Informe final del proyecto “Aplicación de trampas infectivas para el control de *Rhynchophorus ferrugineus* a escala de campo”.

Antecedentes:

Ante los resultados obtenidos al ensayar en 2014 trampas infectivas para el control de *Rhynchophorus ferrugineus* dentro del proyecto europeo PALM PROTECT, se han realizado en las Islas Baleares 2 ensayos para valorar la eficacia de este método. Los ensayos se han realizado en las islas de Eivissa en dos parcelas de 12 ha y en Mallorca en dos parcelas de 1 km^2 (100 ha).

En este informe se muestran los resultados de cada uno de los ensayos por separado porque se han utilizado metodologías distintas. Finalmente se dan unas conclusiones al trabajo realizado y se plantea la posibilidad de repetir los ensayos el próximo año.

IBIZA

El ensayo de Ibiza se ha realizado en dos parcelas situadas en la finca Can Marines del Consell Insular de Eivissa y en las parcela de Sa Coma. En cada una de estas parcelas se colocaron entre el 8 y el 11 de mayo 12 trampas que contenían un tubo infectivo con el hongo entomopatógeno según la Figura 1 (Can Marines) y 2 (Sa Coma):

Figura 1. Distribución de las trampas en Can Marines:

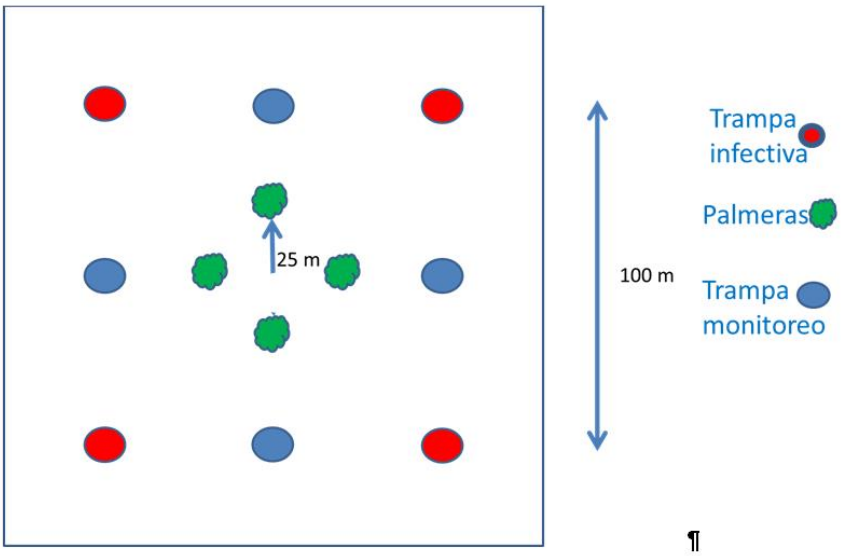
Figura 2. Distribución de las trampas infectivas en Sa Coma:

Cada punto central de las tramas de 100 metros dibujadas en las figuras 1 y 2 representa la colocación de una trampa infectiva. Estas trampas han permanecido en campo desde el inicio del ensayo hasta su fin. Los tubos infectivos se han renovado tres veces: la primera

renovación se realizó entre el 26 de junio (6 trampas de cada localización) y el 13 de julio (las 6 trampas restantes de cada localización). La segunda y tercera renovación se realizó sobre la totalidad de las trampas el 24 de agosto y el 2 de noviembre respectivamente. Estas renovaciones se realizaron para mantener la viabilidad del hongo entomopatógeno a un nivel adecuado.

En el centro de cada parcela se colocaron 4 trampas Picusan para el seguimiento de la población, cebadas con emisor de ferrugineol de 1 g y una pastilla de vapona. En el centro de cada cuadrícula se colocaron 4 palmeras en los vértices de un rombo imaginario de forma que los vértices estarán a 25 m del punto central según La figura 3.

