

# Evaluación de la eficiencia de productos biológicos basados en parasitoides del género *Trichogramma* spp. en el control de *Cydalima perspectalis* en bojedaes naturales de Navarra

Santesteban Insausti, Xabier<sup>2</sup>; Marco Glaria, Iosu<sup>1</sup>; López Casado, Lorea<sup>1</sup>; Murillo Pérez, Rosa<sup>1</sup>; Ruiz de Escudero Fuentemilla, Iñigo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Bioinsecticidas Microbianos. Grupo de Investigación de Protección de Cultivos. Universidad Pública de Navarra.

<sup>2</sup> Grupo de Sanidad Forestal del Área de Gestión Forestal y Proyectos. Gestión Ambiental de Navarra. S.A. (GAN-NIK)

## Resumen

La oruga del boj *Cydalima perspectalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) es considerada una de las mayores amenazas mundiales para el boj. Las larvas de esta mariposa, que se alimenta de hojas del boj causan defoliación total y muerte de la parte aérea de la planta. Actualmente no existen métodos autorizados suficientes que permitan controlar los daños severos y la expansión de la especie, así como métodos de control biológico eficaces, por lo que es necesario investigar para su posible desarrollo.

En este trabajo se han llevado a cabo ensayos en parcelas experimentales para testar la eficiencia de parasitoides del género *Trichogramma* spp. sobre bojes en medio forestal, comprobando que, aunque se produce cierta parasitación, resulta claramente insuficiente para reducir los daños o controlar la población de *Cydalima perspectalis*.

**Palabras clave:** *Cydalima perspectalis*, DPHNPE, identificación, biología, daño, *Trichogramma* spp., control biológico, parasitoide.

## Introducción

La oruga del boj (*Cydalima perspectalis* Walker 1859) es originaria del este de Asia (Inoue et al., 1982). Su presencia se detectó por primera vez en Europa en 2007, en el suroeste de Alemania (Krüger, 2008). Desde entonces se extendió rápidamente a numerosos países europeos, hasta invadir la práctica totalidad del continente. Se tiene constancia de su presencia en España desde al menos 2013 (citado oficialmente en Galicia por Otero et al., 2014).

La distribución y las preferencias de hábitat de la polilla del boj están fuertemente relacionadas con la de su huésped, *Buxus* spp., donde *Buxus sempervirens* es muy abundante en Europa y especialmente en Francia y España.

Las larvas se alimentan de las hojas, defoliando totalmente las plantas y en algunos casos, llegan a alimentarse de la corteza y partes más leñosas, causando la desecación de la parte aérea. En caso de ataques repetidos en diferentes años, la planta (con gran capacidad inicial de rebrote), llega a agotar sus reservas, dejando de rebrotar.

El presente trabajo se realiza mediante una colaboración entre el grupo de Protección de Cultivos de la Universidad Pública de Navarra (UPNA) y la empresa pública GAN-NIK (Gestión Ambiental de Navarra). Además, han participado dos estudiantes del Grado de Ingeniería Agronómica y del Medio Rural (UPNA) en el contexto de la realización de sus Trabajos de Fin de Grado.

## Material y métodos

### Selección de los parasitoides a ensayar

Los parasitoides se obtuvieron del producto Tricholine Buxus® basado en parasitoides del género *Trichogramma* spp. (Hymenoptera; Chalcidoidea), que contenía una mezcla de las especies *Trichogramma cacoecidae* y *Trichogramma cordubensis*. El producto se comercializa por la empresa Bioline Iberia y se distribuye por Fitoaragon SL. El interés de la valoración de este producto se ha basado en experiencias anteriores desarrolladas en Francia (Lorca, M. com pers) y Cataluña (Senmartí & Las Heras, 2021).

### Localización de los ensayos

La selección de los lugares de ensayo se realizó en base a trabajos de monitorización de la plaga sobre masas naturales de *Buxus sempervirens* realizados por el Gobierno de Navarra y GAN-NIK para el seguimiento de la especie (2017-2019), determinando los valles, localidades y el grado de afección por *C. perspectalis*.

