación con micelio se emplearon discos de 10 mm de diámetro obtenidos de la periferia de la colonia de un cultivo en PDA. Para la inoculación con conidios se obtuvo una suspensión ajustada a  $1.2 \times 10^6$  conidios/ml. La inoculación se realizó depositando un disco de micelio o una gota de  $10 \mu\text{l}$  de la suspensión sobre cada aceituna. En el caso de los testigos el disco eran de Agar-Agua (2 %) y la gota de ADD estéril. La mitad de las aceitunas no sufrió ningún tipo de daño, mientras que en la otra mitad se practicó una herida empleando un alfiler estéril, bien antes de añadir la gota de inóculo o bien sujetando el disco de micelio con el mismo alfiler.

Tras la inoculación las aceitunas se incubaron a 22° C y 12 h de fotoperiodo en cajas de plástico con un ambiente saturado de humedad (LÓPEZ-DONCEL *et al.*, 2000). El diseño experimental fue factorial con tres factores (variedad, inóculo y herida) y tres repeticiones (cajas), con un testigo de cada una de las ocho combinaciones experimentales, repetido también tres veces. La unidad experimental fue la caja con 20 aceitunas. Por tanto, en cada combinación experimental se dispusieron 60 aceitunas.

En la sexta y octava semana después de la inoculación se determinó un índice de enfermedad (IE) para cada unidad experimental según la siguiente expresión:

$$IE(\%) = \frac{\sum_{i=0}^{i=5} n_i * S_i}{5 * 20} * 100 = \sum_{i=0}^{i=5} n_i * S_i$$

donde,  $S_i$  = severidad de la infección, según una escala 0-5 en función de la superficie del fruto afectada (0= no síntomas, 5= >75 % superficie afectada, Figura 2);  $n_i$  = número de frutos afectados de cada valor  $S_i$ .

#### Análisis de los datos

Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico "Statistix 8" (ANALYTICAL

SOFTWARE, 2003). Para los datos de factores cualitativos se aplicó el análisis de la varianza y las comparaciones de medias según el test LSD (Mínima Diferencia Significativa) protegido de Fisher ( $P=0.05$ ) (STEEL y TORRIE, 1985).

Para los datos de factores cuantitativos se empleó el análisis de regresión. La elección del modelo de regresión se realizó según los criterios: i) coeficiente de determinación ( $R^2$ ), ii) significación de los coeficientes de las variables independientes y, iii) distribución de los residuos estandarizados (CAMPBELL y MADDEN, 1990).

## RESULTADOS

### Caracterización morfológica

En las muestras de aceitunas los picnidios se desarrollaron en el interior de la lesión de Escudete (Figura 3) y fueron muy variables en tamaño (100-380  $\mu$ m). Los conidios también variaron marcadamente en su morfología, habiéndose observado dos tipos morfológicos principales: alargados (cilíndricos-fusiformes) y redondeados (ovoides-piriformes-claviformes) (Figura 3). Los dos tipos se formaron en distintos picnidios, o bien en



Figura 2. Escala visual de severidad de síntomas (0- 5) en aceitunas afectadas por *Camarosporium dalmaticum*.



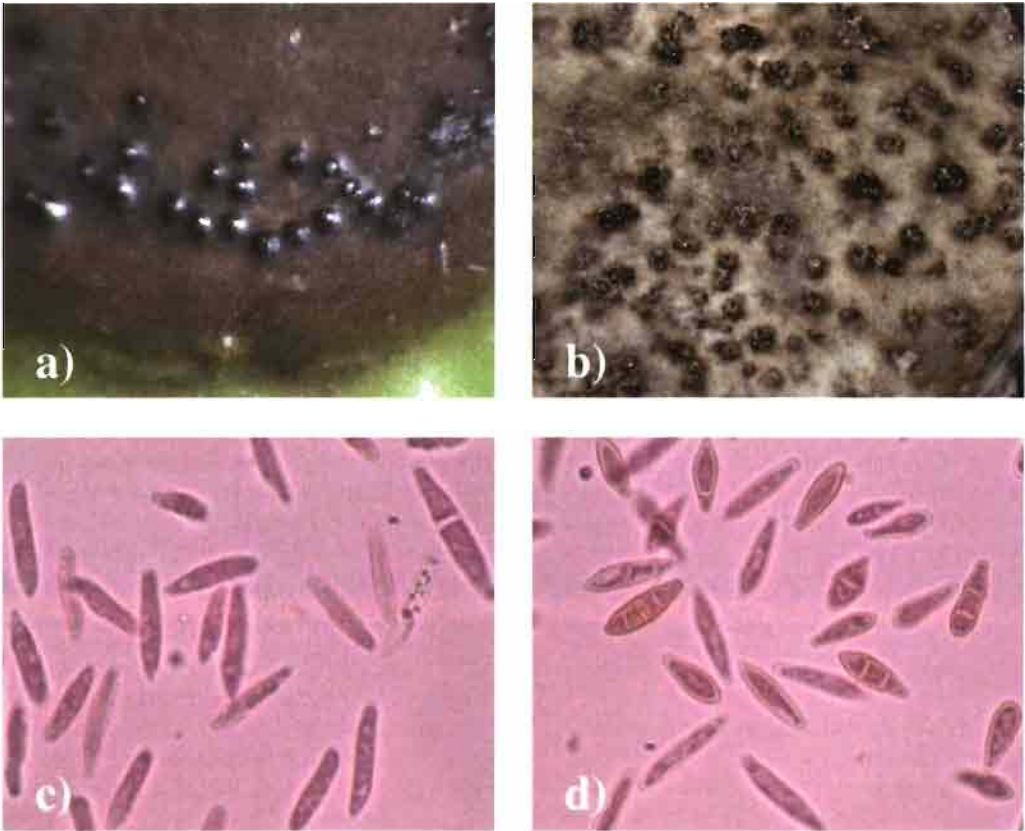


Figura 3. Picnidios y conidios de *C. dalmaticum*: a) picnidios formados en la lesión de Escudete en la aceituna, b) picnidios formados en el medio de cultivo PDA, c) conidios del tipo alargado: fusiformes, hialinos y mayoritariamente aseptados, d) conidios del tipo redondeado: ovoides-piriformes, frecuentemente oscuros y septados (nótese algunos conidios fusiformes, y otros hialinos o aseptados).

el mismo picnidio. Los conidios alargados fueron más frecuentes (72%), la gran mayoría hialinos y aseptados, aunque también se observaron algunos septados (hasta 3 septas transversales) y otros de color oscuro, con o sin septas. Las dimensiones de estos conidios fueron:  $13.7\text{--}27.5 \times 3.7\text{--}7.5 \mu\text{m}$ , media  $\pm$  S.D. de 90 conidios =  $21.2 \pm 3.4 \times 5.2 \pm 0.7 \mu\text{m}$ , relación longitud/anchura (L/A) =  $4.2 \pm 0.8$ . Los conidios del segundo tipo fueron predominantemente de color marrón claro y aseptados, aunque también se observaron con cierta frecuencia septados (hasta 5 septas) y con menor frecuencia hialinos. Las dimensiones de este segundo tipo de conidios

fueron:  $8.7\text{--}20.0 \times 3.7\text{--}7.5 \mu\text{m}$ , media y S.D. de 90 conidios =  $13.7 \pm 2.5 \times 6.0 \pm 1.1 \mu\text{m}$ , L/A =  $2.3 \pm 0.4$ .

En el medio PDA, el tamaño de los picnidios osciló entre 110 y 520  $\mu\text{m}$ . La morfología, coloración y tamaño de los conidios también resultaron muy variables, habiéndose observado los dos tipos morfológicos encontrados en campo. Los dos tipos morfológicos (alargados y redondeados) tuvieron una frecuencia similar y fueron predominantemente hialinos y aseptados, aunque también resultó frecuente observar conidios de color marrón claro y septados (hasta 3 septas) en los dos tipos. Las dimensiones de los

conidios alargados fueron: 15.0-25.0 x 3.7-7.5  $\mu\text{m}$ , media y S.D. de 90 conidios = 19.2  $\pm$  2.8 x 5.2  $\pm$  0.6  $\mu\text{m}$ , L/A = 3.7  $\pm$  0.7; mientras que las del segundo tipo de conidios fueron: 12.5-20.0 x 3.7-8.7  $\mu\text{m}$ , media y S.D. de 90 conidios = 14.6  $\pm$  1.9 x 5.2  $\pm$  0.9  $\mu\text{m}$ , L/A = 2.8  $\pm$  0.5.

Los análisis de varianza realizados pusieron de manifiesto diferencias significativas para la longitud y para la relación L/A entre los dos tipos de conidios, tanto en las muestras de campo como en los cultivos en PDA. Estas diferencias fueron independientes de la muestra o aislado, ya que la interacción aislado\*tipo morfológico no resultó significativa. Asimismo, existieron diferencias significativas, aunque de menor cuantía, entre las diferentes muestras de campo o aislados en PDA, debidas al menor tamaño de los dos tipos de conidios en una muestra de campo y en dos aislados en PDA. No se observaron diferencias significativas en la anchura de los conidios para las diferentes muestras o aislados.

#### Efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial

Las colonias de los 6 aislados en PDA mostraron el mismo aspecto morfológico, un

micelio blanquecino superficial que tornaba a verde oliva en el centro cuando la colonia tenía cierto desarrollo. El rango de temperaturas de crecimiento fue amplio, de 5 a 40°C (Figura 4), para todos los aislados y las mayores diferencias entre éstos se concentraron en las temperaturas más favorables (20, 25, 30°C).

El modelo de regresión lineal que mejor se ajustó a todos los aislados fue un polinomio de tercer grado del tipo:

$$Y = aT^3 + bT^2$$

donde  $Y$  es el porcentaje de germinación,  $T$  la temperatura y  $a$ ,  $b$  los coeficientes de la regresión. En base a esta ecuación se determinó la temperatura óptima y la tasa máxima de crecimiento para cada aislado. El análisis de la varianza realizado para estos dos parámetros no mostró diferencias significativas entre aislados, oscilando la temperatura óptima entre 25.7 y 26.2°C. Los valores del Área bajo la curva de crecimiento también fueron sometidos al análisis de la varianza mostrando en este caso pequeñas diferencias significativas entre algunos aislados. Por ello, se ajustó una curva global de crecimiento para el conjunto

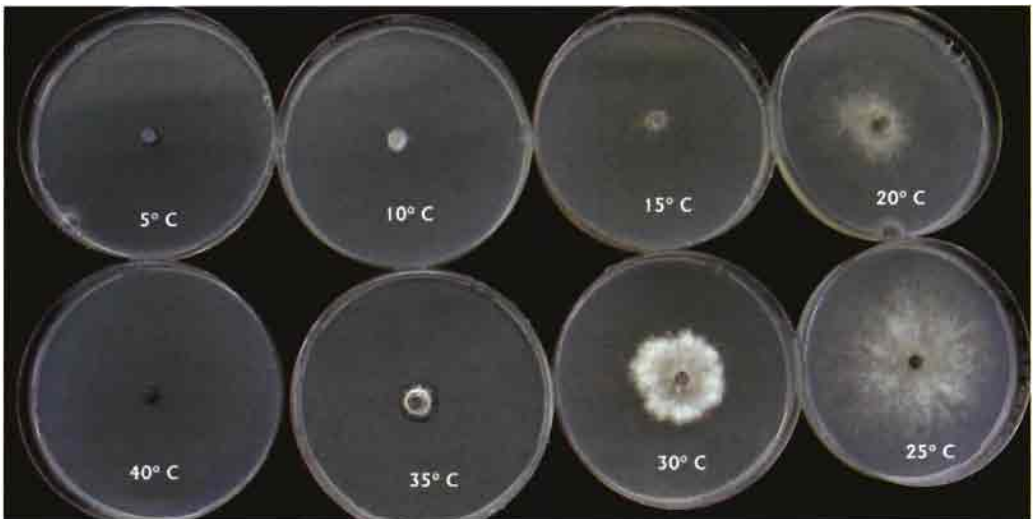


Figura 4. Colonias de *Camarosporium dalmaticum* en PDA a distintas temperaturas.



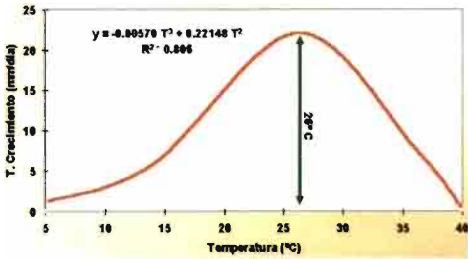


Figura 5. Tasa de crecimiento global (mm/día) de *C. dalmaticum* en función de la temperatura. Se indica la temperatura óptima.

de los 6 aislados, la cual reveló una temperatura óptima de 26°C y una tasa máxima de crecimiento de 16.5 mm/día (Figura 5).

**Efecto de la temperatura sobre la germinación de conidios**

Los diferentes tipos de conidios germinaron formando uno o dos tubos germinativos, aunque se apreció un menor número de tubos y una velocidad de germinación más lenta en los del tipo redondeado (claviformes-piriformes-ovoides); no obstante, estas diferencias no se cuantificaron. El rango de temperaturas de germinación fue amplio, de 5 a 40°C en todos los tiempos de incubación, e incluso germinaron a 45°C tras 48 h. El porcentaje de germinación aumentó con el tiempo y tuvo una respuesta curvilínea homogénea en función de la temperatura.

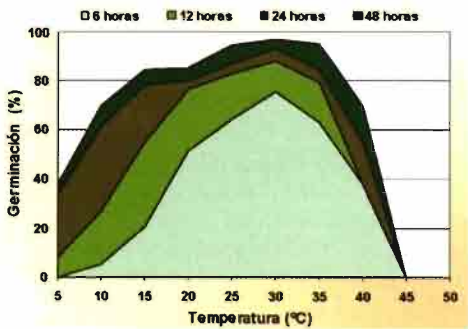


Figura 6. Curvas de germinación de conidios de *Camarosporium dalmaticum* en función de la temperatura para distintos tiempos de incubación.

El modelo de regresión que mejor se ajustó a la germinación de conidios en función de la temperatura para todos los tiempos de incubación fue un polinomio de tercer grado con la ecuación:

$$Y = aT^3 + bT^2$$

donde, *Y* es el porcentaje de germinación, *T* la temperatura y *a*, *b* los coeficientes de la regresión (Figura 6). Del ajuste global se obtuvo la temperatura óptima de germinación que fue 30°C. El tiempo medio de germinación (TMG) se ajustó a una parábola que indicó la temperatura de 23.2° C para el menor TMG (5.15 h), aunque el ajuste de regresión fue mejor para el porcentaje de germinación (Figura 7).

**Efecto del potencial hídrico sobre el crecimiento micelial**

El tipo de colonia formada fue muy similar a la que se desarrolla en el medio habitual PDA (Figura 8). El potencial hídrico o la actividad de agua (*A<sub>w</sub>*), determinada por la concentración de glicerol en el medio, tuvo un efecto muy marcado en el crecimiento del hongo. La tasa de crecimiento aumentó linealmente con el incremento de *A<sub>w</sub>* desde *A<sub>w</sub>* = 0.8964 (-150 bares) hasta *A<sub>w</sub>* = 1 (0 bares) (Figura 9). Para *A<sub>w</sub>* = 0.8644 (-200 bares) no hubo ningún crecimiento fúngico. La comparación de las rectas de regresión permitió

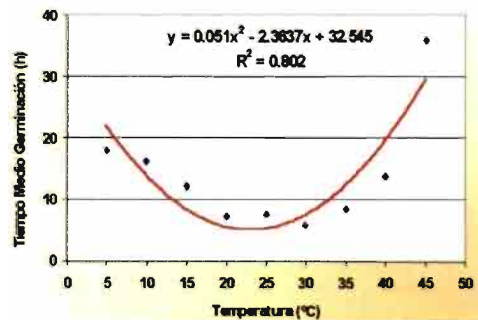


Figura 7. Curva del Tiempo Medio de Germinación (TMG) de conidios de *C. dalmaticum* en función de la temperatura.

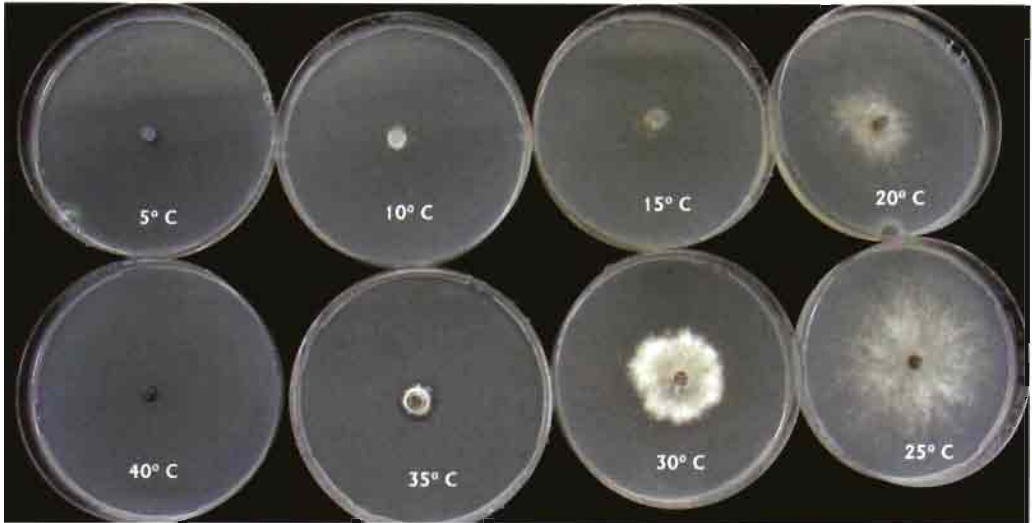


Figura 8. Colonias de *Camarosporium dalmaticum* creciendo en el medio PDA con distintas actividades de agua (Aw).

diferenciar un aislado de los tres restantes por su menor crecimiento general.

### Patogenicidad en aceitunas

Lo primero a destacar fue la rápida maduración de las aceitunas colocadas en las cajas húmedas en comparación con los frutos en el árbol, siendo más acusada en la variedad 'Manzanilla de Sevilla'. El primer síntoma que se apreció fue una isla verde, que se manifestó como una zona verde más o menor circular alrededor del punto de inoculación. Este síntoma fue más evidente cuando se practicó una herida y en la inoculación con

conidios, siendo la variedad 'Manzanilla de Sevilla' la primera en expresarlo (2 semanas desde la inoculación). También 'Hojiblanca' mostró la isla verde, pero una semana más tarde que la anterior, siendo al principio más difuminada y duradera en el tiempo. Los primeros síntomas necróticos aparecieron a las 4 semanas de la inoculación en la variedad 'Manzanilla de Sevilla', en las aceitunas inoculadas con conidios y herida. Consistían en pequeñas depresiones con una coloración de la piel marrón cobrizo que daba un aspecto blando a la aceituna y en muchos casos afloraban picnidios por toda la superficie (Figura 10a). En 'Hojiblanca' la depresión aparecía de forma más o menos marcada y los picnidios afloraban sólo en la lesión y no por toda la superficie. En ambos casos, la sintomatología era muy diferente a la que presentaban en campo las aceitunas afectadas de Escudete (Figura 10b), debido probablemente al diferente ritmo de maduración. En los casos en que no se practicó herida se produjo un retraso en la expresión de síntomas, aunque tanto los conidios como el micelio resultaron patogénicos.