Figura 3. Detalle de la zona central de la cuadrícula



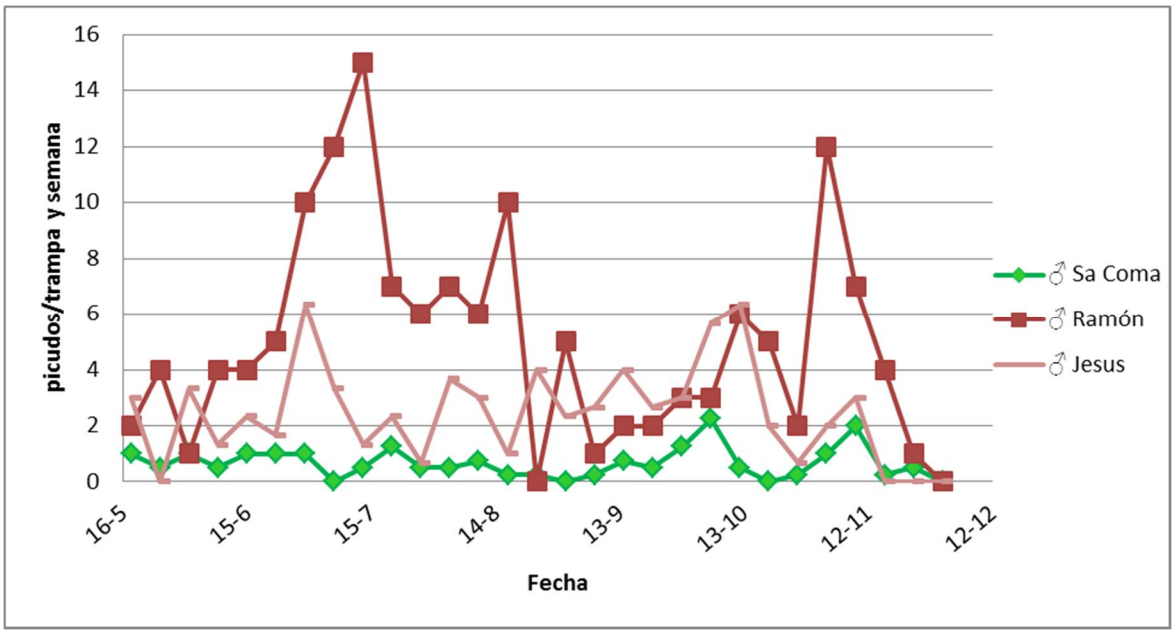
¶

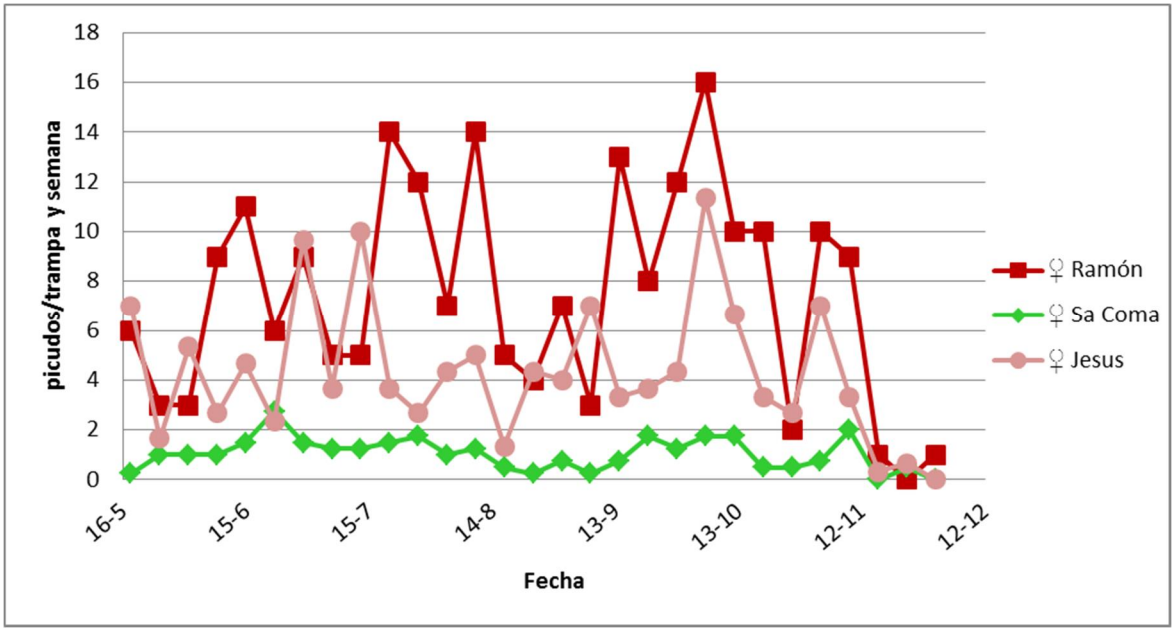
Además de estas dos parcelas donde se ha realizado el tratamiento con el hongo infectivo se tomó una parcela testigo sin tratamiento situada a cerca de 1,5 km de distancia. En esta parcela testigo también se colocaron 4 palmeras centinela y una trampa de seguimiento central y 3 exteriores para poder comparar las poblaciones de la zona tratada con trampas infectivas respecto a una zona sin tratar.