De esta manera, se seleccionaron 6 ubicaciones distribuidas en dos regiones climáticas diferentes (Zona Atlántico-Pirenaica y Zona Media) y que, a su vez, mostraban 2 niveles distintos de infestación (bajo y medio-alto). En la primera zona, en el Valle de Esteribar, de clima más templado y húmedo, se seleccionaron las localidades de Leranotz, Usetxi e Iragi, mientras en la segunda zona, en el entorno del Valle de Ibargoiti y Unciti, de clima marcadamente más mediterráneo, se seleccionaron Cemborain e Idocin. Finalmente, debido al rápido avance de la plaga en Leranotz que defolió el bojedal en primavera, se descartó la localización para el estudio, quedando 5 ubicaciones disponibles.

A)



B)



Figura 1. Distribución de las parcelas experimentales en las localidades de Idocin, Cemborain e Iragi (A) y detalle de la disposición de las parcelas dentro de cada ubicación en Usetxi (B).

### **Descripción de las parcelas experimentales**

En cada ubicación, se establecieron 9 parcelas experimentales de forma cuadrada (10 x 10 m) y una separación entre ellas de 10-15 m (Figura 1). La distribución de parcelas se realizó mediante una malla de 3 x 3, adaptándose a las irregularidades del terreno en caso de dificultad para lograr dicha forma.

### **Tratamiento y metodología de suelta de parasitoides**

En cada ubicación se realizaron tres tratamientos con tres tipos de aplicaciones respecto a los parasitoides y 3 repeticiones en cada caso. Los tratamientos fueron: a) suelta de parasitoides en la primera generación (T1) del año de *C. perspectalis* (primavera), b) suelta de parasitoides en la primera y segunda generación (T2) del año de *Cydalima perspectalis* y c) parcelas control sin suelta de parasitoides (T0). La distribución de las parcelas T1, T2 y T0 se realizó según altitud, orientación y densidad o tamaño del boj.

Cada tratamiento se realizó cuando la curva de vuelo indicó la llegada del grueso de cada generación y se realizó mediante la colocación de 10 tarjetas difusoras de *Trichogramma spp.* por cada 100 m<sup>2</sup> de parcela distribuidas homogéneamente. La suelta se llevó a cabo colgando las "tarjetas" sobre ramas del boj (Figura 2), en ramas intermedias, internas, protegidas del sol y viento. Cada tarjeta poseía aproximadamente 5.000 pupas de *Trichogramma* para lograr una intensidad de 500 ejemplares/m<sup>2</sup> de boj. El tratamiento incluyó una repetición de la aplicación a las 2 ó 3 semanas, con el fin de abarcar la mayoría del periodo de puestas de cada generación de *C. perspectalis*, tal y como indicaba el proveedor.



Figura 2. Tarjetas de Tricholine Buxus (Bioline AgroSciences Iberia).

### **Evaluación del grado de defoliación de los bojedaes**

En cada ubicación, se realizó una evaluación periódica del nivel de defoliación del boj según metodología ICP-Forest, para poder relacionarlo con los resultados del establecimiento de parasitoides y con la dinámica poblacional de *C. perspectalis* (Figura 3).



Figura 3. Evolución del grado de defoliación en la parcela de Usetxi 2 entre mayo (izda.) y agosto (dcha.).

## Curva de vuelo de *Cydalima perspectalis*

Previo al inicio del ensayo, en las inmediaciones de cada ubicación se colocó una trampa tipo Funnel con feromonas y seguimiento semanal, de forma que se pudiera conocer la evolución de la abundancia de adultos a lo largo del año. Esto se hizo en base a las recomendaciones de actuación sobre puestas de 1ª y 2ª generación, que para este producto se han determinado en estudios anteriores (Las Heras et al, 2019).

Las ubicaciones seleccionadas se sitúan en dos zonas (Tabla 1), una más húmeda y fría en el Valle de Esteribar (Iragui, Leranotz y Usetxi) y otra más mediterránea (Cemborain e Idocin). Además, se encontraban en diferentes momentos de afección por la plaga, ya que Iragi, Usetxi e Idocin eran frente de plaga sin apenas daños, mientras que Leranotz y Cemborain sufrían defoliaciones más intensas.