De los análisis de la varianza realizados a las 6 y 8 semanas sobre el índice de enferme-

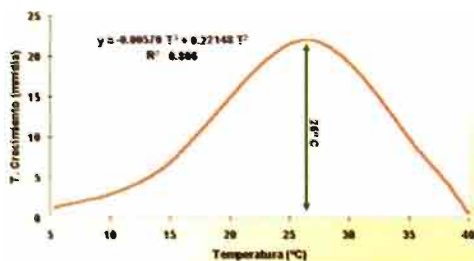


Figura 9. Línea de regresión global de la Tasa de crecimiento (mm/día) de *C. dalmaticum* en función de la Actividad de agua.

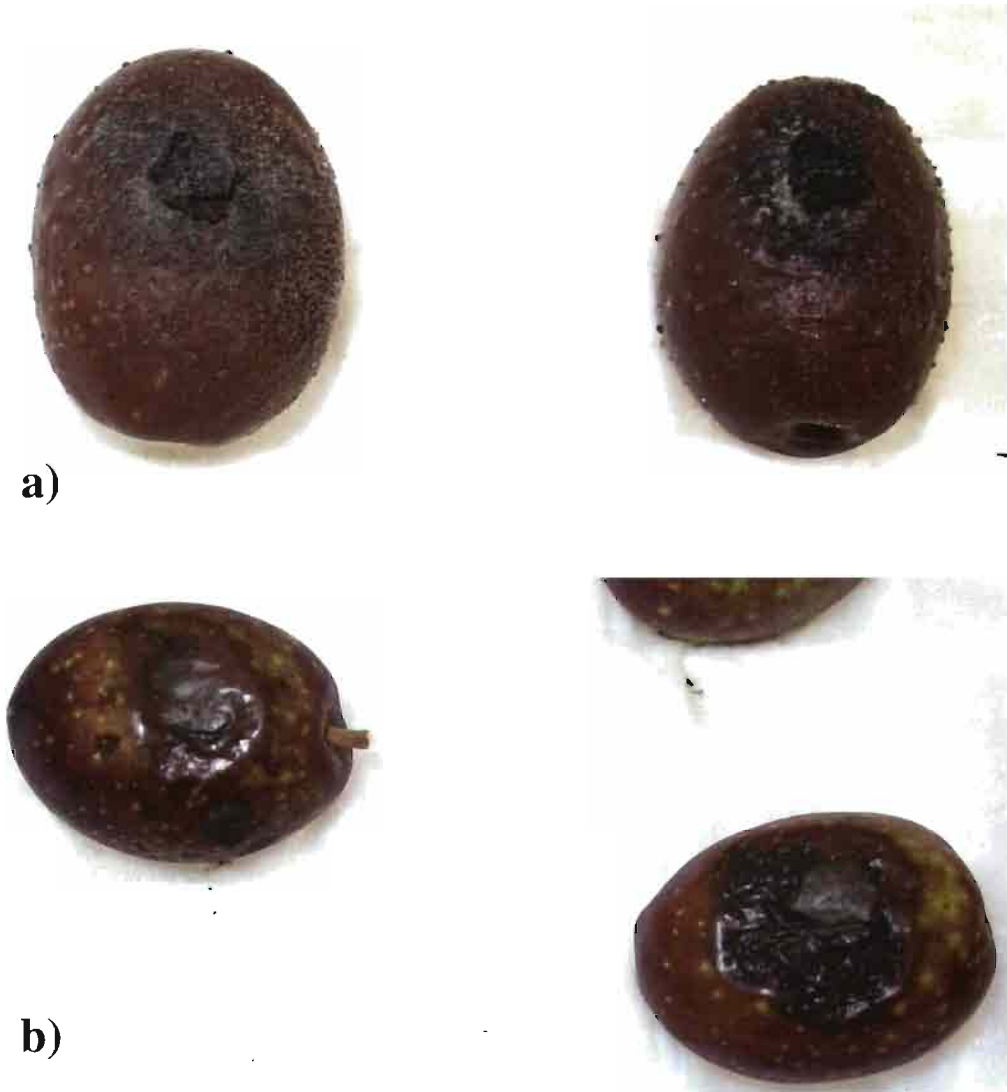


Figura 10. Síntomas presentes en aceitunas inoculadas con *C. dalmaticum*, según la variedad: a) 'Manzanilla de Sevilla'. b) 'Hojiblanca'.

dad (IE), lo primero a destacar es que a las 6 semanas resultaron significativos los tres factores analizados, según el siguiente orden de importancia: variedad ('Manzanilla de Sevilla' > 'Hojiblanca'), tipo de inóculo (conidios > micelio) y herida (sí > no). En cambio, a las 8 semanas sólo el factor herida resultó significativo. En los dos tiempos de incubación las

diferentes interacciones entre factores no resultaron significativas (Figura 11).

## DISCUSIÓN

La variación observada en la morfología, coloración y septación de los conidios del hongo causante del Escudete de la aceituna

en Andalucía se corresponde bien con la descripción de *C. dalmaticum* realizada por ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI (1979) en Grecia. No obstante, estos autores destacaron una mayor septación de los conidios, incluso la existencia de septas longitudinales, que no hemos encontrado en nuestras observaciones, tanto en aceitunas de campo como en los cultivos en PDA. Estas últimas características fueron precisamente las que tuvieron un mayor peso para la inclusión de este hongo en el género *Camarosporium* (ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI, 1979). Así pues, esta reclasificación del patógeno desde el género *Macrophoma* o *Sphaeropsis* a *Camarosporium* genera ciertas dudas, ya que, al menos desde nuestras observaciones, se basa en las características de los conidios

menos frecuentes. En cambio, los conidios más frecuentes, fusiformes e hialinos, sugieren su pertenencia al género *Fusicoccum*, como ha sido propuesto por VANEV (AA y VANEV, 2002).

La reciente reclasificación del patógeno como *Botryosphaeria dothidea* (PHILLIPS *et al.*, 2005) despeja algunas dudas, pero no cierra completamente el debate sobre su identidad. Desde el punto de vista molecular, la homología de secuencia de las regiones ITS y EF1- $\alpha$  no admite dudas sobre su coincidencia con otros aislados de *B. dothidea*. Sin embargo, desde el punto de vista morfológico, este hongo presenta unas características tan peculiares, sobre todo la variabilidad de sus conidios e incluso de sus picnidios, que lo distinguen claramente de *Fusicoccum aesculi*, el anamorfo de *B. dothidea* (SLIPPERS *et al.*, 2004; PHILLIPS *et al.*, 2005). Su inclusión en la especie compleja *B. dothidea* ha obligado a redefinir esta especie, para incluir aislados con esporas oscuras y septadas, características no consideradas anteriormente en esta especie morfológica, al igual que ha ocurrido con otras especies del género *Fusicoccum* (CROUS Y PALM, 1999). Por todo ello, creemos que aunque la denominación *B. dothidea* parece la más adecuada con los datos disponibles hasta ahora, deberían realizarse análisis moleculares más complejos, incluyendo otros genes o regiones del ADN y otras especies del género *Botryosphaeria* (anamorfos *Fusicoccum*, *Diplodia* y *Dothiorella*), para confirmar su identificación. El teleomorfo del hongo podría ayudar a su correcta identificación, pero hasta ahora no se ha observado el estado sexual del patógeno causante del Escudete de la aceituna (GONZÁLEZ *et al.*, 2006).

La temperatura tuvo un claro efecto sobre el crecimiento del hongo, pero lo más llamativo fue su amplio rango, de 5 a 40°C, aunque en los extremos el crecimiento fue muy reducido. Otro aspecto destacable fue la rapidez en el desarrollo de la colonia (16.5 mm/día). Aunque se obtuvieron diferencias significativas entre aislados, éstas no parecen ser importantes en cuanto a requerimiento

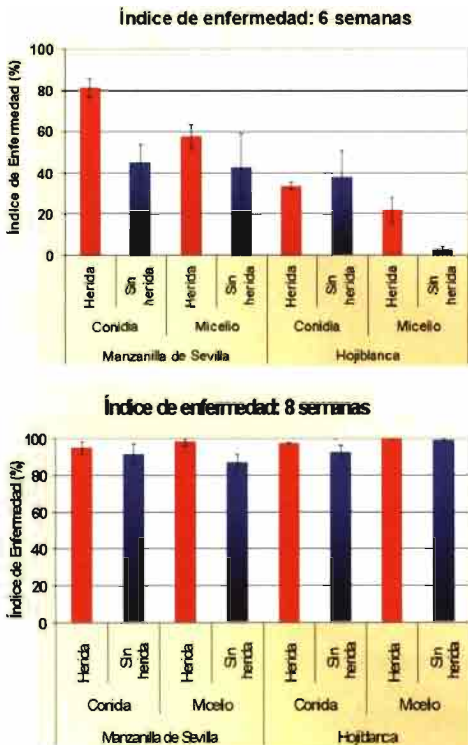


Figura 11. Índice de enfermedad a las 6 y 8 semanas después de la inoculación con micelio y conidias en aceitunas de las variedades 'Hojiblanca' y 'Manzanilla de Sevilla'.

elevado de temperatura, ni en lo referente a temperatura óptima (en torno a 26°C para todos los aislados) presentando a su vez el mismo patrón de crecimiento (polinómico). Este efecto se aprecia aún más en la germinación de conidios, donde el rango de temperaturas (5-45°C) y la temperatura óptima (30°C) son incluso mayores. Nuestros resultados discrepan de los obtenidos por ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI (1979), quienes describen un crecimiento en placa casi lineal, y no polinómico, a partir de 10°C y hasta 30°C, temperatura donde se obtiene el máximo y partir de la cual el crecimiento desciende rápidamente hasta ser casi inapreciable a 35°C. Estos autores tampoco encontraron diferencias significativas en las colonias, aunque ellos tuvieron en cuenta el tipo de conidios del que procedía el cultivo y no diferentes aislados. En cualquier caso, el crecimiento resultó más lento que el observado en nuestro trabajo puesto que las esporas fusiformes requirieron 4 días para llenar una placa Petri y 5 días las esporas ovoides. Las diferencias pueden deberse a las distintas condiciones climáticas entre las zonas de donde se obtuvieron los aislados, o incluso al fotoperiodo, ya que no hay constancia de éste en el ensayo de ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI (1979) y en el nuestro se incubaron en oscuridad. Lo mismo podría decirse en el caso de la germinación ya que los mismos autores llevaron a cabo un ensayo sin tener en cuenta la temperatura, considerando sólo la morfología de las conidias y el tiempo de incubación necesario para su germinación. Las esporas del tipo fusiforme requirieron 2-3 horas, mientras que las esporas ovoides necesitaron 8 horas. Nosotros también hemos observado una germinación algo más lenta de los conidios redondeados y oscuros. En cualquier caso todos los estudios realizados coinciden en un tiempo breve de germinación de las esporas (ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI, 1979; GIGANTE, 1934).

La actividad de agua ( $A_w$ ) en el medio de cultivo es la mejor expresión de la disponibilidad de agua para el crecimiento y la actividad enzimática (HARRIS, 1981; ROSELLÓ *et*

*al.*, 2004). En los ensayos realizados, los valores de  $A_w$  estuvieron determinados por la concentración de glicerol en el medio. El rango de crecimiento fue desde  $A_w = 0.8964$  hasta  $A_w = 1$ , con una tasa de crecimiento que aumentó linealmente con el incremento de  $A_w$ . Aunque existieron diferencias significativas entre aislados, éstas sólo se manifestaron en un menor crecimiento de uno de los aislados, sin afectar al rango de  $A_w$ . Estos resultados permiten concluir que no se trata de un hongo que crezca en condiciones excepcionales de baja humedad, sino que simplemente obtiene los requerimientos de agua de la propia aceituna en la que se desarrolla. ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI (1983) ensayaron la influencia de la presión osmótica del medio de cultivo sobre el crecimiento del hongo y obtuvieron un rango de presiones adecuado entre 10-71 bares ( $A_w = 0.9964-0.9503$ ), destacando ligeramente la presión de 51 bares ( $A_w = 0.9642$ ) como algo más favorable.

En la inoculación artificial la mezcla de aislados resultó patogénica en las dos variedades de aceituna y para todos los métodos llevados a cabo. El índice de enfermedad varió significativamente según se tuviese en cuenta la variedad, el inóculo y la práctica de herida, de manera que resultó mayor para la variedad 'Manzanilla de Sevilla', la suspensión de conidios y la herida. Los conidios resultaron mejor inóculo que el micelio, lo que era esperable, ya que posiblemente el inóculo natural esté constituido por conidios. Las inoculaciones artificiales llevadas a cabo con conidios por GIGANTE (1934) y con micelio por ZACHOS y TZAVELLA-KLONARI (1979) confirmaron la necesidad de herida en los frutos para las infecciones de este patógeno. De acuerdo con nuestros resultados, la práctica de herida favorece la infección pero no es necesaria, al menos en aceitunas recogidas en septiembre. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones de MATEO-SAGASTA (1968), quién indicó ataques de Escudete en ausencia de heridas u otro agente parasitario. Por otro lado, los síntomas obtenidos no se corresponden con los

observados en campo y difieren ligeramente según se trate de una variedad u otra. Cuando se recolectaron las aceitunas en septiembre, la variedad 'Manzanilla de Sevilla' comenzaba a enverar y 'Hojiblanca' permanecía aún con un color verde intenso. Esta diferencia en el ritmo de maduración, unida a que las aceitunas separadas del árbol maduran más rápidamente, podría explicar el desfase en la aparición de síntomas entre las variedades y las ligeras diferencias entre ellos. Por otro lado, la diferente intensidad en que se manifestaron los síntomas según la variedad parece indicar una mayor susceptibilidad en 'Manzanilla de Sevilla', algo que en principio se corresponde con lo observado en campo (BARRANCO *et al.*, 1999), y que apoya la teoría de que el grado de maduración juega un papel crítico. La evolución de síntomas, especialmente necróticos, que se observó entre las 6 y 8 semanas de la inocu-

lación, tiempo durante el cuál los frutos siguen madurando, confirmó la marcada influencia del estado de madurez sobre la susceptibilidad de las aceitunas. A las 6 semanas la mayoría de las aceitunas presentaban un índice de enfermedad por debajo del 50%, mientras que al cabo de 8 semanas todas las aceitunas presentaban un índice de enfermedad entre el 90-100%.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a todos los miembros del grupo de investigación Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba y, en particular, a Paqui Luque por su excelente ayuda. Este trabajo forma parte de la Tesis de Máster en Olivicultura y Elaiotecnía de Nazaret González Garrido que ha sido financiada por los proyectos CAO00-013 y AGL2004-7495.

## ABSTRACT

GONZÁLEZ N., A. TRAPERO. 2006. Dalmatian disease of olive fruits II: Morphological, physiological, and pathogenic characterization of the causal agent. *Bol. San. Veg. Plagas*, 32: 723-737.

Morphological observations on the causal agent of the Dalmatian disease of olive fruits in Andalucía, southern Spain, confirm its identification as *Camarosporium dalmaticum*. This species was identified in Greece and it has been recently reclassified as *Botryosphaeria dothidea* (anamorph *Fusicoccum aesculi*). Physiological characterization of the pathogen demonstrated that the fungus has a wide range of temperatures for growth and germination of conidia. The optimum temperature was 26°C for growth on PDA medium and 30°C for germination of conidia. These results showed a good ability of the fungus to grow in olive fruits with high temperature during the summer and early autumn. The range of water activity in the medium for growth of *C. dalmaticum* was 0.93 to 1, similar to most fungi, suggesting that this pathogen is not particularly adapted to low humidity, instead it gets its water requirements growing inside of olive fruits. The fungus *C. dalmaticum* was pathogenic in olive fruits inoculated with conidia or mycelium, even in unwounded fruits. The main symptom was a fruit rot instead of the characteristic rounded lesion observed in the field. Olive cultivar 'Manzanilla de Sevilla' was more susceptible than 'Hojiblanca' in these inoculations.

**Key words:** *Camarosporium dalmaticum*, *Botryosphaeria dothidea*, temperature, water potential, pathogenicity, 'Manzanilla de Sevilla', 'Hojiblanca'.

REFERENCIAS

- AA, H. A. VAN DER, VANEV, S. 2002. A revision of the species described in *Phyllosticta*. CBS, Utrecht, The Netherlands. 510 pp.
- ANALYTICAL SOFTWARE. 2003. Statistix 8 User's manual. Tallahassee, FL. 359 pp.
- ANDRÉS CANTERO, F. DE 1991. Enfermedades y plagas del olivo. Riquelme y Vargas Ediciones, Jaén. 646 pp.
- ARAMBOURG, Y. 1986. Traité d'entomologie oleicole. Consejo Oleícola Internacional, Madrid. 360 pp.
- BARRANCO, D., CIMATO, A., FIORINO, P., RALLO, L., TRUJILLO, I. 1999. Catálogo Mundial de variedades de olivo. Consejo Oleícola Internacional, Madrid. 360 pp.
- BENLLOCH, M. 1942. Observaciones sobre algunas enfermedades del olivo. *Bol. Patol. Veg. Entomol. Agric.*, **11**: 1-12.
- CAMPBELL, S. O., MADDEN, L. V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley and Sons, New York. 532 pp.
- CROUS, P. W., PALM, M. E. 1999. Reassessment of the *Botryosphaeria* anamorph genera *Fusicoccum*, *Dothiorella* and *Botryodiplodia*. *Sydowia*, **52**: 167-175.
- FARR, D. F., BILL, G. F., CHAMURIS, G. P., ROSSMAN, A. Y. 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 1252 pp.
- GIGANTE, R. 1934. Ricerche sulla morfología, la biología e la posizione sistemática del fungo che é stato descritto come *Macrophoma dalmatica*. *Boll. R. Staz. Pat. Veg.*, N. S., **14**: 125-172.
- GONZÁLEZ, N., VARGAS-OSUNA, E., TRAPERÓ, A. 2006. El Escudete de la aceituna I: Biología y daños en olivares de la provincia de Sevilla. *Bol. San. Veg. Plagas*, **32**.
- GONZÁLEZ FRAGOSO, R. 1914. Aclaraciones a los hongos conocidos con el nombre vulgar de "repilo". *Bol. Soc. Esp. Hist. Nat.*, **14**: 291-293.
- HARRIS, R. F. 1981. Effect of water potential on microbial growth and activity. In: Water potential relations in soil microbiology. Soil Science Society of America. Special Publication Number 9. pp. 23-95.
- LA GRECA, L., VRENNÀ, G. 1995. Danni da *Sphaeropsis dalmatica* in Calabria. *Informatore fitopatologico*, **45**: 32-33.
- LONGO, O., CAVALLO, C., D'AGNANO, G., SCHIAVONE, D., PORCELLI, F. 2004. Inusuale cascola di olive per azione combinata di tre parassiti. *Informatore Agrario*, **22**: 57-59.
- LÓPEZ-DONCEL, L. M., VIRUEGA, J. R., TRAPERÓ, A. 2000. Respuesta del olivo a la inoculación con *Spilocaea oleagina*, agente del repilo. *Bol. San. Veg. Plagas*, **26**: 349-363.
- MATEO-SAGASTA AZPEITIA, E. 1968. Notas sobre un nuevo tipo de ataque criptogámico en aceitunas españolas posiblemente atribuible a una nueva forma de ataque del hongo *Macrophoma dalmatica*. *Bol. Patol. Veg. Entomol. Agric.*, **30**: 137-146.
- MOTTA, E., SAPONARO, A. 1982/1983. Micoflora dei semi di Cupressacee. *Annali dell' Istituto sperimentale per la Patologia Vegetale Roma*, **8**: 71-75.
- NAVARRO, L. 1923. Las enfermedades del olivo. Calpe, Madrid. 176 pp.
- PHILLIPS, A. J. L., RUMBOS, J. C., ALVES, A., CORREIA, A. 2005. Morphology and phylogeny of *Botryosphaeria dothidea* causing fruit rot of olives. *Mycopathologia*, **159**: 433-439.
- ROSELLÓ, J., SEMPERE, F., SANTAMARINA, M. P. 2004. Repuestas al agua y a la temperatura del agente causante de la fusariosis del tomate: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Phytoma España*, **162**: 98-100.
- SLIPPERS, B., CROUS, P. W., DENMAN, S., COUTINHO, T. A., WINGFIELD, B. D., WINGFIELD, M. J. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia*, **96**: 83-101.
- STEEL, R. G. D., TORRIE, J. H. 1985. Bioestadística: principios y procedimientos. MacGraw-Hill, Bogotá. 622 pp.
- TRAPERÓ, A., BLANCO, M. A. 2004. Enfermedades. In: El cultivo del olivo. Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. eds. Coedición Junta de Andalucía/Mundi-Prensa. Madrid. pp. 557-614.
- YOSHIDA, S., HIRADATE, S., FUJII, Y., SHIRATA, A. 2000. *Colletotrichum dematium* produces pleytotoxins in anthracnose lesions of mulberry leaves. *Phytopathology*, **90**: 285-291.
- ZACHOS, D. G., TZAVELLA-KLONARI, K. 1979. Recherches sur l'identité et la position systématique du champignon qui provoque la maladie de olives attribuée au champignon *Macrophoma* o *Sphaeropsis dalmatica*. *Annls. Inst. Phytopath. Benaki*, **12**: 59-71.
- ZACHOS, D. G., TZAVELLA-KLONARI, K. 1983. Recherches sur les causes des infections localisées ou généralisées des olives attaquées par le champignon *Camarosporium dalmatica*. I. Influence de l'humidité, de la pression osmotique et du pH des fruits. *Annls. Inst. Phytopath. Benaki*, **14**: 1-9.