Resultados:

En las figuras 4 y 5 se muestra la evolución de la población en cada una de las parcelas de tratamiento respecto a su control en las parcelas de Sa Coma y Can Marines respectivamente:

Figura 4. Capturas de picudos por trampa y día en las parcelas de Sa Coma (tratamiento de infección), Jesus (testigo sin tratamiento) y Ramón (testigo sin tratamiento donde se sitúan las palmeras centinela).





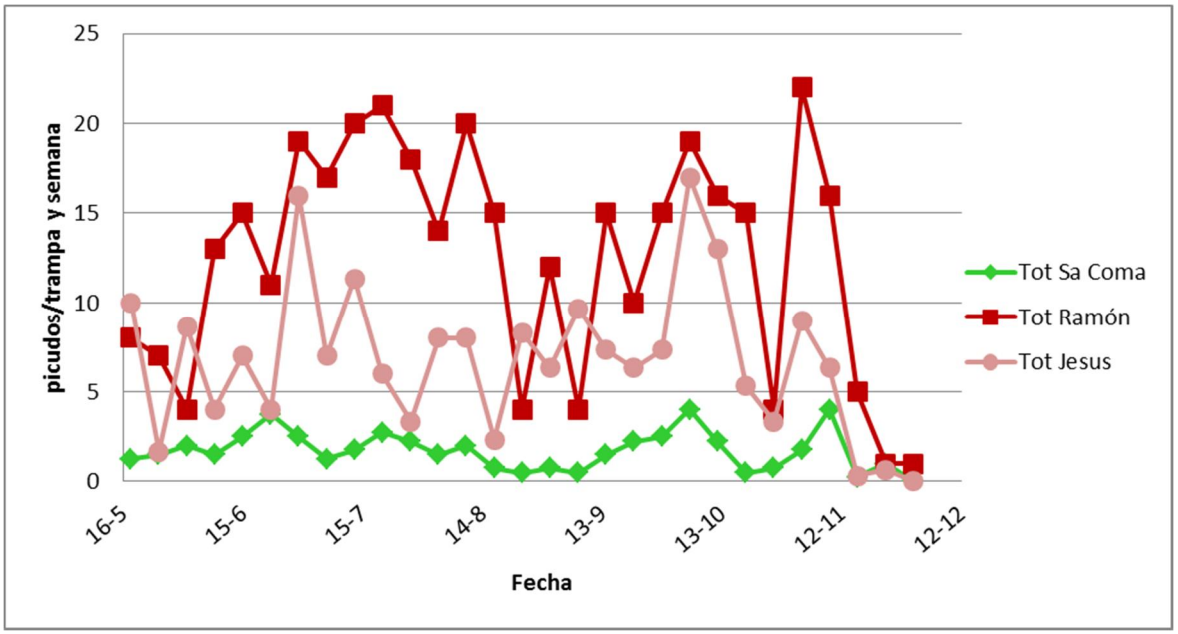
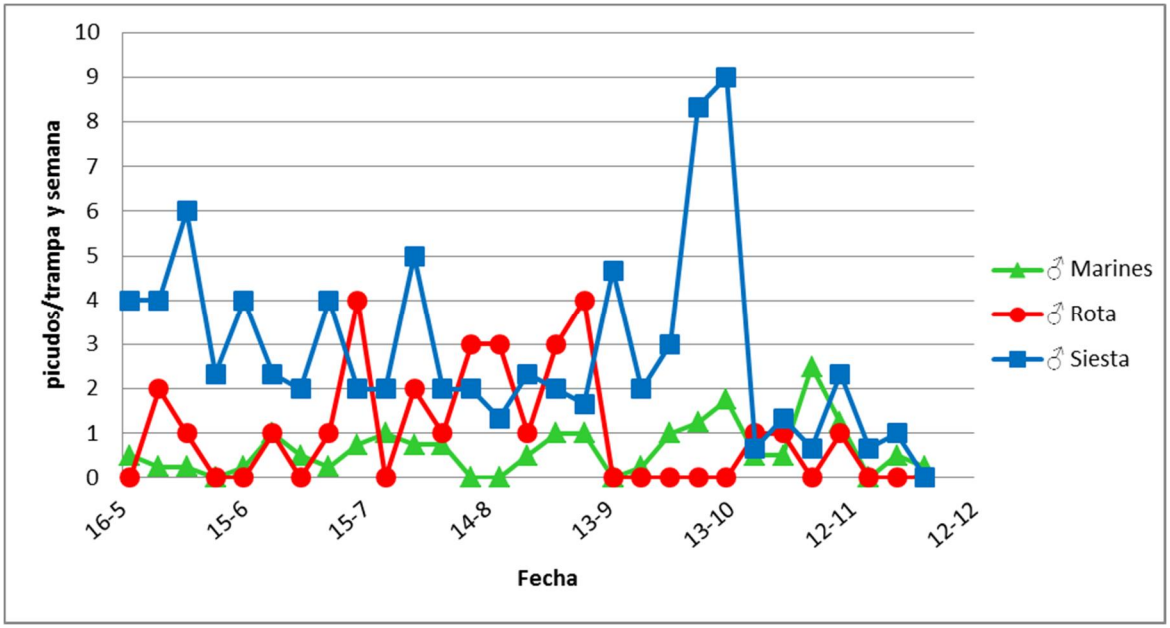
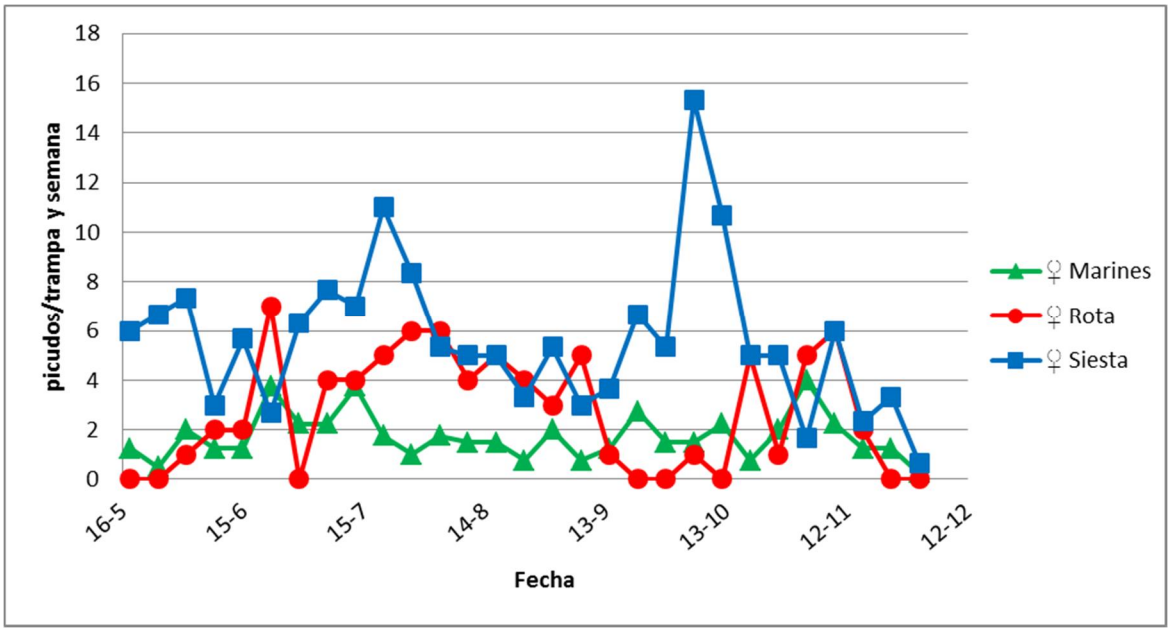
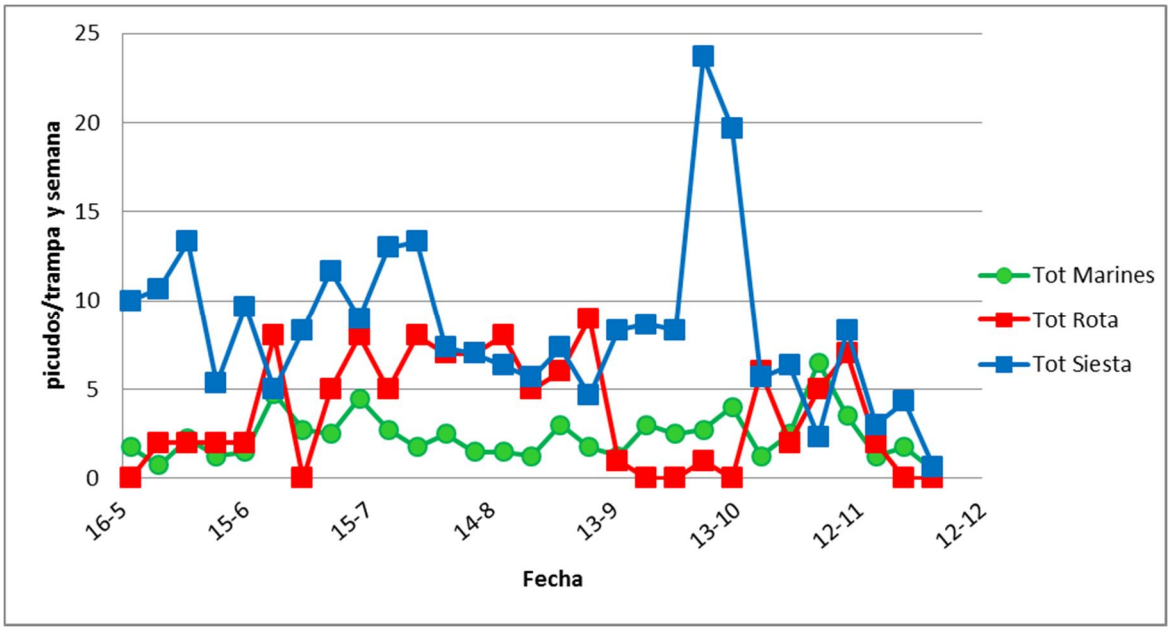