Tabla 1. Localización y descripción del seguimiento de vuelos de *C. perspectalis* en diferentes bojedales de Navarra durante 2020. Fuente: GAN-NIK.

| Localización                                      | Iragi                     | Usetxi                      | Leranotz                 | Cemborain                | Idocin                    |
|---|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Municipio   | Esteribar                 | Esteribar                   | Esteribar                | Unciti                   | Ibargoiti                 |
| Fecha de colocación                               | 11/05/2020                | 11/05/2020                  | 11/05/2020               | 11/05/2020               | 11/05/2020                |
| Fecha de retirada                                 | 30/10/2020                | 30/10/2020                  | 30/10/2020               | 30/10/2020               | 30/10/2020                |
| Coordenada X                                      | 618643                    | 619619                      | 620544                   | 620379                   | 625004                    |
| Coordenada Y                                      | 4758000                   | 4755813                     | 4755429                  | 4732547                  | 4727668                   |
| Altitud (m)                                       | 765                       | 630                         | 579                      | 700                      | 619                       |
| Estado de la plaga /<br>% Defoliación (mayo 2020) | Incipiente<br>(<5% defol) | Incipiente<br>(5-30% defol) | Moderado<br>(>50% defol) | Moderado<br>(>30% defol) | Incipiente<br>(<5% defol) |

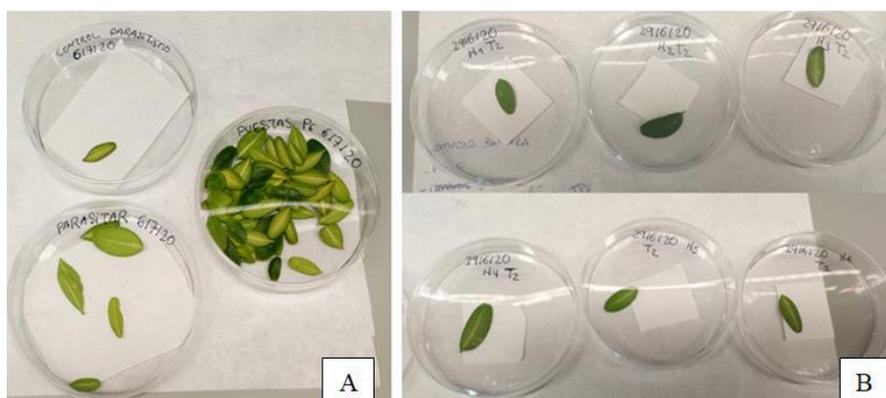
## Determinación de parasitismo

**Parasitismo en campo:** Para evaluar la eficiencia de parasitismo se realizó el seguimiento “*in situ*” por observación de puestas de huevos de *C. perspectalis* en las áreas de suelta en las fechas indicadas, tras el vuelo de adultos de primera y segunda generación.

**Parasitismo en laboratorio:** Para evaluar la eficiencia de parasitación de *Trichogramma spp.* sobre *C. perspectalis* en condiciones de laboratorio, se realizaron bioensayos de parasitismo *in vitro* en condiciones controladas de laboratorio.

Larvas de últimos estadios y pupas recogidas en campo se evolucionaron en laboratorio hasta adultos alimentándolas con hojas de boj natural recogido en las ubicaciones de estudio. Con este material, se estableció una población en cría artificial de *C. perspectalis* en laboratorio. La recogida de material de campo se realizó tanto en la primera (mayo-junio) como segunda generación (agosto-septiembre) de 2020.

Figura 4. Método de parasitación: placas con puestas seleccionadas de *C. perspectalis* para ser expuestas al parasitoide (A) y hojas individualizadas (B). Fuente: Lorea López (UPNA)



A partir de la línea de *C. perspectalis* mantenida en laboratorio se seleccionaron puestas de huevos de 0 a 72 horas de edad con buena apariencia y abundante número de huevos. Las puestas seleccionadas se separaron del resto a una placa Petri y se expusieron a hembras de *Trichogramma spp.* para su parasitación durante un periodo de 24-72 h, tras el cual se mantuvieron en observación (Figura 4). Durante 15 días se registraron los signos de la evolución del huésped o del parásito. La sintomatología del huevo parasitado es muy clara por el color oscuro que adquiere a los pocos días de ser parasitado (Figura 5).