(Recepción: 1 septiembre 2006)

(Aceptación: 2 octubre 2006)





## Efecto sobre la entomofauna del olivar del tratamiento-cebo con Imidacloprid 20 LS para el control de *Bactrocera oleae* (Gmel.) (Diptera: Tephritidae), Mosca del Olivo

M. A. FARFÁN, J. C. GUERRERO, J. OLIVERO, J. IZQUIERDO, J. M. VARGAS

En el presente estudio se comprueba el grado en que un tratamiento-cebo a base de Imidacloprid, para el control de *Bactrocera oleae*, representa un impacto para las poblaciones de artrópodos comparable con el de la ausencia de tratamiento y con el de la aplicación del estándar en Producción Integrada Dimetoato. Para ello se ha realizado un ensayo en la provincia de Málaga centrado en la diversidad y la abundancia de los artrópodos del olivar y, particularmente, en las de aquellas familias que resultan potencialmente útiles para la lucha biológica contra las plagas del cultivo. En el ensayo se han seleccionado dos fincas constituidas por áreas homogéneas de olivar. Cada una de ellas ha contado con parcelas Testigo y tratadas. Para la captura de los ejemplares se han empleado trampas de caída y trampas cromotrópicas. En total se ha trabajado con 35.401 individuos pertenecientes a 97 grupos taxonómicos diferentes. No se han detectado diferencias estadísticamente significativas en la abundancia y diversidad total de artrópodos, ni en relación con los grupos útiles para la lucha biológica, debida a la naturaleza activa de las diferentes estrategias fitosanitarias puestas en práctica. Sólo la abundancia de nueve grupos taxonómicos se ve afectada de forma diferente según el tratamiento aplicado, aunque no siempre hay una tendencia clara que permita constatar que la abundancia de individuos sea mayor en las parcelas no tratadas (Testigo) que en las parcelas tratadas, ya sea con Dimetoato o con Imidacloprid.

M. A. FARFÁN, J. C. GUERRERO, J. OLIVERO, J. M. VARGAS. Departamento de Biología Animal, Universidad de Málaga, E-29071 Málaga, España. e-mail: mafarfanaguiar@hotmail.com

J. IZQUIERDO. Bayer CropScience. Departamento de Desarrollo. Pau Claris 196. 08037 Barcelona, España.

**Palabras clave:** artrópodo, confidor, dimetoato, ensayo, impacto, olivo.

### INTRODUCCIÓN

La agricultura es una actividad que ha experimentado numerosos cambios en las últimas décadas (FERNÁNDEZ-ALES *et al.*, 1992; VARGAS, 2002). El modelo extensivo vigente hasta finales de los años 60 se sustituyó paulatinamente por una agricultura más intensificada con la que se aumentó el uso de maquinaria agrícola y de productos fitosanitarios y fertilizantes. Esta transformación,

denominada "Revolución Verde", dio lugar a un incremento espectacular de la productividad sin necesidad de habilitar nuevos terrenos de cultivo. Sin embargo, este modelo intensivo tiene consecuencias negativas. A nivel local, ha supuesto un aumento de la erosión, pérdida de fertilidad de los suelos, y disminución de la diversidad biológica. A nivel regional, los problemas principales son la contaminación del agua, del suelo y de la atmósfera.

Para terminar con los problemas generados por la Revolución Verde se han desarrollado diversos modelos agrícolas para asegurar el cumplimiento de cuatro objetivos: calidad, seguridad alimentaria, respeto por el medio ambiente y rentabilidad de las explotaciones. Entre ellos están la Agricultura Ecológica y la Producción Integrada. De éstas, sólo la segunda contempla la compatibilidad entre el respeto por el medio ambiente y el uso de recursos tecnológicos como los productos fitosanitarios de síntesis. La Producción Integrada ha sido definida por la Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB) como un sistema agrícola de producción de alimentos y otros productos de alta calidad, que utiliza los recursos y los mecanismos de regulación naturales a fin de evitar efectos perjudiciales al medio ambiente, asegurando una agricultura sostenible a largo plazo.

En el contexto de la Producción Integrada es fundamental el uso exclusivo de sustancias que, controlando las plagas agrícolas, presenten efectos mínimos sobre el medio ambiente y un reducido periodo de seguridad. En plagas como la constituida por *Bactrocera oleae* (la mosca del olivo), principal plaga del olivar (ALVARADO *et al.* 1997), esta prioridad tiene un interés especial por dos razones: a) la gran susceptibilidad de la aceituna al díptero en épocas cercanas a la cosecha y, b) es un cultivo frecuentemente explotado en áreas de montaña y, por tanto, presente en espacios de interés para la conservación de la naturaleza. Actualmente, los Reglamentos autonómicos de Producción Integrada de Olivar (ver, por ejemplo, la Orden de 10 de julio de 2002, BOJA nº 88 de 27 de julio de 2002) recomiendan para combatir la mosca del olivo aplicaciones de parcheo, tras el periodo estival, del organofosforado Dimetoato en mezcla con proteína hidrolizada, siguiendo un criterio de decisiones basado en umbrales de tratamiento. Ello da lugar a que sea el insecticida recomendado y más empleado en este cultivo (ALVARADO *et al.*, 1997; CIVANTOS, 1999).

El uso continuado de una misma materia activa sobre las plagas conlleva, con gran

probabilidad, la aparición de resistencias. Las alternativas a los insecticidas utilizados en Producción Integrada requieren, no obstante, del cumplimiento de los requisitos ambientales supuestamente cubiertos por las sustancias ya admitidas. El presente estudio es la comprobación del grado en que un tratamiento-cebo a base de Imidacloprid, para el control de *Bactrocera oleae*, representa un impacto para las poblaciones de artrópodos comparable con el de la ausencia de tratamiento y con el de la aplicación del estándar en Producción Integrada Dimetoato, cuyo impacto sobre la comunidad de insectos ha sido evaluado por diversos autores (RUIZ y MUÑOZ-COBO, 1997; TORRELL *et al.*, 1997; VARELA y GONZÁLEZ, 2000; RUIZ y MONTIEL, 2002). Para ello se ha realizado un ensayo en la provincia de Málaga centrado en la diversidad y la abundancia de los artrópodos del agrosistema y, particularmente, en las de aquellas familias que resultan potencialmente útiles para la lucha biológica contra las plagas del olivar.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del presente estudio se han seleccionado dos fincas ubicadas en el término municipal de Villanueva del Trabuco, localizado en la comarca Norte de la provincia de Málaga. Ambas fincas, "Pozo Román" y "El Molino", son áreas homogéneas de olivar en explotación cercanas entre sí.

La finca denominada "Pozo Román" se encuentra a una altitud de 800-820 m y está constituida por un olivar adulto de árboles Hojiblanco con un marco de plantación al tresbolillo de 15 x 16 metros. La plantación está sobre un suelo labrado en régimen hídrico de secano.

La finca "El Molino" está situada a 720-740 m de altitud y es un olivar joven de árboles de la variedad Picual, con un marco de plantación cuadrado de 7 x 7 metros, sobre un suelo labrado en régimen hídrico de secano.

Los trabajos de campo se han llevado a cabo entre el otoño de 2004 (septiembre-noviembre) y la primavera de 2005 (mayo).

Cuadro 1. Calendario de actividades de campo.

Fecha	Código	Actividad
27/09/04	T-0	Marcado de parcelas e instalación de trampas
30/09/04	T-0'/Aplicación 1	Recogida de muestras y Aplicación 1
01/10/04	T+1a	Instalación de trampas
04/10/04	T+1a'	Recogida de trampas
11/10/04	Aplicación 2	Aplicación 2
12/10/04	T+1b	Instalación de trampas
15/10/04	T+1b'	Recogida de trampas
22/10/04	T+11	Instalación de trampas
25/10/04	T+11'	Recogida de trampas
02/11/04	T+22	Instalación de trampas
05/11/04	T+22'	Recogida de trampas
09/05/05	T+invierno_primavera	Instalación de trampas
12/05/05	T+invierno_primavera'	Recogida de trampas

El calendario de las actividades de campo aparece recogido en el cuadro 1.

Para el estudio de la comunidad de artrópodos se han delimitado dos zonas en cada finca,

cada una de las cuales ha constituido una repetición completa del ensayo. A su vez, cada zona ha sido dividida en tres parcelas, siguiendo los criterios señalados a continuación:

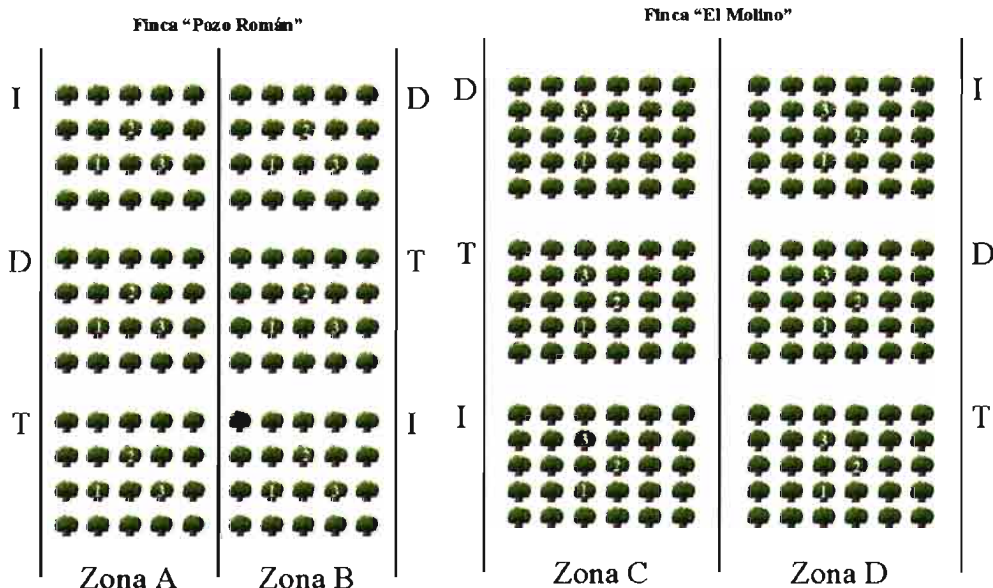


Figura 1. Distribución de las zonas y de los tratamientos en las dos fincas utilizadas en el presente estudio. Con número se indican los árboles en los que se han colocado los tres tipos de trampas utilizadas en la captura de invertebrados. T: parcela tratada con proteína hidrolizada. I: parcela tratada con Imidacloprid 20 LS y proteína hidrolizada. D: parcela tratada con Dimetoato 40 Bayer EC y proteína hidrolizada.



Figura 2. Dispositivos de captura empleados en el presente estudio. Cada uno de ellos está constituido por dos placas cromotrópicas, una amarilla y otra azul, y por una trampa de caída ("pit-fall").

1) Parcela Testigo, ubicada dentro de una banda de olivos tratados únicamente con proteína hidrolizada, Buminal (proteína hidrolizada 30 %) 500cc/ha.

2) Parcela Imidacloprid, ubicada dentro de una banda de olivos tratados con una solución de Confidor 20 LS, cuya materia activa es Imidacloprid, y proteína hidrolizada. La proporción empleada ha sido Imidacloprid 20 LS 50 cc/ha + Buminal (proteína hidrolizada 30 %) 500cc/ha.

3) Parcela Dimetoato, ubicada dentro de una banda de olivos tratados con Dimetoato 40 Bayer EC y proteína hidrolizada. La proporción empleada ha sido 500 cc/ha + Buminal (proteína hidrolizada 30 %) 500cc/ha.

En la figura 1 se muestra cómo se han distribuido los diferentes tratamientos realizados en las dos zonas seleccionadas en cada una de las fincas.

En la finca "Pozo Román" la zona muestreada tiene una superficie de 28.800 m<sup>2</sup>, mientras que la finca "El Molino" incluye 8.820 m<sup>2</sup>. Ello implica que el tamaño de cada parcela es de 4.800 m<sup>2</sup> en el caso de la primera finca y 1.470 m<sup>2</sup> en la segunda.

En la región central de cada parcela se han seleccionado tres árboles (figura 1), y en cada uno de ellos han sido instaladas las siguientes trampas siguiendo el método descrito por RUIZ y MONTIEL (2000):

1. Una placa cromotrópica amarilla engomada (figura 2) situada dentro de la copa del árbol, en su parte orientada al sureste. El único elemento atrayente de esta trampa es el color, ya que ningún tipo de cebo alimenticio ni sexual ha sido añadido a la placa.
2. Una placa cromotrópica azul (figura 2) situada también en la zona suroriental de

Cuadro 2. Información sobre las condiciones ambientales y el estado de los cultivos existentes en cada finca durante la realización de las aplicaciones fitosanitarias, así como el tiempo invertido en las mismas.

Parámetros	Finca "Pozo Román"		Finca "El Molino"	
	1ª aplicación	2ª aplicación	1ª aplicación	2ª aplicación
Fecha	30/09/2004	11/10/2004	30/09/2004	11/10/2004
Duración	9:45-12:15	9:00-11:30	13:15-15:00	12:00-13:15
Temperatura del aire (°C)	29	15	30	18
Humedad relativa (%)	38	67	25	52
Nubosidad (%)	0	40	5	30
Viento	Calma	Calma	Brisa	Brisa
Temperatura del suelo (°C)	14	9	18	10
Suelo	Seco	Ligeramente húmedo	Seco	Seco
Estado del cultivo	Fruto verde, tamaño final	Fruto verde, tamaño final	Fruto verde, tamaño final	Fruto verde, tamaño final

la copa de árbol, una vez más con el único poder atrayente que le confiere el color.

- Una trampa de caída ("pit-fall") (figura 2), colocada a ras de suelo bajo la copa del árbol y orientada hacia el sureste, consistente en un recipiente plástico de 7 cm de diámetro. En el interior de la trampa se ha vertido un atrayente alimenticio compuesto por una disolución de 25 ml de ácido láctico, 25 ml de ácido acético y 15 ml de formaldehído al 40 % en 1000 ml de cerveza. Para evitar riesgos debidos a posibles lluvias, a unos diez centímetros sobre cada trampa se ha tendido una lámina de plástico orientada perpendicularmente a la dirección de mayor pendiente, y dispuesta de modo que no interfiera con el acceso de las presas al recipiente cebado.

Cada batería de trampas ha sido instalada en 6 ocasiones según el calendario mostrado en el cuadro 1. Con estas seis fechas de muestreo se ha pretendido conocer la situación de las poblaciones de insectos en las tres parcelas en las circunstancias siguientes: a) previa a los tratamientos (T-0), b) inmediatamente posterior a los tratamientos (T+1a y T+1b), y c) una vez transcurrido un tiempo suficiente como para asumir que dichas poblaciones han podido recuperarse de los tratamientos fitosanitarios (T+11, T+22 y T+"invierno-primavera"). Antes de comenzar el primer trampeo se han señalado,

mediante cintas de plástico, las áreas a someter a cada una de las circunstancias que describen las parcelas de Imidacloprid, Dimetoato y Testigo, respectivamente.

En cada fecha de muestreo, las trampas han sido retiradas del campo tres días después de su instalación para la identificación de las capturas. Los artrópodos procedentes de trampas de caída se han conservado en alcohol al 70%, mientras que las placas cromotrópicas se han mantenido congeladas hasta el momento de la identificación de sus capturas.

En ambas fincas, la aplicación de las diferentes tesis fitosanitarias se llevó a cabo los mismos días. En el cuadro 2 aparece recogido el tiempo invertido en cada aplicación, el estado de los cultivos y las condiciones ambientales existentes en las dos fincas durante la realización de las aplicaciones.

El equipo empleado para llevar a cabo las aplicaciones ha estado constituido por un pulverizador tipo mochila con un motor Maruyama MS073D. La técnica de aplicación ha sido tipo parcheo sobre la cara sur de los olivos con un consumo de 50 litros de caldo por hectárea.

La identificación de los ejemplares capturados se ha realizado, en la inmensa mayoría de los casos, hasta la familia taxonómica. En ocasiones, no obstante, tan sólo se ha determinado hasta el nivel de orden o el de super-

familia. Se ha seleccionado la familia como categoría taxonómica de interés por el hecho de que es fácil de relacionar con una categoría trófica común a la mayoría de las especies que la componen. Esta característica es esencial para un trabajo sobre la comunidad de artrópodos del olivar, dado que son los hábitos alimenticios de cada especie los que condicionan que la fauna de artrópodos del agro-sistema sea o no potencialmente útil para el control biológico de sus plagas. Las categorías tróficas en que han sido clasificados tales hábitos alimenticios son: fitófagos (consumidores de materia vegetal viva), xilófagos (consumidores de madera), detritívoros (consumidores de materia orgánica en descomposición, tanto animal como vegetal), predadores (consumidores de otros animales que han de capturar con vida), nectarívoros (consumidores de néctares u otros líquidos superficiales), fungívoros (consumidores de hongos), polífagos (omnívoros) y parásitos (de otros animales, lo cual incluye, para los fines de este trabajo, a los parasitoides).

Con la relación de los grupos taxonómicos recolectados por cada trampa, y del número de insectos en ellas pertenecientes a cada grupo taxonómico, se ha procedido a evaluar la influencia que la existencia de un manejo determinado en el cultivo presenta sobre dos características de la comunidad de invertebrados artrópodos: la diversidad y la abundancia. Esto se ha traducido en el cálculo, para cada árbol en que se ha instalado una batería de trampas, de los siguientes parámetros:

1. Diversidad de la fauna de artrópodos: estimada como el número de grupos taxonómicos de artrópodos, principalmente familias, que aparece en las muestras.
2. Abundancia de individuos en la fauna de artrópodos.