Figura 5. Capturas de picudos por trampa y día en las parcelas de Can Marines (tratamiento de infección), Siesta (testigo sin tratamiento) y Sa Rota (testigo sin tratamiento donde se sitúan las palmeras centinela).



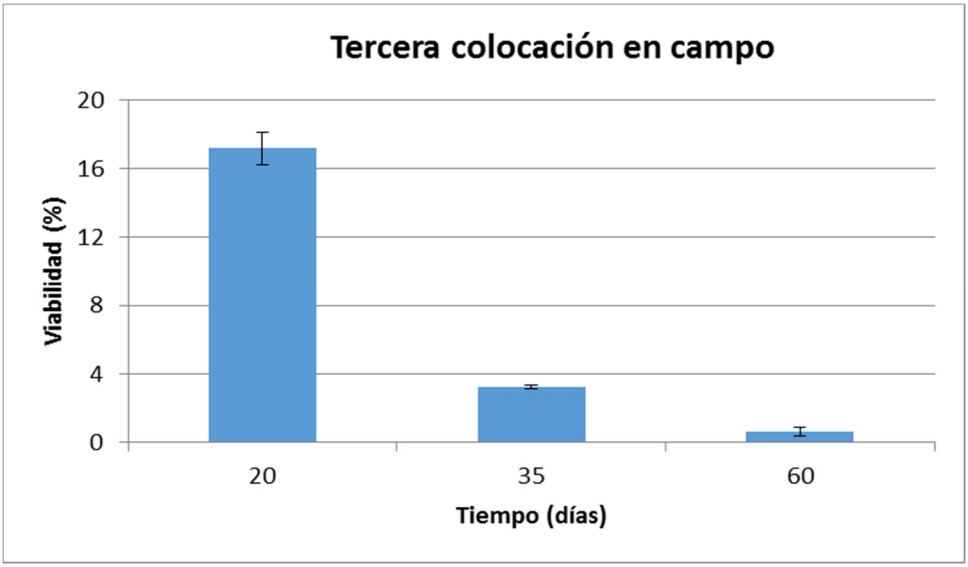




En las figuras 4 de la zona de Sa Coma se puede observar que hay una disminución muy clara de las capturas en las parcelas tratadas con hongo infectivo (entre 4 y 10 veces) respecto a las parcelas sin tratamiento. Este efecto también se puede observar en las figuras 5 aunque en este caso la parcela testigo de Sa Rota tiene un nivel poblacional mayor que la zona tratada con trampas infectivas en la primera parte del ensayo (de junio a la primera quincena de septiembre) y similar en la segunda parte del ensayo en octubre y noviembre. Sin embargo el nivel poblacional en las zonas colindantes al ensayo (Siesta) siguen mostrando un nivel poblacional mucho mayor que en la zona tratada con hongo infectivo.