Figura 5. Huevos de *C. perspectalis* de tonalidad clara siendo parasitados por hembras de *Trichogramma spp.* (izda.) y huevos parasitados con tonalidad oscura (dcha.).

### Movilidad de *Trichogramma spp.* en campo

La movilidad del parasitoide se observó *in situ*, durante las visitas a las parcelas, realizando observaciones para comprobar los movimientos de *Trichogramma spp.* en la propia planta, en parcelas control y/o en distancias mayores.

### Establecimiento de *Trichogramma spp.* en el medio natural

El establecimiento de los parasitoides en la masa forestal sería una característica muy deseable, que permitiría mejorar el control de la plaga. Para su determinación, se estudió la posible presencia de parasitoides en la segunda y tercera generación de *C. perspectalis* sobre las parcelas T1 en las que sólo se hizo suelta en la primera generación.

## Resultados

### Curva de vuelo de *Cydalima perspectalis*

Al representar gráficamente los datos de capturas obtenidos en las revisiones semanales de las trampas durante todo el periodo de actividad de la plaga, desde inicios de mayo hasta finales de octubre de 2020, se obtuvieron las curvas de vuelo donde se observa una gran variabilidad en la dinámica de la plaga según distintas ubicaciones y momentos (Figura 6). En el pico correspondiente a la primera generación, las ubicaciones con más capturas fueron Cemborain y Usetxi con valores que rondaron los 1000 individuos por trampa a la semana, mientras que otras ubicaciones, como Iragi o Idocin mostraron valores mucho más bajos. En segunda generación se detectaron picos más abundantes en las localidades de Iragi y Usetxi.

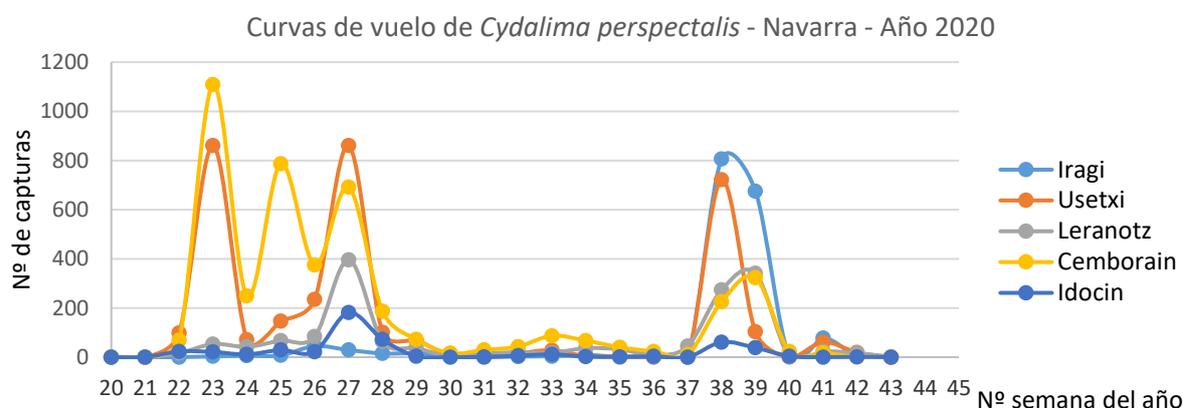


Figura 6. Curvas de vuelo de *Cydalima perspectalis* en diferentes localizaciones de Navarra durante 2020. Fuente: GAN-NIK

### Evaluación del grado de defoliación de los bojedaes

En los bojedaes de las parcelas experimentales se llevó a cabo el seguimiento del nivel de defoliación de forma periódica. Debido a que no se observaron diferencias del grado de defoliación entre las parcelas T0, T1 y T2 de cada ubicación, los valores se presentan por ubicación. Las ubicaciones de Leranotz, Cemborain y Usetxi 2 sufrieron defoliaciones del 100 % (Figura 7), quedando los bojedaes totalmente arrasados, mientras que las parcelas Usetxi 1, Iragi e Idocin sufrieron daños menores al 20 %.