Ambos parámetros han sido calculados teniendo en cuenta la totalidad de los grupos taxonómicos recolectados, y también considerando tan sólo aquellos grupos taxonómicos que, por su comportamiento trófico parásito o predador, pueden ser considerados útiles para la lucha biológica.

Una vez calculados para cada trampa los valores correspondientes a las dos variables enumeradas, los valores resultantes han sido analizados independientemente para cada una de las fechas de trampeo. Se ha utilizado para ello el análisis de la varianza y las pruebas de comparación de medias LSD y Scheffé (SNEDECOR y COCHRAN, 1974). El análisis de la varianza ha incluido como factores fijos la tesis fitosanitaria y la finca, y como factor aleatorio la repetición dentro de cada finca.

En caso de detectarse diferencias significativas entre parcelas de tratamiento en el primer trampeo, se han considerado dichas diferencias a la hora de analizar los datos procedentes de los muestreos posteriores al tratamiento. De no hacerlo, se corre el riesgo de interpretar como efectos de diferentes estrategias fitosanitarias lo que, en realidad, son diferencias faunísticas probablemente asociadas a las condiciones microambientales propias de cada parcela. Para ello se ha incorporado la diversidad, o en su caso la abundancia, de las faunas iniciales como covariables en el análisis de los datos posteriores al tratamiento.

Todo el proceso analítico de los datos recogidos se ha desarrollado interpretando como un solo dispositivo la combinación de las placas cromotrópicas azul y amarilla junto con la trampa de caída.

Finalmente, de la relación de grupos taxonómicos recolectados se han seleccionado aquéllos cuya representación, en la totalidad del estudio, ha venido determinada por al menos 30 individuos. La abundancia de dichos grupos taxonómicos ha sido analizada utilizando la misma metodología descrita anteriormente en relación con la abundancia de individuos totales. La única diferencia metodológica ha consistido en la transformación de los valores de abundancia mediante la siguiente expresión:

$$X = \sqrt{x+1}$$

donde X es la variable utilizada como dependiente en el análisis de la varianza y x es el valor de abundancia sin transformar. Esta modificación es recomendable en casos en

los que el evento analizado es poco abundante y presenta en numerosas ocasiones el valor 0 (SNEDECOR y COCHRAN, 1974).

## RESULTADOS

### Diversidad y abundancia de la entomofauna recopilada

A lo largo del estudio se han capturado 35.401 individuos con representantes de 17 órdenes distintos. Todos los individuos recolectados han sido encuadrados en 97 grupos taxonómicos diferentes (órdenes, superfamilias y familias) (cuadro 3).

El número de ejemplares capturados que pertenecen a grupos taxonómicos potencialmente útiles para la lucha biológica, considerados así por pertenecer a las categorías tróficas "predadores" o "parásitos", asciende a 11.608.

En el cuadro 4 se muestra el número total de órdenes en los que se integran los individuos capturados, así como el número de taxones y de ejemplares recogidos en los distintos trapeos.

### Efecto de los tratamientos fitosanitarios sobre la diversidad y la abundancia de la entomofauna

En la figura 3 se representa gráficamente los valores medios de la diversidad y la abundancia (total y de artrópodos útiles) en las diferentes parcelas de tratamiento. En ellas se observa el comportamiento mostrado por los parámetros analizados en las parcelas sometidas a distintas tesis fitosanitarias. Así mismo, en el cuadro 5 se muestran los resultados obtenidos en los análisis de la varianza.

Los resultados obtenidos en el trapeo previo a la aplicación de los tratamientos ponen de manifiesto la homogeneidad inicial de la fauna de artrópodos dentro de cada una de las fincas utilizadas en el estudio, ya que no es posible detectar diferencias significativas entre parcelas de tratamiento.

Tampoco después de los tratamientos se detectan diferencias significativas explicables por las tesis fitosanitarias utilizadas. Esto es así para la abundancia y la diversidad de artrópodos útiles y totales.

### Tendencias detectadas en la abundancia de las familias de artrópodos más representativas

En sólo 46 de los 97 grupos taxonómicos cuantificados se han observado al menos 30 individuos a lo largo del periodo de estudio.

Cuadro 3. Grupos taxonómicos de artrópodos hallados en las muestras, categoría trófica y número de individuos capturados en cada uno de ellos.

ORDEN	FAMILIA	CATEGORÍA TRÓFICA	Nº DE INDIVIDUOS
Araneae	-	predadores	504
Coleoptera	Anobiidae	xilófagos	25
	Anthricidae	detritívoros	238
	Aphodiidae	detritívoros	14
	Bruchidae	fitófagos	9
	Buprestidae	xilófagos	13
	Carabidae	predadores	42
	Chrysomelidae	fitófagos	8
	Cleridae	predadores	36
	Coccinellidae	predadores	152
	Colydiidae	predadores	1
	Cucujidae	detritívoros	7
	Curculionidae	fitófagos	7
	Dermestidae	detritívoros	3

Cuadro 3. Continuación

<i>ORDEN</i>	<i>FAMILIA</i>	<i>CATEGORÍA TRÓFICA</i>	<i>Nº DE INDIVIDUOS</i>
	Malachiidae	predadores	1
	Mycetophagidae	fungívoros	4
	Nitidulidae	detritívoros	166
	Oedemeridae	xilófagos	1
	Scarabeidae	detritívoros	2
	Serropalpidae	xilófagos	4
	Staphylinidae	predadores	350
	Tenebrionidae	fitófagos	8
<b>Collembola</b>	-	detritívoros	133
<b>Dermaptera</b>	-	detritívoros	1
<b>Dictioptera</b>	Blattidae	polífagos	3
<b>Diptera</b>	Agromyzidae	fitófagos	1.445
	Anthomyiidae	polífagos	2
	Asilidae	predadores	3
	Bibionidae	detritívoros	2
	Calliphoridae	detritívoros	1.205
	Cecidomyidae	fitófagos	41
	Ceratopoginidae	hematófagos	1
	Chironomidae	detritívoros	37
	Chloropidae	fitófagos	136
	Conopidae	parásitos	4
	Culicidae	hematófagos	1
	Dolichopodidae	predadores	90
	Drosophilidae	nectarívoros	1.814
	Empididae	predadores	287
	Ephydriidae	detritívoros	100
	Heleomyzidae	detritívoros	902
	Lauxaniidae	detritívoros	33
	Lonchaeidae	parásitos	5
	Milichidae	detritívoros	9
	Muscidae	polífagos	2.743
	Mycetophilidae	fungívoros	1.097
	Otitidae	detritívoros	2
	Phoridae	detritívoros	490
	Sarcophagidae	detritívoros	56
	Scatophagidae	predadores	45
	Scatopsidae	detritívoros	498
	Sciaridae	fungívoros	1
	Sciomyzidae	parásitos	267
	Sepsidae	detritívoros	5
	Syrphidae	predadores	112
	Tachinidae	parásitos	14
	Tephritidae	fitófagos	53
	Therevidae	fitófagos	15



Cuadro 3. Continuación

<i>ORDEN</i>	<i>FAMILIA</i>	<i>CATEGORÍA TRÓFICA</i>	<i>Nº DE INDIVIDUOS</i>
<b>Heteroptera</b>	Aradidae	fungívoros	2
	Cimicidae	hematófagos	10
	Cydnidae	fitófagos	1
	Lygaeidae	fitófagos	64
	Miridae	fitófagos	57
	Pyrrhocoridae	polífagos	1
<b>Himenoptera</b>	Superf. Apoidea	nectarívoros	645
	Bethylidae	parásitos	7
	Braconidae	parásitos	792
	Cephalidae	fitófagos	1
	Superf. Chalcidoidea	parásitos	6.237
	Chrysididae	parásitos	8
	Cimbicidae	nectarívoros	9
	Cynipidae	fitófagos	3
	Formicidae	polífagos	382
	Ichneumonidae	parásitos	411
	Pompilidae	predadores	1
	Superf. Proctotrupeoidea	parásitos	3
	Sphecidae	predadores	26
	Tenthredinidae	fitófagos	4
Vespidae	polífagos	61	
<b>Homoptera</b>	Aleyrodidae	fitófagos	466
	Superf. Aphidoidea	fitófagos	2.495
	Cercopidae	fitófagos	8
	Cicadellidae	fitófagos	594
	Cicadidae	fitófagos	3
	Cixiidae	fitófagos	3
	Superf. Coccoidea	fitófagos	75
	Psyllidae	fitófagos	352
<b>Isopoda</b>	-	detritívoros	1
<b>Isoptera</b>	-	xilófagos	5
<b>Lepidoptera</b>	-	fitófagos	795
<b>Neuroptera</b>	Chrysopidae	predadores	346
	Coniopterygidae	predadores	1.843
	Hemerobiidae	predadores	20
<b>Orthoptera</b>	Gryllidae	fitófagos	9
<b>Pseudoescorpiones</b>	-	predadores	1
<b>Psocoptera</b>	-	polinívoros	124
<b>Thysanoptera</b>	-	fitófagos	6.289

De éstos, sólo nueve muestran diferencias significativas entre parcelas de tratamiento: tres predadores (las familias Carabidae, Coniop-

terygidae y Syrphidae), uno fitófago (la superfamilia Coccoidea) y cinco detritívoros (las familias Anthicidae, Chironomidae, Hele-

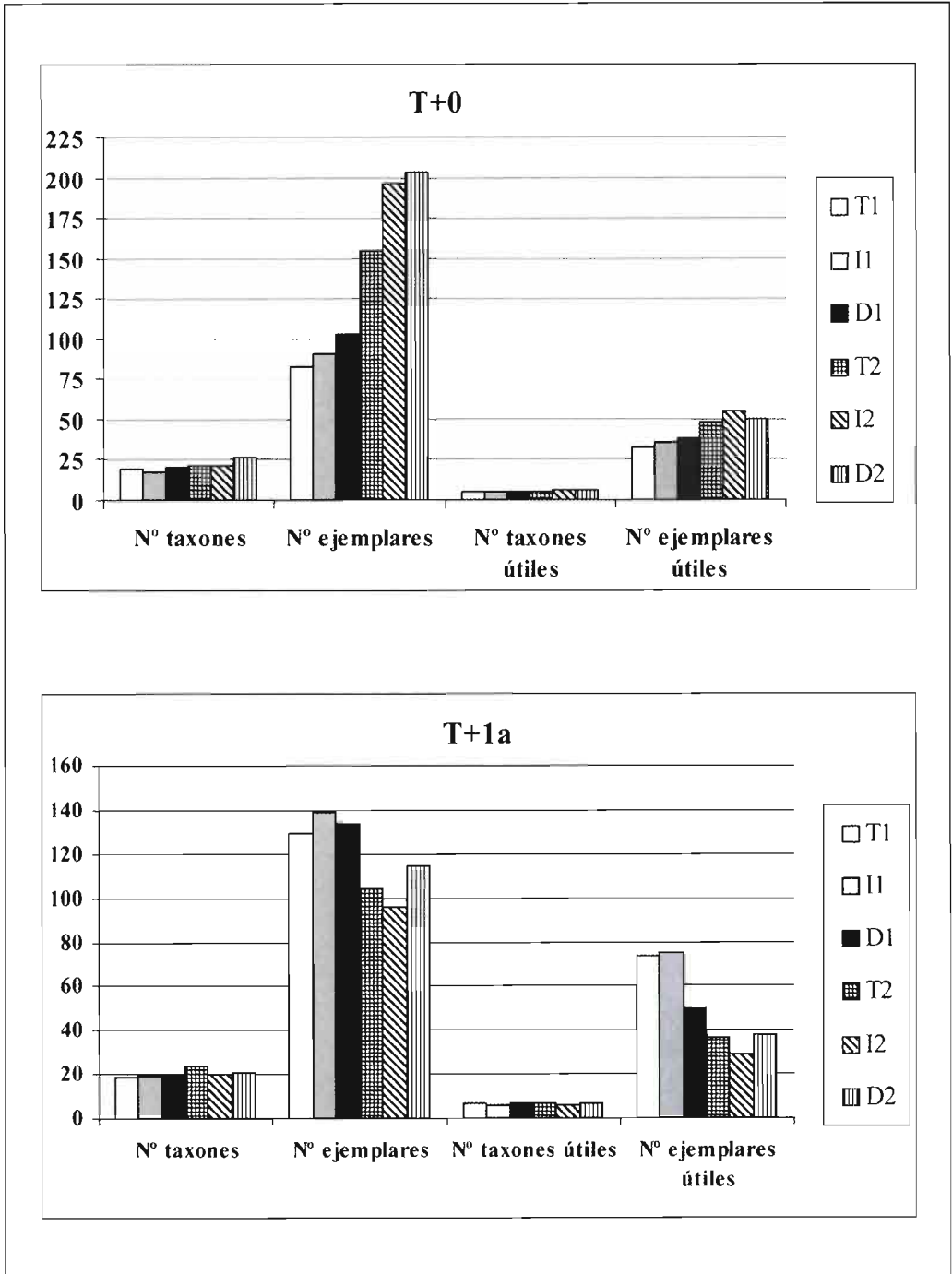


Figura 3. Valores medios de los cuatro parámetros analizados en las diferentes parcelas de tratamiento. T1: testigo finca Pozo Román; I1: imidacloprid finca Pozo Román; D1: dimetoato finca Pozo Román; T2: testigo finca El Molino; I2: imidacloprid finca El Molino; D2: dimetoato finca El Molino.

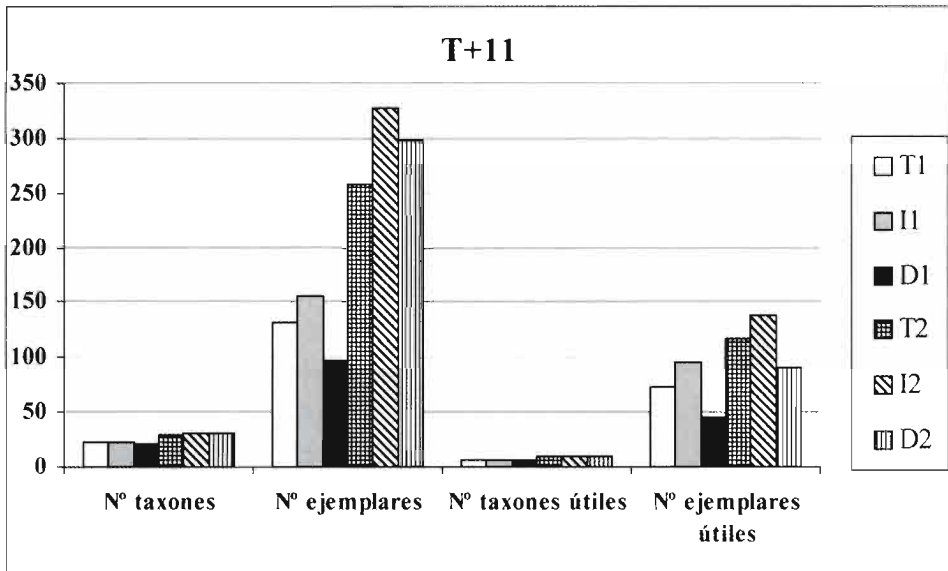
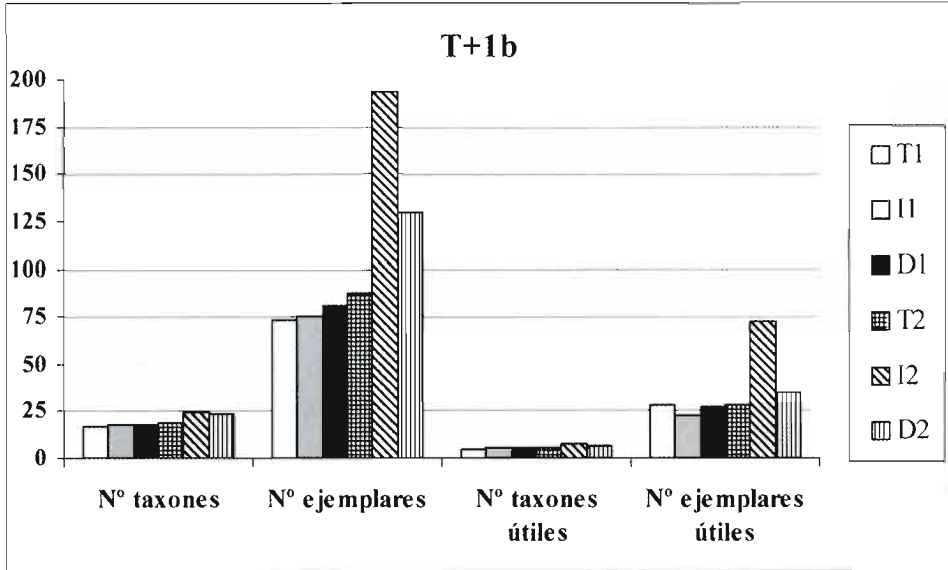


Figura 3. Valores medios de los cuatro parámetros analizados en las diferentes parcelas de tratamiento. T1: testigo finca Pozo Román; I1: imidacloprid finca Pozo Román; D1: dimetoato finca Pozo Román; T2: testigo finca El Molino; I2: imidacloprid finca El Molino; D2: dimetoato finca El Molino. (Cont.)

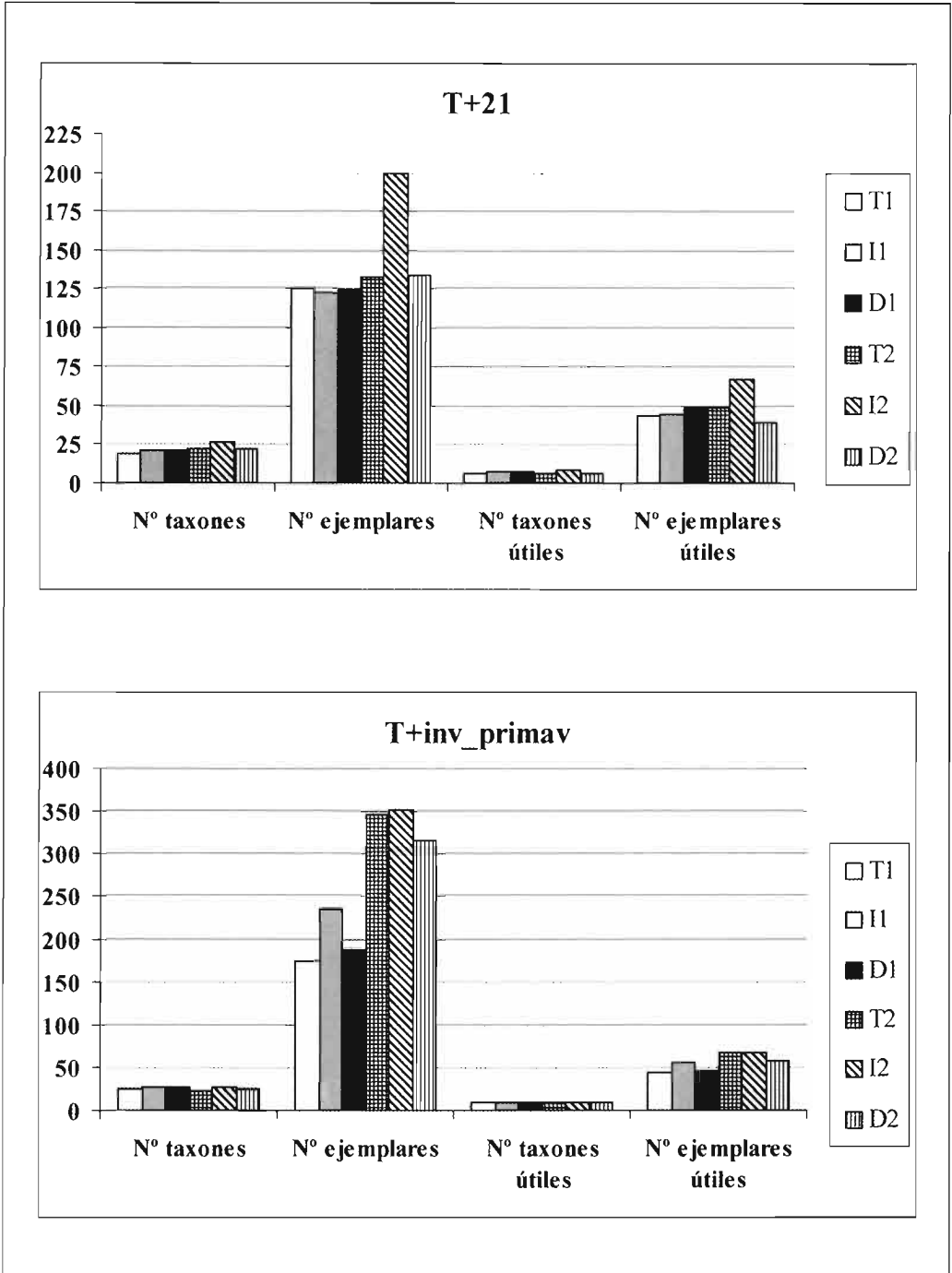


Figura 3. Valores medios de los cuatro parámetros analizados en las diferentes parcelas de tratamiento. T1: testigo finca Pozo Román; I1: imidacloprid finca Pozo Román; D1: dimetoato finca Pozo Román; T2: testigo finca El Molino; I2: imidacloprid finca El Molino; D2: dimetoato finca El Molino. (Cont.)