Tasas de infección:

Cada uno de los túneles infectivos fue muestreado quincenalmente y estas muestras fueron llevadas al laboratorio donde se estudió la pérdida de capacidad infectiva con el tiempo. Los resultados de las tasas de infección de la primera parte del ensayo (mayo-agosto) muestras que hay una acusada caída de la actividad infectiva del 94% los primeros 15 días de envejecimiento. Esta caída de la actividad es aún más acusada durante los siguientes 15 días llegando a valores de infección casi nulos al mes de la colocación. Este hecho ha provocado que el reemplazo de los túneles en esta primera parte del ensayo se haya producido cada 45 días en vez de los 70 a 84 días planificados inicialmente. Para mejorar la eficacia de los túneles se realizó una nueva formulación que se utilizó en la renovación del 24 de agosto para la segunda parte del ensayo (septiembre-noviembre) En este caso la viabilidad de los túneles fue superior a las 2 primeras puestas, manteniendo una viabilidad del 17 a los 20 días de envejecimiento y de 3,22% a los 35 días.



Debemos tener en cuenta que la viabilidad mostrada del 3.2% de los conidios a los 35 días equivale a 4.2 10^6 conidios/mg, cantidad suficiente para causar la mortalidad del 100% de los individuos que atraviesen ese túnel en un plazo de 35 días desde que atraviesan el túnel.

Evaluación del daño en palmeras centinela

En cada uno de los dos períodos del ensayo se colocaron 16 palmeras centinela en las 4 parcelas en estudio (4 palmeras en cada una de las 2 parcelas tratadas con trampas infectivas y 4 palmeras en cada una de las dos parcelas sin tratar). La primera colocación de palmeras se realizó el 8 de mayo de 2015 y permanecieron en campo hasta su disección el 14 de agosto. Estas palmeras diseccionadas se sustituyeron por palmeras sanas el 24 de agosto y permanecieron en campo hasta el 25 de noviembre fecha en que también fueron diseccionadas. En cada disección se ha contado en número de palmeras afectadas y el número de insectos encontrados en su interior diferenciando entre las fases de adulto, larva y pupa.

Tabla 1: Resumen de la inspección de palmeras centinela tras 3 meses en campo

1ª colocación	N	Parcela tratada con trampas infectivas				Parcela testigo			
		Infestada	Adultos	Larvas	Capullos	Infestada	Adultos	Larvas	Capullos
Can Marines	1	0	0	0	0	1	0	25	18
	2	1	0	3	0	1	2	0	0
	3	1	4	10	21	0	0	0	0
	4	1	1	0	0	0	0	0	0
Sa Coma	1	1	0	11	7	1	8	0	20
	2	0	0	0	0	1	15	0	23
	3	0	0	0	0	1	0	1	1
	4	0	3	3	23	1	2	3	2

	Trampeo infectivo	Testigo
% palmeras infestadas	50%	75%
Formas vivas/palmera	10,75	15,00
Larvas/palmera	3,38	3,63

Los resultados de la primera inspección que se pueden observar en la tabla 1 muestran que si bien los valores de palmeras infectadas y de individuos encontrados son superiores en la zona sin tratamiento que en la zona tratada con trampas infectivas, estas diferencias no son significativas, ya que la reducción de palmeras afectadas es de solo un 25%. De igual forma, el número de formas vivas por palmera resulto superior en la zona testigo, aunque estas diferencias no llegan a ser significativas en el test de datos apareados para los individuos totales (t=0.45; P=0.66), ni para el numero de larvas (t=0.06; P=0.95). Por lo

tanto se puede afirmar que el tratamiento con trampas infectivas en este primer período no ha reducido el número de palmeras infestadas.

Los resultados de la segunda inspección que se pueden observar en la tabla 2 muestran que solo una de las palmeras de la zona tratada con hongo contenía formas vivas en fase de adulto. Además estos adultos probablemente habían colonizado la palmera ya como adultos porque no se encontraron galerías, ni capullos ni se apreciaron daños en la parcela. Por lo tanto podemos asumir que en ninguna de las 8 palmeras colocadas en zonas tratadas con trampeo infectivo resultó afectada por picudo.

Tabla 2: Resumen de la inspección de palmeras centinela tras permanecer en campo entre el 24 de agosto y el 25 de noviembre

1ª colocación	N	Parcela tratada con trampas infectivas				Parcela testigo			
		Infestada	Adultos	Larvas	Capullos	Infestada	Adultos	Larvas	Capullos
Can Marines	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	2	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0				
Sa Coma	1	0	0	0	0	1	12	15	0
	2	0	0	0	0	1	1	1	0
	3	0	0	0	0	1	3	0	0
	4	0	0	0	0				

	Trampeo infectivo	Testigo
% palmeras infestadas	0%	50%
Formas vivas/palmera	0	5,33
Larvas/palmera	0	2,67

En la zona testigo de Sa Coma también se encontró una palmera que sólo contenía adultos, sin larvas ni capullos, pero en este caso sí que se observaron galerías en la base de la palmera.