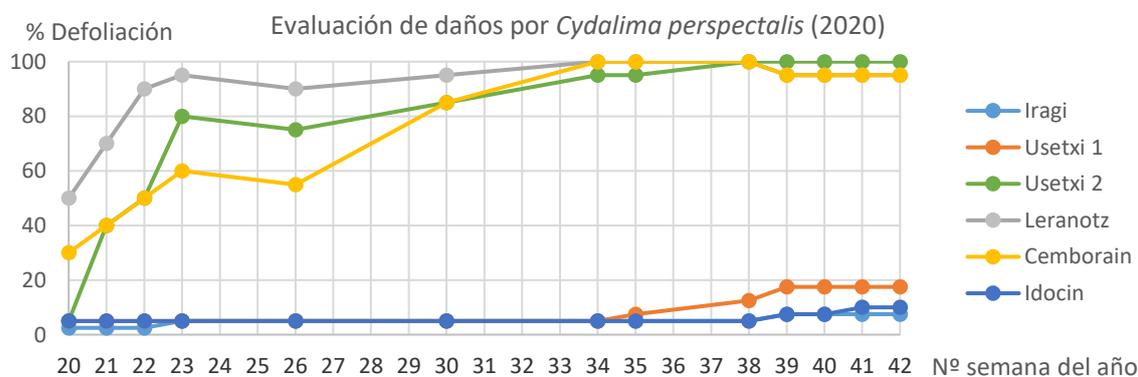


Figura 7. Evaluación del nivel de defoliación de bojedaes en el entorno de las trampas de feromonas de *Cydalima perspectalis* ubicadas en diferentes localizaciones de Navarra durante 2020. Fuente: GAN-NIK

## Tratamientos y determinación de parasitismo

**Parasitismo en campo** El número total de puestas identificadas y marcadas para estudiar su evolución fue de 483, lo que equivale en una primera aproximación, a la observación de 5.000-10.000 huevos de *C. perspectalis*. Del total de puestas marcadas y con seguimiento, 275 pertenecían a parcelas con tratamiento, en 91 de estas puestas, al menos uno de sus huevos fue parasitado, con un valor medio de parasitación (por parcela con tratamiento) por *Trichogramma spp.* de  $27,1 \pm 15,4$  %. Los valores de parasitación media en las parcelas presentaron grandes oscilaciones entre ubicaciones y fechas (Tabla 2). Debido a la evolución de la plaga no siempre se encontraron puestas para su seguimiento en cada ubicación.

Tabla 2. Nº de puestas de *C. perspectalis* evaluadas para seguimiento de parasitismo por generación (1ªG y 2ªG) y la media de parasitación estimada por ubicación. Fuente: Iosu Marco (UPNA). \*G: Generación

| Ubicación | Media de puestas por parcela | Semana de tratamiento en 1ªG* | Nº puestas evaluadas en 1ª G | Semana de tratamiento en 2ª G | Nº puestas evaluadas en 2ª G | Media % parasitación |
|-----------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------------|
| Iragi     | 21                           | 23, 27                        | 0                            | 35, 38                        | 168                          | $33,7 \pm 24,8$ %    |
| Usetxi 1  | 0                            | 23, 27                        | 0                            | 35, 38                        | 0                            | -                    |
| Usetxi 2  | 24                           | 23, 27                        | 126                          | 35, 38                        | 0                            | $19,0 \pm 12,6$ %    |
| Cemborain | 21                           | 23, 26                        | 189                          | 35, 38                        | 0                            | $41,4 \pm 4,8$ %     |
| Idocin    | 0                            | 23, 26                        | 0                            | 35, 38                        | 0                            | -                    |
| Total     | -                            | -                             | 315                          |                               | 168                          |                      |

Sorprendentemente tanto en Usetxi 2 como en Cemborain se detectaron parcelas control con 1 y 3 puestas parasitadas, por lo que los parasitoides debieron desplazarse desde alguna de las parcelas tratadas. Aunque fueron casos puntuales, esto indicaría que existe una cierta capacidad de dispersión de los parasitoides fuera del rango de actuación ensayado en este trabajo.