Cuadro 4. Datos referentes a las capturas realizadas en cada finca de estudio en las cinco fechas de trampeo, considerando conjuntamente los ejemplares procedentes de las placas cromotrópicas amarillas, azules y los de las trampas de caída.

FINCA "Pozo Román"	T+0	T+1a	T+1b	T+11	T+22	T+inv_primav
Nº de órdenes	12	11	11	13	13	13
Nº de superfamilias y familias	50	45	43	55	52	59
Nº de ejemplares	1.659	2.416	1.372	2.301	2.230	3.581
Nº superf. y fam. útiles	14	15	14	19	18	20
Nº ejemplares útiles	636	1.190	440	1.282	819	881

FINCA "El Molino"	T+0	T+1a	T+1b	T+11	T+22	T+inv_primav
Nº de órdenes	11	11	10	12	11	12
Nº de superfamilias y familias	57	56	47	56	53	63
Nº de ejemplares	3.332	1.889	2.467	5.298	2.801	6.091
Nº superf. y fam. útiles	19	18	17	17	18	21
Nº ejemplares útiles	913	621	813	2.061	926	1.140

omyzidae, Nitidulidae y Sarcophagidae) (ver el cuadro 6). La familia Anthicidae muestra diferencias significativas previas a los tratamientos (T+0). En este caso, la abundancia observada en el primer día de muestreo ha sido utilizada como covariable en los análisis de los datos de muestreos posteriores.

En las familias Carabidae y Coniopterygidae se observan diferencias estadísticamente significativas debidas a los tratamientos inmediatamente después de la segunda aplicación (T+1b) y en la última fecha de muestreo (T+inv\_primav). Sin embargo, la comparación dos a dos de las tesis fitosanitarias no detecta estas diferencias. Esto indica una cierta gradualidad en el modo en que se establecen las diferencias entre tratamientos; es decir, si bien las tres estrategias difieren en su efecto, no es posible ubicar saltos bruscos entre ellas. En cualquier caso, hay que destacar que, para la familia Carabidae, el número medio de individuos capturados es mayor en las parcelas de Dimetoato y menor en las de Imidacloprid. Para la familia Coniopterygidae, las parcelas con la media de individuos más alta son las Testigo, seguidas, en este orden, por las de Imidacloprid y las de Dimetoato (ver el cuadro 7).

Para la familia Syrphidae, se aprecia que 21 días después de la segunda aplicación hay

significativamente más individuos en las parcelas tratadas con Imidacloprid que en las parcelas Testigo (ver el cuadro 7).

Entre los fitófagos, la superfamilia Coccoidea muestra diferencias significativas en la segunda salida de campo (T+1a), inmediatamente después de la primera aplicación. Tampoco aquí se obtienen diferencias significativas al realizar las pruebas de comparación dos a dos, sino que tales diferencias presentan un comportamiento de variación gradual, con capturas mayores en las parcelas de Imidacloprid y menores en las de Dimetoato (ver el cuadro 7).

Los detritívoros son la categoría trófica con un mayor número de grupos taxonómicos presumiblemente afectados de forma diferente por los distintos productos fitosanitarios. En los Anthicidae, las diferencias ocurren en T+22 y T+inv\_primav, mientras que en la familia Chironomidae tiene lugar en T+11. Por último, las diferencias relativas a las familias Heleomyzidae, Nitidulidae y Sarcophagidae se observan en T+1a, inmediatamente después de la primera aplicación. No obstante, en ninguno de ellos se obtienen diferencias significativas al comparar los tratamientos dos a dos. En el cuadro 7 se muestran los valores medios obtenidos para las familias detritívoras en cada parcela de tratamiento.

Cuadro 5. Resultados de los análisis de la varianza de los cuatro parámetros analizados en cada una de las fechas de trampeo.  $F_s$  = F de Fisher y Snedecor. P = significación; n.s.:  $P \geq 0.05$  (no significativa); \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ . -: factor no interpretado por la obtención de una  $F_s$  negativa.

		<i>Nº de grupos taxonómicos</i>	<i>Nº ejemplares</i>	<i>Nº de grupos taxonómicos útiles</i>	<i>Nº ejemplares útiles</i>
<b>T+0</b>					
<i>Finca</i>	$F_s$	49,000	861,474	1,331	400,000
	P	n.s.	*	n.s.	*
<i>Zona</i>	$F_s$	1,174	,007	1,800	,011
	P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Tratamiento</i>	$F_s$	,736	,179	,177	,027
	P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>T+1a</b>					
<i>Finca</i>	$F_s$	3,610	5,390	,008	5,601
	P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Zona</i>	$F_s$	,313	,381	,420	,588
	P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Tratamiento</i>	$F_s$	,187	,009	,326	,059
	P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>T+1b</b>					
<i>Finca</i>	$F_s$	16,810	12,722	5,062	3,659
	P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Zona</i>	$F_s$	,750	,549	-	,179
	P	n.s.	n.s.	-	n.s.
<i>Tratamiento</i>	$F_s$	14,333	1,246	4,742	1,894
	P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>T+11</b>					
<i>Finca</i>	$F_s$	184,960	21,245	361,000	24,619
	P	*	n.s.	*	n.s.
<i>Zona</i>	$F_s$	-	-	-	-
	P	-	-	-	-
<i>Tratamiento</i>	$F_s$	,027	,105	3,000	,817
	P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>T+22</b>					
<i>Finca</i>	$F_s$	4,176	3,391	,405	,612
	P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Zona</i>	$F_s$	1,949	1,936	2,077	1,594
	P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Tratamiento</i>	$F_s$	,961	2,005	3,912	1,341
	P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>T+inv_primav</b>					
<i>Finca</i>	$F_s$	9,000	32,248	,111	28,654
	P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Zona</i>	$F_s$	,292	,695	,889	-
	P	n.s.	n.s.	n.s.	-
<i>Tratamiento</i>	$F_s$	,897	1,902	,259	,200
	P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Cuadro 6. Resultados de los análisis de la varianza de los grupos taxonómicos más representativos de predadores, parásitos, fitófagos, detritívoros, nectarívoros, polífagos y fungívoros.  $F_s$  = F de Fisher y Snedecor. P = significación; n.s.:  $P \geq 0.05$  (no significativa); \*;  $P < 0.05$ ; \*\*;  $P < 0.01$ . -: factor no interpretado por la obtención de una  $F_s$  negativa.

Grupo taxonómico	T+0		T+1a		T+1b		T+1I		T+22		T+inv_primav		
	$F_s$	P	$F_s$	P	$F_s$	P	$F_s$	P	$F_s$	P	$F_s$	P	
<i>Carabidae</i>	Tratamiento	0,65	n.s.	0,47	n.s.	1,00	n.s.	7,88	n.s.	7,00	n.s.	21,22	*
	Zona	1,00	n.s.	1,00	n.s.	1,00	n.s.	1,00	n.s.	-	-	-	-
	Finca	2,45	n.s.	4,00	n.s.	1,00	n.s.	5,74	n.s.	-	-	113,59	n.s.
<i>Coniopterygidae</i>	Tratamiento	0,13	n.s.	0,24	n.s.	38,09	*	1,73	n.s.	1,0	n.s.	0,43	n.s.
	Zona	-	-	0,43	n.s.	0,34	n.s.	0,16	n.s.	1,0	n.s.	-	-
	Finca	8,58	n.s.	12,23	n.s.	1,01	n.s.	22,54	n.s.	1,0	n.s.	83995,88	**
<i>Syrphidae</i>	Tratamiento	2,15	n.s.	2,33	n.s.	0,04	n.s.	1,07	n.s.	32,21	*	1,00	n.s.
	Zona	0,03	n.s.	0,33	n.s.	0,00	n.s.	-	-	0,12	n.s.	0,30	n.s.
	Finca	0,03	n.s.	0,36	n.s.	0,00	n.s.	4532,86	**	0,44	n.s.	0,39	n.s.
<i>Superf.</i>	Tratamiento	0,43	n.s.	21,51	*	0,10	n.s.	0,40	n.s.	-	-	1,00	n.s.
	Zona	0,02	n.s.	0,10	n.s.	0,19	n.s.	1,00	n.s.	-	-	1,00	n.s.
	Finca	4492,88	**	0,09	n.s.	3,34	n.s.	13,01	n.s.	-	-	1,00	n.s.
<i>Anthicidae</i>	Tratamiento	127,18	**	1,22	n.s.	0,72	n.s.	0,40	n.s.	11,53	**	6,25	*
	Zona	0,08	n.s.	0,55	n.s.	1,20	n.s.	0,00	n.s.	-	-	0,16	n.s.
	Finca	38,34	n.s.	4,44	n.s.	0,50	n.s.	0,01	n.s.	3,47	n.s.	6,17	n.s.
<i>Chironomidae</i>	Tratamiento	0,11	n.s.	0,14	n.s.	3,00	n.s.	21,38	*	0,65	n.s.	0,33	n.s.
	Zona	2,87	n.s.	-	-	4,00	n.s.	1,00	n.s.	0,45	n.s.	-	-
	Finca	-	-	9,00	n.s.	4,00	n.s.	6,67	n.s.	0,17	n.s.	-	-
<i>Heleomyzidae</i>	Tratamiento	2,88	n.s.	49,60	*	2,19	n.s.	0,05	n.s.	0,05	n.s.	2,95	n.s.
	Zona	0,78	n.s.	0,42	n.s.	5,16	n.s.	0,02	n.s.	1,15	n.s.	0,31	n.s.
	Finca	17,32	n.s.	11,03	n.s.	9276,70	**	3,27	n.s.	28,70	n.s.	0,74	n.s.
<i>Nitidulidae</i>	Tratamiento	0,28	n.s.	86,73	*	1,66	n.s.	0,40	n.s.	1,41	n.s.	0,71	n.s.
	Zona	3,12	n.s.	-	-	1,00	n.s.	0,51	n.s.	0,07	n.s.	1,52	n.s.
	Finca	0,02	n.s.	165,00	*	6,10	n.s.	1,25	n.s.	0,08	n.s.	44,65	n.s.
<i>Sarcophagidae</i>	Tratamiento	2,01	n.s.	57,70	*	9,32	n.s.	1,00	n.s.	1,00	n.s.	1,00	n.s.
	Zona	2,51	n.s.	-	-	-	-	1,00	n.s.	4,00	n.s.	1,00	n.s.
	Finca	13,01	n.s.	4,54	n.s.	3081,28	*	9,00	n.s.	1,00	n.s.	1,00	n.s.

Cuadro 7. Valores medios de abundancia de los nueve grupos taxonómicos para cada una de las fecha de muestreo en la que el análisis de la varianza (ANOVA) ha detectado diferencias estadísticamente significativas. T: parcela Testigo; D: parcela Dimetoato; I: parcela Imidacloprid.

	T+1a			T+1b			T+11			T+22			T+inv_primav		
	T	D	I	T	D	I	T	D	I	T	D	I	T	D	I
<i>Carabidae</i>													1,07	1,19	1,04
<i>Coniopterygidae</i>				1,35	1,10	1,13									
<i>Syrphidae</i>										1,12	1,40	1,62			
<i>Coccoidea</i>	1,23	1,10	1,26												
<i>Anthicidae</i>										1,07	1,00	1,07	1,22	1,66	1,23
<i>Chironomidae</i>							1,17	1,13	1,04						
<i>Heleomyzidae</i>	1,46	1,62	1,33												
<i>Nitidulidae</i>	1,21	1,40	1,51												
<i>Sarcophagidae</i>	1,07	1,13	1,07												

## DISCUSIÓN

Para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la diversidad y la abundancia, tanto de insectos útiles como totales, se han analizado de forma independiente las capturas realizadas en cada fecha de muestreo. Es decir, en ningún momento se han mezclado datos de fechas distintas en las que la fenología de los insectos podría encontrarse en estados diferentes. Por estos motivos, se puede descartar que la inexistencia de diferencias significativas en los parámetros analizados, entre parcelas tratadas y parcelas Testigo, esté influida por diferencias en el estado fenológico de los grupos de insectos procedentes de las distintas muestras.

En trabajos similares al descrito en el presente artículo (RUIZ y MUÑOZ-COBO, 1997; VARELA y GONZÁLEZ, 2000; RUIZ y MONTIEL, 2002; ADÁN *et al.*, 2005) se detecta una influencia significativa de las aplicaciones con Dimetoato sobre la entomofauna, si se compara con lo observado en las parcelas Testigo. Por esta razón, llama la atención la falta de diferencias observadas aquí entre el conjunto de parcelas tratadas (cualquiera que sea la materia activa utilizada) y las parcelas Testigo. En los trabajos consultados, no obstante, el tratamiento aplicado sobre los olivos es total, y no de parcheo como los realizados en el presente ensayo. El parcheo da

lugar a la existencia de zonas del olivar que no quedan expuestas a los tratamientos, las cuales pueden estar ejerciendo el papel de reservorios de insectos que actuarían como fuente de los mismos, compensando y, por lo tanto, enmascarando el efecto que los tratamientos pudiesen tener sobre su abundancia y diversidad. Este fenómeno está descrito en VARELA y GONZÁLEZ (2000). Otra fuente habitual de artrópodos útiles que podría facilitar la recuperación de sus poblaciones tras un tratamiento fitosanitario es la vegetación adventicia, ya sea en cubiertas vegetales, linderos o malas hierbas dentro del olivar. Sin embargo, las parcelas en las que se ha llevado a cabo el ensayo carecen de dichas estructuras de vegetación.

También destaca la inexistencia de diferencias significativas entre las parcelas tratadas con Dimetoato y las tratadas con Imidacloprid. Los resultados obtenidos por ADÁN *et al.* (2005) al analizar el efecto sobre la entomofauna auxiliar de diferentes compuestos utilizados en el control de moscas de la fruta, pusieron de manifiesto que las aplicaciones cebo con Dimetoato resultan mucho más tóxicas que las realizadas con Imidacloprid. Esto se explica, según dichos autores, por el hecho de que Dimetoato es un insecticida de amplio espectro con un potente efecto por contacto, además de actuar por ingestión (DE LIÑÁN, 2004). Sin embargo, en el presente ensayo no se ha detectado un



efecto diferencial entre estos dos tratamientos, sino más bien el comportamiento de ambos productos fitosanitarios parece equiparable.

Por otro lado, el número de grupos taxonómicos cuya abundancia se muestra afectada de forma diferente por ambas sustancias es considerablemente bajo: sólo nueve de los 46 grupos taxonómicos representados en el estudio por más de 30 ejemplares, es decir, menos de la quinta parte. Los individuos incluidos en dichos grupos representan aproximadamente la décima parte del total capturado a lo largo del estudio. Por otra parte, en estos nueve grupos taxonómicos no es posible identificar una tendencia clara que permita constatar que la abundancia de individuos sea mayor en las parcelas no tratadas (Testigo) que en las parcelas tratadas, cualquiera que sea el producto fitosanitario empleado. Concretamente, en el 27,3 % de los casos la abundancia es mayor en las parcelas Testigo, mientras que en el 72,7 % de los casos restantes las mayores abundancias se reparten por igual entre las parcelas tratadas con Dimetoato y con Imidacloprid.

Como consideración final, debido al tamaño de las parcelas de tratamiento utilizado, no se descarta la posibilidad de que haya existido un cierto grado de deriva de artrópodos procedentes de las parcelas Testigo.

## CONCLUSIONES

1. El tamaño y la diversidad de la muestra con la que se ha trabajado en el presente

ensayo, compuesta por 35.401 individuos y 97 grupos taxonómicos distintos, han posibilitado que los análisis efectuados estén sustentados en una matriz de datos considerablemente sólida, lo que proporciona robustez a los resultados obtenidos.

2. En un periodo de ocho meses inmediatamente después de un tratamiento fitosanitario con Dimetoato e Imidacloprid para el control de *Bactrocera oleae* (Mosca del olivo), no se han detectado diferencias estadísticamente significativas en la abundancia y diversidad total de artrópodos, ni en relación con los grupos útiles para la lucha biológica, de las que pueda responsabilizarse a la naturaleza activa de las diferentes estrategias fitosanitarias puestas en práctica en el ensayo.
3. A lo largo de ocho meses transcurridos a partir de un tratamiento fitosanitario con Dimetoato e Imidacloprid para el control de *Bactrocera oleae*, tan sólo la abundancia de nueve grupos taxonómicos de los 46 considerados (el 19,6 %) se ve significativamente afectada por los tratamientos. Los individuos incluidos en dichos grupos representan solamente el 9,8 % del total capturado a lo largo del ensayo.
4. En los nueve grupos taxonómicos en los que la abundancia es afectada por los tratamientos aplicados no siempre hay una tendencia clara que permita constatar que la abundancia de individuos sea mayor en las parcelas no tratadas (Testigo) que en las parcelas tratadas, ya sea con Dimetoato o con Imidacloprid.

## ABSTRACT

FARFÁN M. A., J. C. GUERRERO, J. OLIVERO, J. IZQUIERDO, J. M. VARGAS. 2006. Effect on olive grove arthropod communities of a bait-application with Imidacloprid 20 LS for the control of *Bactrocera oleae* (Gmel.) (Diptera: Tephritidae), Olive Fruit Fly. *Bol. San. Veg. Plagas*, 32: 739-756.

In this study we verify the effect of a bait-application on olive grove arthropods with Imidacloprid for the control of *Bactrocera oleae*. We compare the results with those obtained with the application of Dimethoate and with absence of any treatment. We analysed in two different regions the diversity and abundance of the olive grove arthropod communities within Malaga province (South Spain), particularly those taxonomic groups useful for the biological control of olive grove plagues. To capture the arthropods we used pit-fall traps and sticky yellow and blue traps. We captured 35.401 arthropods

classified in 97 different taxonomic groups. We did not detect significant differences in the diversity and abundance of the total arthropods neither in the taxonomic groups useful for the biological control caused by the applications. Individually, we found significant differences in the abundance of nine taxonomic groups only, although the abundance of individuals is not always higher in the plots with absence of treatment.