A la vista de los resultados obtenidos el tratamiento con trampas infectivas provoca una reducción significativa del daño en las palmeras que se encuentran en dichas parcelas.

Este efecto no fue significativo en la primera colocación de las trampas infectivas pero si lo ha sido en la segunda colocación. Esto puede ser debido al efecto acumulativo del tratamiento o a la mejora en la formulación que se produjo a partir del mes de agosto y que se ha traducido en una mayor viabilidad de los conidios a tiempos superiores a 45 días.

Estudio de infección

Quincenalmente se ha estudiado que porcentaje de los picudos capturados en el centro de cada parcela estaban realmente infectados por *Beauveria bassiana*.

Los picudo, capturados se han esterilizado externamente y sembrado en una cámara húmeda con temperatura controlada. Este proceso se hace individualmente con cada insecto de forma que podemos saber qué porcentaje de los insectos capturados están infectados internamente por el hongo.

Los resultados de la infección se muestran en la figura 6. En el primer período de mayo a agosto no hubo diferencias significativas entre los porcentajes de infección de los insectos capturados en las dos zonas con distintos tratamientos. A partir de agosto, con la sustitución por túneles nuevos con la nueva formulación, se observa que el porcentaje de insectos infectados aumenta claramente en las zonas tratadas con trampas infectivas respecto a las zonas sin tratamiento con hongo. Esta diferencia es aún mayor en septiembre cuando los túneles están en su máximo de actividad y empieza a decaer en octubre conforme los túneles pierden capacidad infectiva. En noviembre tras la última renovación del hongo volvemos a obtener valores de infección muy altos, cercanos al 50% de la población recapturada, lo que nos vuelve a confirmar que renovando los túneles de infección cada 10 semanas infectamos con el hongo a un porcentaje significativo de la población.

Cuando representamos el porcentaje de picudos capturados que presentan micosis según el tiempo de envejecimiento de los túneles obtenemos la Figura 7. En esta figura podemos observar que, cuando los túneles llevan en campo menos de dos semanas, el porcentaje de picudos capturados que presentan micosis es del 78%. Conforme los túneles van envejeciendo los picudos capturados presentan menos micosis hasta llega a las 10 semanas de envejecimiento en campo, cuando el porcentaje de picudos capturados que presentan micosis ya no difiere del control. La conclusión a este resultado es que la vida de los túneles infectivos es inferior a las 10 semanas en las condiciones de campo

descritas. Este tiempo de vida puede variar dentro del mismo año según las condiciones meteorológicas y las condiciones de exposición de la trampa.

Figura 6: Porcentaje de picudos infectados internamente con el hongo *Beauveria bassiana* según la zona de la que han sido recogidos.