**Parasitismo en laboratorio.** En condiciones de laboratorio el porcentaje de parasitismo de *Trichogramma spp.* alcanzó un valor medio de  $25,8 \pm 5,4$  %. A lo largo de 14 repeticiones del experimento los niveles oscilaron entre el 15,7 % y el 44,0 %.



Figura 8. Hembras emergidas y orificios de salida sobre huevos parasitados (izquierda) y detalle de una hembra de *Trichogramma spp.* (derecha). Fuente: Lorea López (UPNA)

### ***Movilidad de Trichogramma spp. en campo***

Debido al reducido tamaño de *Trichogramma* (<1mm), su capacidad de vuelo es muy limitada y se desplazan principalmente caminando o dando saltos, por lo que su capacidad de movimiento se considera que es reducida.

Mediante observaciones *in situ* en las parcelas experimentales, se confirmó la movilidad de hembras caminando por las hojas del boj, para alcanzar las puestas de *C. perspectalis* (Figura 9).

De la misma manera, se confirma que *Trichogramma spp.* ha sido capaz de desplazarse distancias superiores a 10-15m, al detectarse parasitismo en puestas de las parcelas del tratamiento control (T0).



Figura 9. *Trichogramma spp.* cerca de una puesta en el campo. Fuente: Iosu Marco (UPNA).

### ***Establecimiento de Trichogramma spp. en el medio natural***

Durante el tratamiento de segunda generación únicamente se encontraron puestas para seguir su evolución en la ubicación de Iragi. En esta ocasión se evaluaron las parcelas que habían sido tratadas en primera generación (T1), así como las que habían recibido tratamientos en ambas generaciones (T2). En el primer caso no se encontró parasitación alguna en ellas. Esto sugiere que *Trichogramma spp.* no fue capaz de establecerse y sobrevivir entre generaciones de *C. perspectalis*, lo que puede tener su explicación en la falta de sincronización entre los ciclos de vida de huésped y parasitoide.

## **Discusión**

Las avispijillas del género *Trichogramma spp.* obtenidas de Tricoline Buxus® son capaces de parasitar puestas de *C. perspectalis* sobre bojes en el medio forestal. Sin embargo, no se han observado valores medios de parasitación suficientemente elevados como para limitar los daños que produce la plaga. Los trabajos aquí descritos presentan valores de parasitación similares a los obtenidos en otros estudios llevados a cabo en el ámbito forestal (Las Heras & Senmarti, 2021) donde se registraron valores del 20-30 % de parasitación, en contraposición con un estudio realizado en Francia sobre montes con presencia de *C. perspectalis* que indicaba que las sueltas de *Trichogramma* reducían la presencia de orugas hasta en un 48 % (Baubet, 2017), aunque dada la presión de la plaga, la defoliación seguía siendo total.

Respecto al ensayo, Cemborain y Usetxi 2 fueron las dos únicas ubicaciones en las que se detectaron puestas de *C. perspectalis* para el seguimiento del parasitismo en la primera generación. Sin embargo, no se detectaron puestas en la segunda generación, ya que ambas localidades fueron defoliadas por completo (con un rápido avance de la plaga). En la segunda generación se obtuvieron datos de parasitación únicamente para la parcela de Iragi, por lo que, sólo en Iragi se pudo comparar los valores de parasitación entre parcelas que habían sido tratadas en primera y segunda generación frente a las tratadas sólo en la primera, lo que determinó que no hubo establecimiento del parasitoide en el medio. No obstante, no se pudo realizar una comparación entre generaciones para una misma ubicación.



En Usetxi 1 e Idocin, no se detectaron puestas, aunque se recogieron adultos en las trampas de *C. perspectalis*, probablemente debido a que el nivel de incidencia era demasiado bajo y el avance de la especie a lo largo del año es impredecible. Esto demuestra la dificultad a la hora trabajar con esta especie o detectar puestas, especialmente, cuando el nivel de presencia de *C. perspectalis* es muy bajo.