**Key words:** arthropod, confidor, dimethoate, experiment, impact, olive tree.

## REFERENCIAS

- ADÁN, A., BUDIA, F., CONTRERAS, G., DEL ESTAL, P., MEDINA, P. y VIÑUELA, E. 2005. Efectos de la pulverización cebo en *Chrysoperla carnea* y *Psytalia concolor*. ¿Un ejemplo de selectividad ecológica? *Phytoma España*, nº 169: 67-70.
- ALVARADO, M., CIVANTOS, M. y DURÁN, J. M. 1997. Plagas. En: *El Cultivo del Olivo*. Editorial Mundi-Prensa. Cap. 15. 399-459.
- CIVANTOS, M. 1999. Defensa fitosanitaria en sistemas de producción integrada. En: *Cultivo del olivar en zonas de especial protección ambiental. Informaciones Técnicas 65/99*. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía.
- DE LIÑÁN, C. 2004. *Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales 2005*. Ediciones Aerotécnicas. Madrid, 740 pp.
- FERNÁNDEZ-ALES, R., MARTÍN, A., ORTEGA, F. y ALES, E. E. 1992. Recent changes in landscape structure and function in a mediterranean region of SW Spain (1950-1984). *Landscape Ecology*, 7: 3-18.
- RUIZ TORRES, M. y MONTEL BUENO, A. 2000. Introducción al conocimiento de la Entomofauna del olivar en la provincia de Jaén. Aspectos cualitativos. (I). *Bol. San. Veg. Plagas*, 26: 129-147.
- RUIZ TORRES, M. y MONTEL BUENO, A. 2002. Efectos del dimetoato usado en aplicaciones terrestres y aéreas sobre la entomofauna del olivar en la provincia de Jaén. *Bol. San. Veg. Plagas*, 28: 525-560.
- RUIZ TORRES, M. y MUÑOZ-COBO ROSALES, J. 1997. Efectos de insecticidas en la entomofauna del olivar. *Actas VIII Simposium Científico-Técnico de Expoliva-97*.
- SNEDECOR, G. W. y COCHRAN, W. G. 1974. Statistical methods. The Iowa State University Press, Iowa. 703 pp.
- TORRELL, A., ROJO, M., DUATIS, J. J. y PEDRET, E. 1997. Nueva técnica para el control de la mosca del olivo por medios aéreos en la zona olivarera de Baix Ebre y Montsià (Tarragona). *Phytoma España*, nº 92: 46-57.
- VARELA, J. L. y GONZÁLEZ, R. 2000. La lucha química contra *Prays oleae* (Lep., Yponomeutidae) y su influencia en los enemigos naturales de las plagas del olivar. *Phytoma España*, nº 115: 24-30.
- VARGAS, J. M. 2002. *Alerta cinegética. Reflexiones sobre el futuro de la caza en España*. Otero, Madrid: 399 pp.

(Recepción: 15 marzo 2006)

(Aceptación: 14 septiembre 2006)

## Herbivoría diferencial frente al lepidóptero especialista *Phocides polybius phanias* (Hesperiidae)

G. MAREGGIANI, A. GARAU

*Phocides polybius phanias* es un lepidóptero altamente especialista, cuyos hospedantes se circunscriben a la familia Mirtaceae, particularmente *Eucalyptus* spp. Se analizó la herbivoría ocasionada por larvas de tercer estadio en un ensayo de elección simple, ofreciendo como alimento hojas de seis especies de *Eucalyptus* de cultivo frecuente en la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos. *E. camaldulensis* resultó la especie más dañada mientras que *E. globulus* fue la menos preferida. Estos datos se compararon con los de otro ensayo efectuado con larvas de tercer estadio cuyo alimento consistió en material inerte impregnado con un fagoestimulante y con uno de los metabolitos secundarios mayoritarios de *Eucalyptus* spp., el 1,8 cineol. El material tratado con fagoestimulante+1,8 cineol fue significativamente menos comido que el control ( $p < 0.05$ ). La preferencia diferencial que *P. polybius phanias* mostró en el ensayo de elección simple con follaje, podría entonces atribuirse a la concentración diferencial de este compuesto en las especies de *Eucalyptus* ensayadas.

G. MAREGGIANI. Cát. Zoología Agrícola Fac. Agronomía UBA, Avda. San Martín 4453, Bs.As., Argentina, email: mareggia@agro.uba.ar  
A. GARAU. Cát. Dasonomía, Fac. Agronomía UBA, Avda. San Martín 4453, Bs.As., Argentina

**Palabras clave:** *Eucalyptus* spp. 1,8 cineol. preferencias alimentarias.

### INTRODUCCIÓN

*Phocides polybius phanias* Burmeister (Hesperiidae) es un lepidóptero oligófago o especialista cuyos hospedantes se circunscriben a la familia Myrtaceae, particularmente *Eucalyptus* spp. (LARRIERA URES, 1990)

Las larvas, de tipo eruciforme, presentan franjas transversales amarillas sobre fondo rojo, durante la mayor parte de su desarrollo (Figura 1), recubriéndose de una capa cerosa blanquecina en los últimos estadios. Se las encuentra sobre el follaje, o bien protegidas en un refugio formado por las hojas o por trozos semicirculares de ellas, que adhieren mediante hilos sedosos producidos por la propia larva (Figura 2). El perjuicio que pro-

ducen en el follaje es muy característico pues cortan la hoja desde el borde ocasionando ausencia de secciones semicirculares de tejido (Figura 3).

El patrón de forrajeo de los insectos defoliadores es variable en función de numerosas características propias de las hojas, como por ejemplo la edad (MEYER y MONTGOMERY, 1987), su valor nutritivo (Howard, 1987), su dureza (FOLGARAIT y DAVIDSON, 1994) o la presencia de ceras superficiales (FLOYD *et al.*, 1994). Del mismo modo, distintos compuestos secundarios tienen un efecto directo en la defensa del follaje contra la herbivoría (STONE y BACON, 1994).

Los eucaliptos tienen glándulas en sus hojas que producen aceites esenciales cuyo



Figura 1. Larva de *P. polybius phanias* de 3er estadio.



Figura 2. Refugio larval de *P. polybius phanias* en *E. camaldulensis*.

rendimiento y composición química varía ampliamente entre especies, individuos o época del año (BARTON *et al.*, 1989; STONE y BACON, 1994; DORAN y BELL, 1994; WILDY *et al.*, 2000). La complejidad química del patrón de forrajeo de *Eucalyptus* spp. está regulada por distintos metabolitos secundarios, que pertenecen principalmente a dos grupos, los terpenos, entre los que se ubica el 1,8 cineol y un grupo definido de compuestos fenólicos, los diformylphloroglucinoles (MOORE *et al.*, 2004). El 1,8 cineol se encuentra distribuido en hojas jóvenes y adultas de eucalipto (CLOSE *et al.*, 2005) y su actividad tóxica y subletal ha sido evaluada sobre lepidópteros como *Spodoptera litura*

Fabricius (ISMAN, 2000) y *Ephestia kuehniella* Zeller (ERLER, 2005).

Sobre la base de observaciones de campo que mostraron diferente grado de herbivoría por *P. polybius phanias* en distintas especies de eucaliptos (MAREGGIANI *et al.*, 2005b), así como por antecedentes bibliográficos que mencionan variaciones en la defoliación debida a otros insectos, de acuerdo con la especie y subespecie considerada, en este trabajo se analizó la herbivoría ocasionada por larvas de tercer estadio cuya oferta de alimento consistió en hojas de seis especies de *Eucalyptus* de cultivo frecuente en los alrededores de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina. Además, los resultados de ingesta se compararon con los registrados sobre material inerte impregnado con fagoestimulante y con el monoterpenoide 1,8 cineol, uno de los metabolitos secundarios mayoritarios de *Eucalyptus* spp.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se efectuaron dos grupos de bioensayos de elección simple:

### a. Herbivoría sobre material vegetal

El bioensayo, con un diseño completamente aleatorizado, comprendió seis tratamientos, representados por las especies de *Eucalyptus* en estudio (*E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. dunnii*, *E. sideroxylon*, *E.*

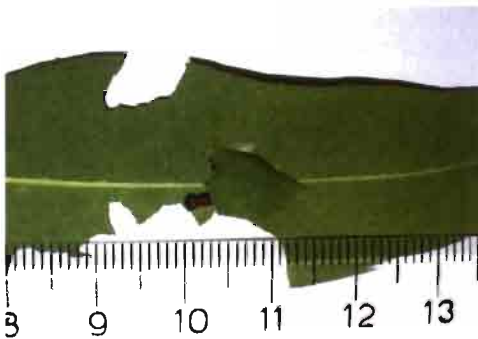


Figura 3. Daño en semicírculos, causado por *P. polybius phanias* en *E. camaldulensis*.



Figura 4. Vista parcial del bioensayo de herbivoría sobre material de *Eucalyptus* spp.

*grandis* y *E. globulus*). Cada repetición estuvo constituida por una caja de petri con el fondo cubierto por papel de filtro humedecido, conteniendo hojas de peso y edad semejante y una larva de tercer estadio de *P. polybius phanias* (Figura 4). Se midió la superficie ingerida a las 24 y 48 h. Los resultados fueron analizados a través de un ANOVA y se utilizó la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para establecer diferencias significativas entre tratamientos.

#### b. Herbivoría sobre material inerte impregnado con 1,8 cineol

Se efectuó un bioensayo con un diseño completamente aleatorizado en cajas de petri acondicionadas de igual manera que en el punto anterior. Se realizaron cinco tratamientos, representados por trozos de papel de filtro recortados del tamaño y forma de una hoja e impregnados con sacarosa (fagoestimulante) y una solución acetónica de 1,8



Figura 5. Vista parcial del bioensayo de herbivoría sobre material inerte impregnado con fagoestimulante y con 1,8 cineol 0,1% (izquierda: control con sacarosa, derecha: sacarosa + cineol).

cineol (standard comercial) en cuatro concentraciones: 0% (control), 0.1%, 1%, 10% y 100%. Se dejó evaporar la acetona durante una hora, con posterioridad a lo cual se incorporó una larva de tercer estadio por repetición. Se midió la superficie ingerida a las 24 h en el control y en el tratamiento con 0.1% cineol, ya que en los restantes tratamientos hubo mortalidad larval (Figura 5).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los resultados mostró que la ingestión de *E. camaldulensis* fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) tanto a las 24 h como a las 48 h de iniciado el ensayo (Figuras 6 y 7). Por su parte y también en ambos momentos de observación, *E. globulus* resultó la especie menos comida. Estos datos coinciden con las observaciones realizadas en campo, ya que desde 2004, fecha en que comenzó a detectarse este lepidóptero en parques de la ciudad de Buenos Aires, la mayor parte de los daños se han registrado sobre *E. camaldulensis* (MAREGGIANI *et al.*, 2005a).

Las demás especies mostraron resultados intermedios. A las 24 h y 48 h (Figura 6 y Figura 7) no se registraron diferencias en la ingesta de *E. sideroxylon*, *E. tereticornis*, *E. dunnii* y *E. grandis* y todas resultaron con

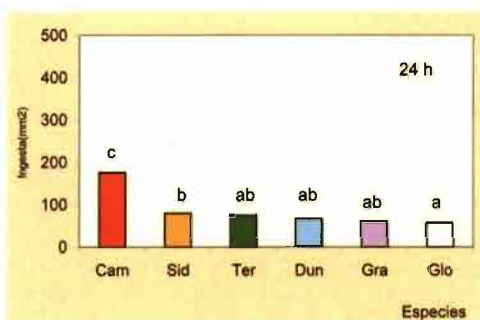


Figura 6. Superficie foliar ingerida durante 24 hs en hojas de distintas especies de *Eucalyptus*. Letras distintas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Cam: *E. camaldulensis*, Sid: *E. sideroxylon*, Ter: *E. tereticornis*, Dun: *E. dunnii*, Gra: *E. grandis*, Glo: *E. globulus*.

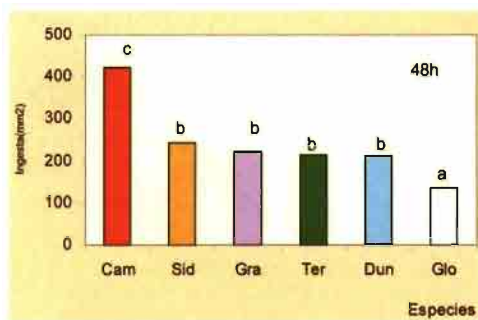


Figura 7. Superficie foliar ingerida durante 48 hs en hojas de distintas especies de *Eucalyptus*. Letras distintas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Cam: *E. camaldulensis*, Sid: *E. sideroxylon*, Ter: *E. tereticornis*, Dun: *E. dunnii*, Gra: *E. grandis*, Glo: *E. globulus*.

menor grado de daño que *E. camaldulensis*. Sin embargo, a las 48 h se manifestaron diferencias significativas entre *E. dunnii*, *E. tereticornis* y *E. grandis* con *E. globulus*.

En un ensayo comparativo con siete especies de eucalipto en relación con la defoliación por hormigas podadoras VENDRAMIN *et al.* (1995) no observaron diferencias entre *E. grandis*, *E. dunnii* y *E. camaldulensis*, ocupando todas ellas posiciones intermedias de preferencia; mientras que *E. grandis* resultó la segunda especie menos preferida.

Por su parte, QUEIROZ SANTANA y DOS ANJOS (1989) tampoco encontraron diferencias en el ataque de hormigas entre *E. camaldulensis*, *E. dunnii* y *E. tereticornis*, si bien *E. tereticornis* fue menos dañada por una especie de hormiga en particular. Según VENDRAMIN *et al.* (1995) la variabilidad en los resultados de preferencia entre distintos autores podría asignarse a posibles diferencias entre los orígenes genéticos del material utilizado, observación que en parte coincide con la de otros autores que observaron distinta susceptibilidad a la defoliación según la población de *Eucalyptus* en estudio (JOHNS *et al.*, 2004). *E. sideroxylon* contiene sideroxylonal, metabolito que modifica el comportamiento de forrajeo de folívoros arbóreos (WIGGINS y MARSH, 2006) y que podría haber intervenido en el caso de estos herbívoros.

El menor daño observado sobre *E. globulus* podría deberse posiblemente al alto tenor de 1,8 cineol presente en su aceite esencial, cuya toxicidad ha sido verificada sobre plagas de granos (LEE *et al.*, 2004). Los herbívoros que se especializan sobre un reducido rango de hospedantes, como es el caso de *P. polybius phanias*, frecuentemente emplean los terpenoides de sus plantas huéspedes como claves para ayudar en la localización del hospedante. Los monoterpénoides como el cineol, por su volatilidad, intervienen como claves para que las hembras de algunos lepidópteros localicen la especie de *Eucalyptus* más apropiada para realizar sus posturas (STEINBAUER y SCHIESTL, 2004). Algunas larvas de lepidópteros presentan en su intestino oxigenasas dependientes del citocromo P-450 que permiten su detoxificación, adecuándolo como alimento (GERSHENZON y CROTEAU, 1991). Este proceso tiene un costo metabólico que debe ser compensado por el beneficio que otorga, y que se ha evaluado en algunos marsupiales folívoros que se especializan en *Eucalyptus* (KROCKENBERGER, 1988). El mecanismo de detoxificación podría explicar la diferente respuesta en la preferencia de una misma especie de eucalipto según el herbívoro de que se trate.

En nuestro ensayo, las larvas que recibieron concentración de cineol puro mostraron

100% de mortalidad a la hora de exposición, mientras que a 10 y 1% se registraron valores de mortalidad que oscilaron entre 50 y 20 % respectivamente. En el tratamiento 0.1%, que no causó efectos letales, la superficie ingerida fue 9,8 veces mayor para el control impregnado con sacarosa (ingesta promedio de 40,2 mm<sup>2</sup>) en comparación con el tratado con sacarosa y cineol 0,1% (ingesta promedio de 4,1 mm<sup>2</sup>). Estas diferencias llevarían a suponer que este metabolito, en diferentes concentraciones según la especie de *Eucalyptus*, podría actuar modulando la aceptación de la fuente de alimento. En tal sentido, las diferencias en el contenido de 1,8 cineol que se citan para *E. globulus* y *E. camaldulensis* e incluso *E. grandis* (PAPPAS y SHEPPARD-HANGER, 2000; BARTON et al., 1989; FLOYD et al., 1994; BASER et al., 1998) coincidirían con los niveles de daño observados en nuestro ensayo.

Las preferencias aquí observadas también podrían haber resultado influenciadas por otros factores como palatabilidad, dureza y

contenido hídrico de las hojas así como por la presencia de pelos o ceras en la superficie (HOWARD, 1987). Para ponderar adecuadamente su efecto, se hacen necesarios estudios adicionales que definan la importancia relativa de los factores químicos y físicos en la selección del alimento.

## CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias significativas en el nivel de daño causado por *Phocides polybius phanias* (Hesperidae) en hojas de distintas especies de eucalipto. El contenido de 1,8 cineol, un importante metabolito secundario típico del género *Eucalyptus*, podría explicar la preferencia diferencial hacia las seis especies analizadas.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Buenos Aires por el apoyo económico otorgado (Proyecto UBACyT G062).

## ABSTRACT

MAREGGIANI G., A. GARAU. 2006. Differential herbivory of the specialist lepidoptera *Phocides polybius phanias* (Hesperidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, 32: 757-762.

*Phocides polybius phanias* is a lepidoptera with high specialization, whose hosts belong to the Myrtaceae family, particularly *Eucalyptus* spp. Leaves of six *Eucalyptus* species frequently planted in Buenos Aires city, Argentina, were offered to third instar larvae to analyze herbivory in a single choice test. Significant differences ( $p < 0.05$ ) among the treatments were found. *E. camaldulensis* was the most damaged species while *E. globulus* was the less preferred. These data were compared with another test with third instar larvae which were offered an inert material treated with a phagostimulant+1,8 cineol, one of the principal secondary compounds in *Eucalyptus* spp. The material treated with 1,8 cineol+phagostimulant was significantly less eaten than the control ( $p < 0.05$ ). The differential preferences that *P. polybius phanias* showed in the foliage single choice test could then be attributed to different concentrations of this compound in the *Eucalyptus* tested.

**Key words:** *Eucalyptus* spp, 1,8 cineol, feeding preferences.

## REFERENCIAS

- BARTON, A., TJANDRA, J., P. NICHOLAS. 1989. Chemical evaluation of volatile oils in *Eucalyptus* species. *Journal of Agric. Food Chem.*, 37: 1253-1257.
- BASER, K., GULBABA, A., AZCAN, N., KARA, M., KIRIMER, N., KURKCUOGLU, M., OZEK, T., N.OZKURT. 1998. Study of the technology, yield and composition of essential oils from some *Eucalyptus* species grown in Turkey. *Teknic. Bultrn Orman Bakanligi Dogu Akdaniz Ormancilik Arastirma Enstitusu*, 7: 60 p.

- CLOSE, D., MC. ARTHUR, C., HAGERMAN, A. E., FITZGERALD, H. 2005. Differential distribution of leaf chemistry in eucalypt seedlings due to variation in whole-plant nutrient availability. *Phytochemistry*, **66** (2):215-221.
- DORAN J., R. BELL. 1994. Influence of non-genetic factors on yield of monoterpenes in leaf oils of *Eucalyptus camaldulensis*. *New Forest*, **8**, 4: 363-379.
- ERLER, F. 2005. Fumigant activity of six monoterpenoids from aromatic plants in Turkey against the two stored product pests Confused flour beetle, *Tribolium castaneum* and Mediterranean flour moth, *Ephesia kuehniella*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **112** (6): 602-611.
- FLOYD, R., FANOW, R., NEUMANN, F. 1994. Inter and intra provenance variation in resistance of red gum foliage to insect feeding. *Australian Forestry*, **57**: 45-48.
- FOLGARAIT, P., D. DAVIDSON. 1994. Antiherbivore defenses of myrmecophytic *Cecropia* under different light regimes. *Oikos*, **71**: 305-320.
- GERSHENZON, J., CROTEAU, R. 1991. Terpenoids. Chapter 5 p.165-220 In "Herbivores. Their interactions with secondary plant metabolites" Academic Press Inc. USA.
- HOWARD, J. 1987. Leafcutting ant diet selection: the role of nutrients, water and secondary chemistry. *Ecology*, **68** (3): 503-515.
- ISMAN, M. B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, **19** (8-10): 603-608.
- JOHNS, C. V., STONE, C., HUGHES, L. 2004. Feeding preferences of the Christmas beetle *Anoplognathus chloropyrus* (Coleoptera: Scarabaeidae) and four paropsine species (Coleoptera:Chrysomelidae) on selected *Eucalyptus grandis* clonal foliage. *Australian Forestry*, **67** (3): 184-190.
- KROCKENBERGER, A. 1988. Metabolic cost of detoxification of 1,8 cineole (Eucalyptol) in two arboreal folivores, the ringtail possum (*Pseudocheirus peregrinus*) and the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). Hons thesis, University of Sydney, Australia.
- LARRIERA ÜRES, B. 1990. Principales enfermedades y plagas que afectan a algunas especies del género *Eucalyptus*. Jornadas sobre *Eucalyptus* para la región pampeana. CIEF, Bs. As., Argentina. p. 241-254.
- LEE, B. H., ANNIS, P. C., TUMAALII, F., CHOI, W. S. 2004. Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8 cineole against 3 major stored-grain insects. *Journal of Stored Products Research*, **40** (5): 553-564.
- MAREGGIANI, G., PANNUNZIO, M. J., GARAU, A., MOYA, A. 2005a. *Phocides polybius phanias* (Lepidoptera: Hesperidae): nueva plaga en la Ciudad de Buenos Aires. VI Congreso Argentino de Entomología. Tucumán. Resúmenes, p. 252.
- MAREGGIANI, G., GARAU, A., MOYA, A., MICHETTI, M. 2005b. Host preferences of the specialist lepidoptera *Phocides polybius phanias* (Hesperidae). VI Congreso Argentino de Entomología. Tucumán. Resúmenes, p. 146.
- MEYER, G., MONTGOMERY, M. 1987. Relationships between leaf age and the food quality of cottonwood foliage for the gypsy moth *Lymantria dispar*. *Oecologia*, **72**: 527-532.
- MOORE, B., WALLIS, J. R., PALÁ-PAUL, J., BROPHY, J. J., WILLIS, R. H., FOLEY, W. J. 2004. Antiherbivore chemistry of Eucalyptus-cues and deterrents for marsupial herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, **30** (9): 1743-1769.
- PAPPAS, R., SHEPPARD-HANGER, S. 2000. Essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. from South Florida: a high crytone/low cineole eucalyptus. *Journal of Essential Oil Research*, **12**, 3: 383-384.
- QUEIROZ SANTANA, D., DOS ANJOS, N. 1989. Resistencia de *Eucalyptus* spp (Myrtaceas) a *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae). *Rev.Arvore*, **13** (2): 174-181.
- STEINBAUER, M. J. , SCHIESTL, F. P. 2004. Monoterpenes and epicuticular waxes help female autumn gum moth differentiate between waxy and glossy *Eucalyptus* and leaves of different ages. *Journal of Chemical Ecology*, **30** (6): 1117-1142.
- STONE, C., BACON, P. 1994. Relationships among moisture stress, insect herbivory, foliar cineole content and the growth of river red gum *Eucalyptus cmaldulensis*. *Journal of Applied Ecology*, **31**: 604-612.
- VENDRAMIN, J., SILVEIRA NETO, S., CERIGNONI, J. 1995. Nao preferencia de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) por especies de *Eucalyptus*. *Ecossistema*, **20**: 87-92.
- WIGGINS, N.,L., MARSH, K.,J. 2006. Sideroxylonal in eucalyptus foliage influences foraging behaviour of an arboreal folivore. *Oecologia*, **147** (2): 272-279.
- WILDY, D., PATE, J., BARTLE, J. 2000. Variations in composition and yield of leaf oils from alley-farmed oil mallees (*Eucalyptus* spp) at a range of contrasting sites in the Western Australian wheat belt. *Forest Ecology and Management*, **134**: 205-217.

(Recepción: 30 mayo 2006)

(Aceptación: 15 septiembre 2006)



## Incidencia del empleo de insecticidas piretroides sobre la presencia de acariosis (Acarina, Eriophidae) en olivares de la provincia de Jaén

M. RUIZ TORRES, A. MONTIEL BUENO

Con el fin de comprobar si existe alguna correspondencia entre el uso continuado de insecticidas piretroides y la aparición de síntomas de acariosis en olivar, se ha realizado una prospección en 365 olivos distribuidos en 73 fincas de la provincia de Jaén. El trabajo se ha llevado a cabo en 2004 y 2005, sobre fincas que hubieran empleando deltametrina, alfacipermetrín, lambdacihalotrín o dimetoato, al menos en los tres últimos años. Además, se tuvieron en cuenta otros factores que pudieran influir en la plaga, como el hecho de ser explotaciones de secano o regadío, y el sistema de manejo de suelo (cubierta vegetal, laboreo y no laboreo).

El riego y el tratamiento con deltametrina son las variables que explican casi el 60% de los casos de acariosis.

Cuando se ordenan los resultados por tipo de manejo de suelo y por régimen de riego o secano, se obtienen dos extremos claros: por un lado las fincas tratadas con deltametrina, que exhiben los mayores valores de presencia de acariosis en la mayoría de variables: riego, secano y no laboreo, y por otro, las tratadas con dimetoato, con los menores valores en casi todas las variables menos el manejo con cubierta vegetal. Entre ambos extremos, las fincas tratadas con alfacipermetrina, que se asemejan a las tratadas con deltametrina, y las fincas tratadas con lambdacihalotrín se asemejan a las tratadas con dimetoato.

El tipo de manejo de suelo no influye en la presencia de síntomas de acariosis.

Se sugiere la conveniencia de haber tenido en cuenta la fertilización nitrogenada como una variable más para explicar la presencia de acariosis.

M. RUIZ TORRES, A. MONTIEL BUENO. Laboratorio de Producción y Sanidad Vegetal. Cerro de los Lirios s/n. 23005 JAÉN.

**Palabras clave:** Impacto, deltametrina, alfacipermetrina, lambdacihalotrín, ácaros.

### INTRODUCCIÓN

El manejo integrado de plagas en el cultivo del olivar cuenta con un reducido número de insecticidas, de los que el dimetoato, siendo el más empleado, queda fuera del Anejo I de la Directiva 91/414 (85). Ante la posible situación de falta de materias activas para hacer frente de manera eficaz a las diferentes plagas del olivar, se ha intentado impulsar el empleo de determinados insecticidas piretroides que actualmente están registradas para el olivar, e incluidas en el Anejo I de la

Directiva 91/414 (85), pero con un uso muy limitado. Este empleo más generalizado de sustancias piretroides ha provocado el recelo de especialistas, por el fuerte impacto sobre la entomofauna (MUELLER-BEILSCHMIDT, 1990). La reglamentación referente a Producción Integrada es confusa al respecto, pues en la actualidad hay comunidades autónomas que permiten el uso de algunos insecticidas piretroides, y otras comunidades autónomas no lo permiten.

Por otro lado, la realidad del sector indica que, independientemente del criterio de los



Figura 1. Síntomas de acariosis en hoja del olivo.

especialistas, el consumo de insecticidas piretroides en olivar se ha disparado en los últimos años.

Con este trabajo se pretende analizar si existe alguna relación entre el uso continuado de las materias activas más empleadas (como son la alfacipermetrina, deltametrina y lambdacihalotrin) y la aparición de síntomas de acariosis.

La acariosis en olivares adultos es una patología provocada por diversos ácaros eriófidis, de los cuales el más relevante es *Aceria oleae* (GONZÁLEZ *et al.* (1999), PAPAIOANNOU-SOULIOTIS y MARKOYIANNAKI-PRINTZIOU, 2003). Como tal patología no reviste importancia salvo en determinadas y escasas situaciones (ALVARADO *et al.*, 2004), en que puede afectar a la aceituna de mesa. Su hipotética vinculación al empleo de piretroides podría arrojar información sobre el impacto de estas sustancias sobre el cultivo del olivar.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para comprobar si existe algún tipo de correspondencia entre la aparición de síntomas de acariosis y la aplicación habitual de insecticidas piretroides se han realizado prospecciones visuales en olivares de los que se tenía la información acerca de los insecticidas empleados desde el año 2000/ 2001. La presencia de acariosis se encuentra influida por diferentes factores ambientales, por lo que se han buscado cultivos sujetos a distinto manejo de suelo y en régimen de secado y regadío, que hayan sido objeto de aplicaciones habituales de lambdacihalotrin, alfacipermetrina, deltametrina o dimetoato. Los tratamientos con estas sustancias han sido mayoritariamente contra las generaciones filófagas, antófagas y/o carpófagas de *Prays oleae*. Además, en unas pocas ocasiones se han empleado contra *Phloeotribus scarabaeoides* y en una contra *Otiorrhynchus cribricollis*. En muchas de las fincas tratadas con piretroides se hacían más de un tratamiento anual. En cambio, entre las que han empleado dimetoato para los mismos usos, son fre-

cuentes las fincas en las que ha habido algún año sin aplicación de insecticidas.

La prospección ha consistido en analizar diez brotes en cada uno de los cinco árboles tomados al azar en cada finca. Los brotes se seleccionaban en todas las orientaciones, a la altura de la cabeza, y en ellos se buscaban los síntomas de ataque característicos de la acariosis (deformaciones y abolladuras en hojas y yemas, Figura 1). La exploración visual ha sido llevada a cabo por la misma persona. En este muestreo visual de campo se anotaba sólo presencia o ausencia de síntomas en cada brote. El resto de información anotada que se ha considerado a efectos de análisis, ha sido: tipo de insecticida empleado, régimen de riego o secano y manejo de suelo (laboreo, no laboreo y cubierta vegetal).

Para los análisis estadísticos, la unidad empleada ha sido la presencia de acariosis en un árbol, expresada como el número de brotes con síntomas dividido entre diez.

Tras la normalización de datos, mediante la raíz  $(x+1)^{1/2}$  se ha empleado el análisis de varianza y la posterior prueba de comparación múltiple de Scheffé, para comparar la presencia de acariosis según los diferentes criterios considerados (tipo de insecticida, régimen de cultivo y manejo de suelo).

Para comprobar la importancia de cada variable considerada en la presencia de acariosis, se ha llevado a cabo una clasificación mediante un análisis de función discriminante. Se ha empleado el paquete informático SPSS 11.5 (FERRANZ, 1996).

## RESULTADOS

Se han visitado un total de 73 fincas ubicadas en diferentes comarcas olivareras de la provincia de Jaén, tanto de campiña como de sierra. Los resultados de todas las prospecciones se presentan en el Cuadro 4. Los muestreos se han desarrollado entre junio y noviembre de 2004 y en junio de 2005. Los 365 árboles muestreados (cinco en cada finca) se distribuyen entre las variables consideradas según se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Número de árboles muestreados en régimen de riego (R) o seco (S), con cubierta vegetal (C), no laboreo (NL) o laboreo (L) y para cada una de las materias activas consideradas: alfacipermetrina (A), lambdacihalotrin (LA), deltametrina (DE) y dimetoato (Di).

	R	S	Total	A	LA	DE	Di
<b>Total</b>	<b>145</b>	<b>220</b>		<b>75</b>	<b>130</b>	<b>95</b>	<b>65</b>
<b>C</b>	15	35	<b>50</b>	10	30	0	10
<b>NL</b>	85	80	<b>165</b>	25	90	5	45
<b>L</b>	45	105	<b>150</b>	40	10	90	10
	R	S					
<b>A</b>	40	35					
<b>LA</b>	45	85					
<b>DE</b>	45	50					
<b>Di</b>	15	50					

La media de brotes con síntomas de ataque ha sido de 27.5% para el caso de las fincas tratadas con lambdacihalotrin, 44.9% para las fincas tratadas con alfacipermetrina, 46.3% para las tratadas con deltametrina y 18.8% para las fincas con tratamiento de dimetoato. Estas medias difieren significativamente entre sí en todos los pares de comparaciones salvo en el caso de la alfacipermetrina con la deltametrina ( $F=16.85$ ; Scheffé,  $p<0.99$ ) y el dimetoato con el lambdacihalotrin ( $F=16.85$ ; Scheffé,  $p<0.24$ ).

Cuando se han ordenado los resultados por diferentes tipos de manejos de suelo (Cubierta vegetal, labrado y no labrado), independientemente de los tratamientos insecticidas, la media de brotes con síntomas no difieren estadísticamente entre sí. En las fincas con cubierta vegetal, la media de brotes con síntomas de ataque es del 29.6%, en las fincas con labrado es del 38.9% y en las fincas con no laboreo es del 31.8%.

Por último, cuando se han analizado los casos por régimen de riego o seco, se encuentran diferencias estadísticamente significativas ( $F=21.06$ ;  $p<0.000$ ). La presencia media de brotes con síntomas de ataque en las fincas de riego, es del 43.5% y en las fincas de seco, del 28.4%.

En el Cuadro 2 se presentan los valores medios de la presencia de síntomas de ataque en brotes, ordenando los árboles según su tipo de manejo de suelo y su condición de riego o seco.

Como puede apreciarse, casi en todas las formas de ordenar los datos, se encuentran dos extremos bien diferenciados estadísticamente (Cuadro 3), por un lado las fincas con tratamientos de dimetoato, que presentan la menor cantidad de brotes con acariosis, frente a las fincas con deltametrina, que exhiben los mayores porcentajes de brotes afectados.

Para dilucidar la proporción de ataque debida a los tratamientos insecticidas y la

Cuadro 2. Porcentaje de brotes con síntomas de ataque de acariosis. El significado del encabezamiento de filas y columnas, según se muestra en el Cuadro 1.

	LA	A	Di	DE
<b>R</b>	34.9	57	15.3	49.6
<b>S</b>	23.5	31.1	19.8	43.4
<b>NL</b>	32.6	52	13.6	82
<b>L</b>	25	35.8	16	44.3
<b>C</b>	13	64	45	-
<b>Total</b>	27.5	44.9	18.8	46.3

Cuadro 3. Valores de la comparación múltiple Scheffé en los diferentes ANOVAs realizados, cuyos resultados son: RIEGO,  $F=7.97$ ,  $p<0.000$ ; SECANO  $F=7.66$ ,  $p<0.000$ ; LABOREO,  $F=3.85$ ,  $p<0.01$ ; NO LABOREO,  $F=16.94$ ,  $p<0.000$  y CUBIERTA,  $F=12.07$ ;  $p<0.000$ . En rojo, las diferencias estadísticamente significativas.

		Di	DE	LA
Riego	A	0.001	0.836	0.027
	Di		0.004	0.205
	DE			0.182
Secano	A	0.227	0.341	0.506
	Di		0.000	0.863
	DE			0.001
Laboreo	A	0.279	0.56	0.79
	Di		0.04	0.90
	DE			0.31
No Laboreo	A	0.000	0.17	0.03
	Di		0.000	0.002
	DE			0.002
Cubierta	A	0.39	-	0.000
	Di		-	0.02
	DE			-

proporción debida al régimen de riego, se han llevado a cabo análisis de función discriminante, con el que se consigue distinguir el conjunto de variables que mejor explica el conjunto de resultados.

Teniendo en cuenta la totalidad de los árboles prospectados, las variables RIEGO y DELTAMETRINA (por orden de importancia) son las únicas que se escogen para construir dos funciones que explicarían el 57.9% de los casos.

Al considerar solo los árboles en fincas de secano, únicamente la variable DELTAMETRINA es seleccionada para explicar el 68.6% de los casos.

Al considerar sólo los casos de fincas de riego, las variables que selecciona el análisis de función discriminante son ALFACIPERMETRINA y DELTAMETRINA, y ambas explican el 51.4% de los casos.

Teniendo en cuenta sólo los casos de fincas en las que se practica el laboreo, la variable que se escoge es DELTAMETRINA, explicando el 53.4% de los casos.

En los árboles de fincas con no laboreo como técnica de manejo de suelo, la función discriminante que se construye para clasifi-

car los casos escoge las variables DIMETOATO y LAMBDA CIHALOTRIN, que explican el 62.4% de los casos.

Por último, considerando sólo las fincas en las que mantienen una cubierta vegetal como forma de manejo del suelo, las variables escogidas para las funciones discriminantes son LAMBDA CIHALOTRIN, SECANO y DIMETOATO, y explican el 81.3% de los casos.

## DISCUSIÓN

Las relaciones depredador-presa suelen ser modificadas por los piretroides (MUELLER-BEILSCHMIDT, 1990), puesto que presentan unas  $DL_{50}$  más bajas para los depredadores. En el caso de los ácaros fitoseidos, depredadores eficaces de otros ácaros fitófagos, los valores de  $DL_{50}$  pueden llegar a ser hasta quince veces menores que para las plagas que controlan, hecho que explica la tremenda sensibilidad al tratamiento con piretroides de este equilibrio depredador-presa en la comunidad de ácaros (ESPINHA *et al.*, 1998; SATO *et al.*, 2001; VILLARONGA y GARCÍA-MARÍ, 1988). ZACHARDA (2001) otorga a

los fitoseidos el carácter de bioindicadores de las perturbaciones producidas por los tratamientos pesticidas. La presencia de varias especies de fitoseidos en olivar ha sido documentada por GONZÁLEZ *et al.* (1999) en Sevilla y por PAPAIOANNOU-SOULIOTIS y MARKOYIANNAKI-PRINTZIOU (2003) en Grecia.

Los olivares tratados con deltametrina son los que presentan una mayor frecuencia de acariosis, hecho corroborado por el análisis discriminante, puesto que la deltametrina es la variable que más se escoge para construir las funciones que clasifican los casos correctamente en dicho análisis discriminante. Posiblemente el impacto de los piretroides sobre los fitoseidos sea la causa de este incremento significativo de los síntomas de acariosis. VILLARONGA y GARCÍA-MARÍ (1988) describen el fuerte impacto que tiene la aplicación de deltametrina sobre este grupo de ácaros en avellano, y SATO *et al.* (2001) en cítricos.

El empleo de alfacipermetrina y de lambdacihalotrin no parece estar detrás de la presencia de acariosis, al menos cuando se consideran todos los casos. El análisis discriminante muestra que los valores altos de acariosis en el caso de la alfacipermetrina se deben a la presencia de riego en las fincas prospectadas.

El riego es la otra variable que ayuda a clasificar correctamente los casos en el análisis discriminante. Los árboles presentes en fincas de riego tienen un 43.5% de brotes con acariosis, frente al 28.4% de las fincas de secano. Esta circunstancia es lógica teniendo en cuenta que la aplicación de riegos tiene como consecuencia inmediata un crecimiento rápido, con tejidos jóvenes que tardan un tiempo en lignificarse, hecho que favorece el ataque de *Aceria oleae*.