Por lo tanto, en línea con otros estudios, se refuerza la idea de que las sueltas de parasitoides en ambientes forestales son insuficientes para el control de daños causados por *C. perspectalis* (Senmartí y Las Heras, 2021), debido a la reducida capacidad de los parasitoides y al solapamiento entre fases de la plaga (...). Estos métodos no han conseguido controlar la plaga sobre boj natural, ni siquiera han reducido la presión que ejercían las larvas y la intensidad de daños, lo que supone un dato importante a la hora de abordar la complejidad que se presenta en el ámbito forestal.

## Conclusiones

- *Trichogramma spp.* es capaz de parasitar puestas de *C. perspectalis* con cierto éxito en boj natural, en las condiciones forestales del centro y norte de Navarra, con un valor medio  $27,1 \pm 15,4$  %.
- La densidad de *Trichogramma spp.* introducidas en cada parcela (500 individuos/m<sup>2</sup>) no ofrece un control suficiente de la población de *C. perspectalis* y no reduce la presión de la plaga suficientemente para evitar graves daños en el boj natural.
- Las hembras de *Trichogramma spp.* son capaces de caminar y desplazarse por las plantas de boj y de dispersarse distancias de entre 15-20 m, localizando y parasitando puestas de *C. perspectalis*.
- Es necesario un seguimiento riguroso de la población de *C. perspectalis* para determinar el momento del tratamiento con *Trichogramma spp.*, siendo recomendable la combinación del uso de curvas de vuelo y observaciones en campo, para determinar la fecha adecuada de suelta.
- El porcentaje medio de parasitación de *Trichogramma spp.* obtenido en bioensayos de laboratorio fue del  $25,8 \pm 5,4$  %, un valor similar al conseguido en el campo.
- Las hembras de *Trichogramma spp.* obtenidas en laboratorio descendientes de las hembras de la tarjeta comercial presentan una capacidad de parasitación similar a la de sus progenitoras. Esta circunstancia podría favorecer el establecimiento de la población del parasitoide en el medio natural, pero la falta de sincronización de *Trichogramma spp.* con el ciclo biológico de *Cydalima*, limita su capacidad como método de control biológico contra *C. perspectalis*, ya que, en ausencia de otras especies alternativas, no logra asentarse en el medio.



## Bibliografía

Babuet, O. (2017). *Résultats des tests utilisant des Trichogrammes dans la régulation des populations invasives de la pyrale du buis en forêt*. Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt. Prefet de la Region Auvergne-Rhone-Alpes. [Link](#)

Las Heras, S., Arimany, M., Artola, J., & Bassols, E. (2019). *Desarrollo de métodos para una gestión integrada de la polilla del boj (Cydalima perspectalis) (Lepidoptera: Crambidae) en parques, jardines y espacios verdes*. Phytoma - España: 308, 56–63.

López, L. (2021). *Evaluación de la eficiencia de un producto biológico basado en el parasitoide del género Trichogramma spp. en el control de poblaciones de Cydalima perspectalis en condiciones de laboratorio*. Universidad Pública de Navarra.

Marco, I. (2021). *Evaluación de la eficiencia en el control de Cydalima perspectalis de los parasitoides del genero Trichogramma spp. en bojedales de navarra*. Universidad Pública de Navarra

Senmartí J., Las Heras S. (2021). *Evaluación de las posibilidades de las herramientas de control para la polilla del boj Cydalima perspectalis (Lepidoptera: Crambidae) en un ámbito forestal*. Phytoma. 325:xx-xx

## Autores

Este trabajo se ha realizado en colaboración con los profesores de la Universidad Pública de Navarra, Rosa Murillo e Iñigo Ruiz de Escudero, del Laboratorio de Bioinsecticidas Microbianos del Grupo de Investigación de Protección de Cultivos con la participación de los estudiantes de Trabajo Final de Grado Iosu Marco y Lorea López.