El porcentaje de casos bien clasificados por las variables consideradas en todos los análisis discriminantes, deja un margen bien amplio de casos que no es explicado por ninguna variable de las nueve consideradas (cuatro insecticidas, riego o secano y tres tipos de manejo de suelo), lo que sugiere que habría que haber tenido en cuenta otras, como puede ser el aporte de abonos nitrogenados y la forma y época de abonado, dada la importancia que tiene este nutriente, junto al riego, en el crecimiento vegetativo del olivo, lo que favorecería la presencia de *Aceria oleae*.

Por último, mencionar el hecho de que el tipo de manejo de suelo no parece estar detrás de la presencia de síntomas de acariosis.

Cuadro 4. Resultados de la prospección de acariosis, expresados como número de brotes con síntomas dividido entre diez. LA: lambdacihalotrin, A: alfacipermetrina, D: dimetoato, DE: deltametrina, NL: No laboreo, L: laboreo, C: cubierta, R: riego y S: secano.

Árbol 1	Árbol 2	Árbol 3	Árbol 4	Árbol 5	Insect.	Suelo	Riego
0,8	0,5	0,8	0	0,3	LA	NL	S
0,6	0,6	0,2	0,1	0,5	LA	NL	S
0,3	0,3	0,5	0,2	0,2	LA	NL	R
0,4	0,4	0,4	0,4	0,6	LA	NL	S
0,8	0,5	0,5	0,9	0,8	LA	NL	R
0	0	0,2	0,2	0	LA	NL	S
0,5	0,5	0,5	0,2	0,5	LA	NL	R
0,1	0,9	0,3	0	0,4	LA	NL	S
0,4	0,3	0,3	0,6	0,4	LA	NL	R
0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	LA	NL	R
0,5	0,5	0,1	0,2	0,1	LA	NL	S
0,3	0,4	0,4	0,9	0,3	LA	NL	S
0,4	0,2	0,4	0,4	0,4	LA	L	S
0	0,1	0,2	0,2	0	LA	NL	S

**Cuadro 4. Resultados de la prospección de acariosis, expresados como número de brotes con síntomas dividido entre diez. LA: lambdacialotrin, A: alfacipmetrina, D: dimetoato, DE: deltametrina, NL: No laboreo, L: laboreo, C: cubierta, R: riego y S: seco. (Continuación)**

0,3	0,5	0,7	0,7	0,6	LA	C	S
0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	LA	L	S
0,1	0,3	0,1	0	0,2	LA	NL	S
0	0,1	0	0	0,1	LA	C	S
0,1	0,2	0	0	0	LA	C	S
0,1	0	0,2	0	0,1	LA	C	S
0	0	0	0	0,1	LA	C	S
0	0	0	0,1	0	LA	C	S
0,1	0,4	0,4	0	0,2	LA	NL	R
0,3	0	0	0,1	0,2	LA	NL	R
0,1	0,1	0	0,1	0,3	LA	NL	R
0	0,1	0	0	0	LA	NL	R
0,9	1	0,8	0,8	1	A	C	R
0	0	0	0,2	0,3	A	NL	R
0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	A	NL	R
0,8	0,2	0,6	0,6	0,5	A	L	S
0,1	0,3	0,1	0,2	0,3	A	L	S
0,9	0,6	1	1	0,9	A	NL	R
0,7	0,1	0,6	1	1	A	L	R
0	0,2	0,1	0,9	0,7	A	C	R
0,7	0,9	0,7	0,6	0,9	A	NL	R
0,1	0	0,1	0	0	A	NL	R
0,1	0,1	0,2	0,3	0,2	A	L	S
0,3	0	0,1	0,1	0	A	L	S
0,4	0,3	0,2	0,7	0,6	A	L	S
0,6	0,3	0,4	0,3	0,3	A	L	S
0,2	0,3	0,2	0,5	0,5	A	L	S
0,1	0,1	0	0	0,1	D	C	R
0	0	0,1	0,1	0,1	D	NL	R
0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	D	NL	S
0,3	0,5	0	0,4	0,5	D	NL	R
0,3	0,2	0,3	0,1	0,3	D	L	S
0,9	0,7	1	0,8	0,8	D	C	S
0,4	0,1	0	0	0	D	NL	S
0	0	0,1	0	0,2	D	NL	S
0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	D	NL	S
0	0	0	0	0,2	D	NL	S
0	0	0	0	0	D	NL	S
0	0	0,3	0	0,1	D	L	S
0	0,1	0,7	0,1	0,2	D	NL	S
0,4	0,4	0,5	0,6	0,4	DE	L	R
0,8	0,7	0,8	0,8	0,6	DE	L	R
0,2	0,1	0,6	0,8	0,4	DE	L	S

**Cuadro 4. Resultados de la prospección de acariosis, expresados como número de brotes con síntomas dividido entre diez. LA: lambdacihalotrín, A: alfacipermetrina, D: dimetoato, DE: deltametrina, NL: No laboreo, L: laboreo, C: cubierta, R: riego y S: secano. (Continuación)**

0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	DE	L	R
0,3	0,1	0,3	0,3	0,2	DE	L	R
0,5	0,7	0,6	0,5	0,5	DE	L	R
0,4	0	0	0	0,1	DE	L	R
1	0,8	0,9	0,9	0,9	DE	L	R
0,2	0,5	0,8	0,6	0,3	DE	L	R
0,1	0,2	0	0,2	0,3	DE	L	S
0,1	0	0	0,2	0	DE	L	S
0,1	0,2	0	0	0	DE	L	S
0,5	0	0,2	0	0	DE	L	S
0,8	0,4	0,6	0,9	0,7	DE	L	S
0,9	0,6	0,2	0,5	0,2	DE	L	S
0,9	1	1	1	1	DE	L	S
0,7	0,8	0,6	1	1	DE	NL	R
0,6	0,6	0,7	0,6	0,2	DE	L	S
0,6	1	0,7	0,9	0,9	DE	L	S

## CONCLUSIONES

Para todas las variables de cultivo consideradas (sistemas de manejo de suelo y secano/regadío), las fincas tratadas con deltametrina, presentan unos ataques de acariosis significativamente mayores, que las tratadas con otros piretroides o con dimetoato.

En la misma situación anterior, las fincas tratadas con alfacipermetrina o con lambdacihalotrín, presentan ataques de acariosis de intensidad inferior a las tratadas con deltametrina y superior a las tratadas con dimetoato, y en el orden expuesto.

Como se indica en el apartado anterior, en las fincas tratadas con el insecticida clásico en olivar (dimetoato), los ataques de acariosis son inferiores a los observados en las fincas tratadas con piretroides.

Un factor agronómico, el riego, aparece claramente como un factor de gran importancia en el incremento de los ataques de acariosis, del mismo rango que los tratamientos repetidos con deltametrina.

La influencia de la fertilización nitrogenada no ha podido evaluarse puesto que la información de la que se disponía era insuficiente para el conjunto de fincas visitadas, pero posiblemente tenga un papel relevante.

## ABSTRACT

Ruiz Torres M., A. Montiel Bueno. 2006. Relations between piretroids insecticides use and damage by mite *Aceria oleae* (Acarina, Eriophidae) in olive groves of Jaén Province (Spain). *Bol. San. Veg. Plagas*, **32**: 763-771.

In this paper present results of a control in 365 olive tree in 73 lands in Jaén province (Spain), to evaluate if there are relations between piretroids insecticides use and damage level by mite *Aceria oleae* (Acarina, Eriophidae). This work was realized in 2004 and 2005, in olive groves with treatments of deltamethrin, alphacypermethrin, lambdacyhalothrin and dimethoate in three years or more time ago. Moreover, another factors that they can have influence on pest growth, how irrigation o unwatered land, and form of soil



cover (with vegetal cover, with arable practice and with herbicide use), have been studied too.

Irrigation and deltamethrin treatments are variables that they explain almost 60% of cases. When results are ordered by soil management and irrigation and unwatered land practice, there are two unmistakable extremes: in a hand, lands with deltamethrin treatments, with greater values of damage by mite *Aceria oleae*, and another hand, lands with dimethoate treatments, with smaller values. In middle term, lands with alphacypermethrin treatments that are more near to deltamethrin ones, and lands with lambda-cyhalothrin treatments with values of presence of mite damage more near to dimethoate ones.

Soil management (with vegetal cover, with arable practice and with herbicide treatments) is not important for presence of *Aceria oleae* damage.

It's possible that nitrogenous fertilization has important influence in presence of mite damage.

**Key words:** impact, deltamethrin, alphacypermethrin, lambda-cyhalothrin.

#### REFERENCIAS

- ALVARADO, M., CIVANTOS, M. y J. M. DURAN. 2004. Plagas, en el El Cultivo del Olivo. Editores Científicos: D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo. Editorial Mundi-Prensa, pp 483-556.
- ESPINHA, I. G., F. FERRAGUT, J. A. PEREIRA y L. M. TORRES. 1998. Ácaros fitoseidos (*Acari: Phytoseiidae*) del cultivo de manzano en el nordeste de Portugal. *Bol. San. Veg. Plagas*, **24**: 383-390.
- FERRÁN ARANAZ, M. 1996. SPSS para Windows. Programación y análisis estadístico. McGraw-Hill. Madrid.
- GONZÁLEZ, M. I., M. ALVARADO, J. M. DURÁN, A. DE LA ROSA y A. SERRANO. 1999. Los eriófidos (*Acarina, Eriophidae*) del olivar de la provincia de Sevilla. Problemática y control. Actas Congreso Nacional de Entomología Aplicada. VII Jornadas Científicas de la S.E.E.A., pag.158.
- MUELLER-BEILSCHMIDT, D. 1990. Toxicology and environmental fate of synthetic pyrethroids. *Journal of Pesticide Reform*, Vol. **10** (3): 32-37.
- PAPAIANOOU-SOULIOTIS, P. y D. MARKOYIANNAKI-PRINTZIOU. 2003. Notes on the biology of the Eriophyids and damage caused in olive groves. En 1<sup>o</sup> European Meeting of the IOBC/WPRS Study Group "Integrated Control in Olives". Abstracts., pag. 62.
- SATO, M. E., A. RAGA, L. C. CERAVOLO, M. F. DE SOUZA, A. C. ROSSI y G. J. DE MORAES. 2001. Effect of insecticides and fungicides on the interaction between members of the mite families Phytoseiidae and Stigmaeidae on Citrus. *Experimental and Applied Acarology*, Vol. **25** (10-11): 809-818.
- VILLARONGA, P. y F. GARCÍA-MARÍ. 1988. Los ácaros tetraníquidos y sus enemigos naturales del cultivo del avellano en Cataluña. *Bol. San. Veg. Plagas*, **14**: 39-44.
- ZACHARDA, M. 2001. Predatory phytoseiid mites (*Acari: Phytoseiidae*) as bioindicators of stress impact on a farmland and butresses of the farmland revival. *Ekologia (Bratislava)*, Vol. **20** (1): 47-56.

(Recepción: 23 junio 2006)

(Aceptación: 1 agosto 2006)



# RECENSIÓN DE PUBLICACIONES

## **ENCICLOPEDIA ILUSTRADA DE LOS CACTUS Y OTRAS SUCULENTAS. VOLUMEN I**

**(Descripción de las especies, hábitat y cuidados de cultivo)**

A.Gómez Sánchez

Ediciones Mundi-Prensa. Mayo, 2002. ISBN: 84-8476-011-1

Hasta ahora, los aficionados a las plantas suculentas tenían que recurrir a guías de identificación y cultivo extranjeras, traducidas, y que no siempre, más bien nunca, proporcionaban información útil para el cultivo de estas singulares plantas en los jardines de nuestro territorio. Aquí reside la originalidad e interés de esta enciclopedia, casi todas las plantas que se recogen en ella han sido cultivadas por el autor y su experiencia se demuestra en ella.

Los aficionados encontrarán en esta obra una imprescindible herramienta de identificación, los que no lo son aún descubrirán un mundo inesperado, donde las flores y las espinas se combinan para exprimir lo que es al final la esencia de nuestra propia vida.

## **ENCICLOPEDIA ILUSTRADA DE LOS CACTUS Y OTRAS SUCULENTAS**

**(Descripción de las especies, hábitat y cuidados de cultivo)**

**Volumen II**

A. Gómez Sánchez

Ediciones Mundi-Prensa. Mayo, 2006. ISBN: 84-8476-278-5

Este Volumen II, igual que el primero, va dirigido a toda persona amante de las plantas y sus flores, y es imprescindible junto al primero, para los aficionados a los cactus y demás suculentas, y aun para los profesionales del sector que pretendan conocer el nombre y las características de lo que siembran y venden siendo un valioso auxiliar cuando se dude sobre el compuesto a emplear, riegos, exposición, etc., referidos a una determinada especie.

## **MANUAL TÉCNICO DE JARDINERÍA**

F. Gil-Albert

**I. Establecimiento de jardines, parques y espacios verdes.** 2ª ed. revisada y ampliada

Ediciones Mundi-Prensa 2006. ISBN: 84-8476-291-2.

El primer volumen del “Manual técnico de jardinería” trata de la primera fase que todo profesional debe abordar en el “Establecimiento de jardines, parques y espacios verdes”. Con ella se pretende conseguir una guía obligada para el jardinero profesional.

El texto pretende fundamentalmente poner de manifiesto y abordar en profundidad la tecnología que hoy se aplica en la jardinería moderna y su gran complejidad, en la que el antiguo concepto de “jardinero” no tiene cabida, ya que resultan imprescindibles cualificaciones técnicas del más alto nivel para poder crear y mantener espacios de este tipo con las suficientes garantías.

En la elaboración del libro se ha puesto de manifiesto también que aunque existe una amplia bibliografía sobre diseño y proyecto de jardines así como sobre plantas ornamentales y composiciones vegetales, hay muy poca documentación sobre las técnicas agronómicas modernas que se aplican en el sector. Se pretende que este Manual llene el vacío existente sobre el tema.

## **II. Mantenimiento**

Ediciones Mundi-Prensa 2005. ISBN: 84-8476-243-2.

### **PLAGAS Y ENFERMEDADES DE JARDINES**

2ª ed. revisada y ampliada

S. Villalva

Ediciones Mundi-Prensa 2005. ISBN: 8484761789.

Aporta numerosas imágenes e ilustraciones que ayudan a identificar la mayor parte de los problemas que sufren las plantas en nuestros jardines y cubre el gran vacío existente en la sanidad de las plantas en estos espacios, independientemente de la bibliografía existente para los terrenos agrícola y forestal.

### **LAS PODAS DE LAS ESPECIES ARBUSTIVAS ORNAMENTALES**

2ª edición revisada y ampliada

F. Gil-Albert Velarde

Ediciones Mundi-Prensa 2006. ISBN: 8476-133-9

Las podas son absolutamente necesarias en determinados momentos de la vida de los arbustos ornamentales, y exigen el conocimiento de la técnica que debe aplicarse en cada caso.

Este libro pretende poner al alcance de todos los profesionales y aficionados a la ciencia de la jardinería las bases y conceptos necesarios para poder realizar siempre la poda correcta, alejándose de lo que simplemente son “costumbres”, y utilizando los fundamentos biológicos y agronómicos que constituyen hoy las bases reales de la práctica de la poda.

### **LAS PODAS DE LAS ESPECIES ARBÓREAS ORNAMENTALES**

F. Gil-Albert Velarde

Ediciones Mundi-Prensa 2001. ISBN: 8476-002-2.

Prólogo. Introducción. Útiles y equipos de poda. Operaciones complementarias de poda. Podas de formación. Las formas de los árboles. Podas normales de mantenimiento. Podas de las coníferas. Las podas de renovación. Podas especiales. Podas de recorte en especies arbóreas. Podas arquitectónicas. Podas en “cabeza de mimbrera”. Cirugía arbórea. Bibliografía. Índice de fotografías. Índice de láminas.







## SUMARIO DEL VOL. 32 (4.2)

### ENTOMOLOGÍA

- L. SAZO, J. E. ARAYA, P. ITURRIAGA. Efecto del tipo de polen sobre la supervivencia, fertilidad y viabilidad de los huevos de *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae) en laboratorio ..... 619
- M. GARCÍA-MARTÍN, T. CABELLO, A. TORRES-RUIZ, M. GÁMEZ. Competencia intraespecífica en la respuesta de parasitación de *Chelonus oculator* Panzer (Hymenoptera: Braconidae) ..... 625
- M. M. MARTÍN, T. CABELLO. Manejo de la cría del picudo rojo de la palmera, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera, Dryophthoridae), en dieta artificial y efectos en su biometría y biología ..... 631
- S. A. DE BORTOLI. Comunicação. Aspectos biológicos de *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae) em dois genótipos de couve ..... 643
- S. A. DE BORTOLI, M. C. FERNANDES, N. M. M. S. DE ALBERGARIA, H. O. S. DÓRIA. Aspectos biológicos de *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae) em relação ao estado nutricional de *Brassica oleracea* L. var. *acephala* ..... 647
- P. TURIENZO. Larval galleries and pupal chambers of *Huequenía livida* (Germain, 1898) (Coleoptera: Cerambycidae) ..... 655

### PATOLOGÍA

- D. PALMERO, C. IGLESIAS, L. VARÉS, J. SINOBAS (†). Determinación de la capacidad parasitaria de la Microbiota fúngica y de sus extractos acuosos en las semillas del cardo (*Cynara cardunculus* L.) ..... 659
- R. E. MARTÍNEZ-RESTOY, F. DIÁNEZ, M. SANTOS, M. DE CARA, J. FERRÁNDIZ HERNÁNDEZ, J. C. TELLO. Microbiota fúngica asociada a las podredumbres radiculares del puerro cultivado en Villena ..... 673
- R. M<sup>a</sup> NAVARRO CERRILLO, A. I. TERÁN BOCERO, M. E. SÁNCHEZ. Acción preventiva y curativa del fosfonato en el control de *Phytophthora cinnamomi* Rands en encina y alcornoque ..... 685
- R. BELTRÁN, J. ARMENGOL, J. GARCÍA-JIMÉNEZ. Estudio de patogenicidad a melón de hongos del suelo causantes de colapso ..... 695
- N. GONZÁLEZ, E. VARGAS-OSUNA, A. TRAPERO. El Escudete de la aceituna I: Biología y daños en olivares de la provincia de Sevilla ..... 709
- N. GONZÁLEZ, A. TRAPERO. El Escudete de la aceituna II: Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica del agente causal ..... 723

### TERAPÉUTICA

- M. A FARFÁN, J. C. GUERRERO, J. OLIVERO, J. IZQUIERDO, J. M. VARGAS. Efecto sobre la entomofauna del olivar del tratamiento-cebo con Imidacloprid 20 LS para el control de *Bactrocera oleae* (Gmel.) (Diptera: Tephritidae), Mosca del Olivo ..... 739
- G. MAREGGIANI, A. GARAU. Herbivoría diferencial frente al lepidóptero especialista *Phocides polybius phanias* (Hesperiidae) ..... 757

### OTROS TEMAS

- M. RUIZ TORRES, A. MONTIEL BUENO. Incidencia del empleo de insecticidas piretroides sobre la presencia de acariosis (Acarina, Eriophidae) en olivares de la provincia de Jaén ..... 763
- RECENSIÓN DE PUBLICACIONES ..... 773



MINISTERIO  
DE AGRICULTURA, PESCA  
Y ALIMENTACIÓN