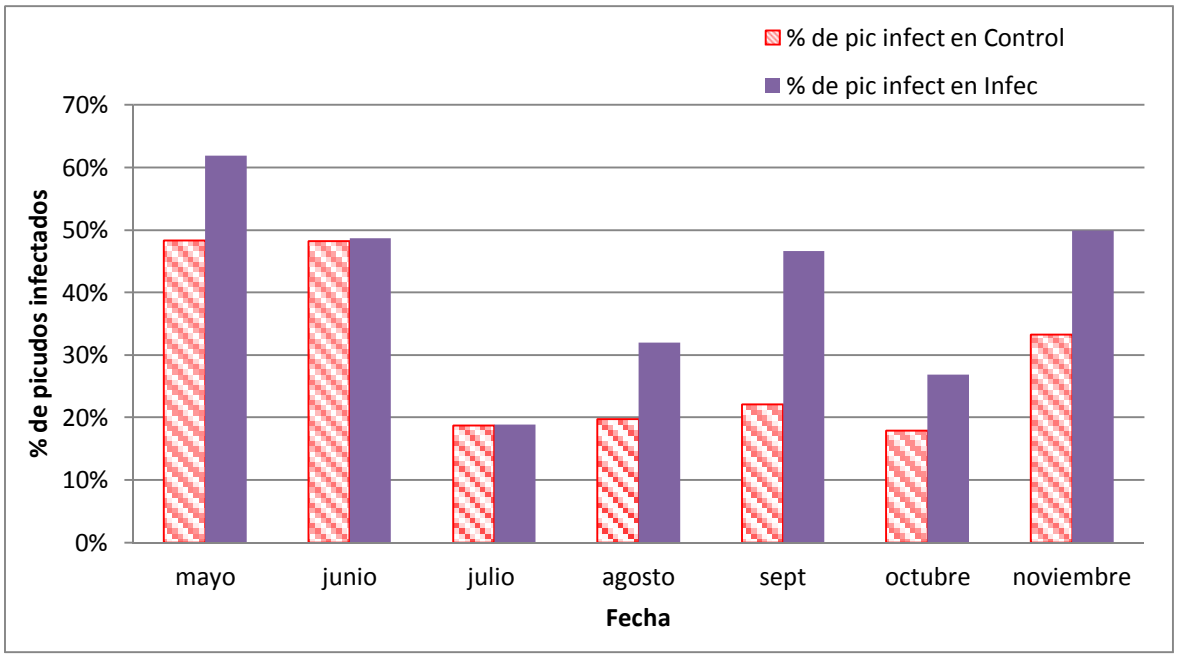
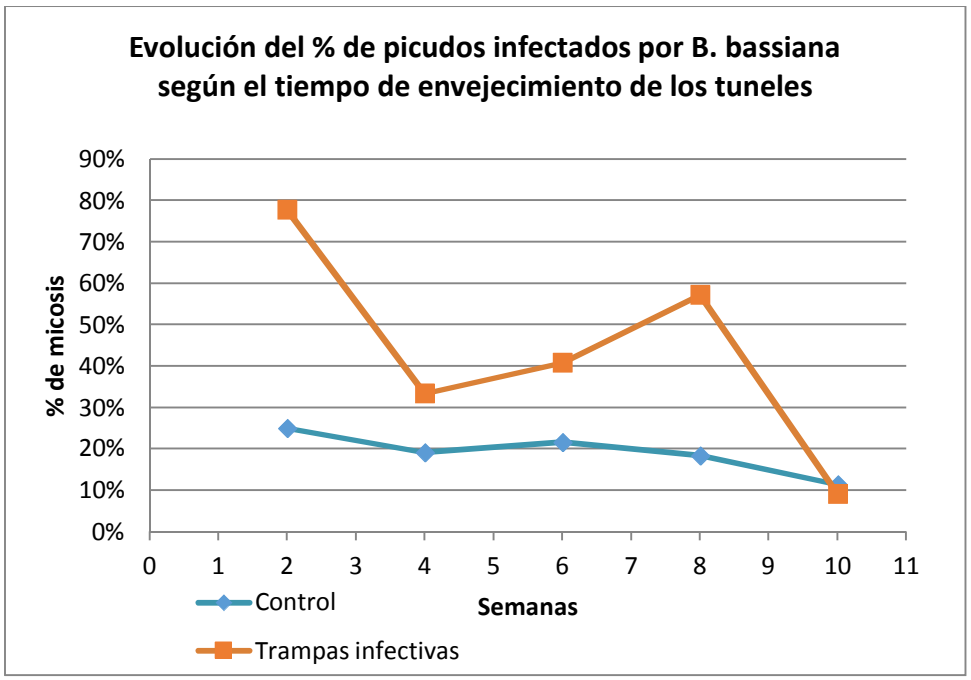


Figura 7: Evolución del % de picudos infectados por *B. bassiana* según el tiempo de envejecimiento de los túneles



Por lo tanto los resultados muestran que, cuando los túneles son activos, se puede observar directamente en campo un efecto sobre la población de picudo afectada por el hongo. Durante el mes de noviembre los resultados son similares a los del mes de septiembre, lo que confirma esta hipótesis ya que los túneles se renovaron la primera semana de noviembre.

MALLORCA

El ensayo de Mallorca se ha realizado en dos parcelas de 100 ha situadas en la base aérea militar de Son San Joan y en la zona de la base militar de Puntiró distanciadas entre si 7 km.

En la zona de Son San Joan se colocaron 77 trampas infectivas a razón de una trampa por ha. Al colocación se inició el 16 de junio y se prolongó durante 2 semanas. Durante ese período se colocaron 8 palmeras centinela en el centro de la parcela y las 4 trampas de seguimiento cebadas con un emisor de ferrugineol Pherosan de 1 g y una pastilla de vapona.

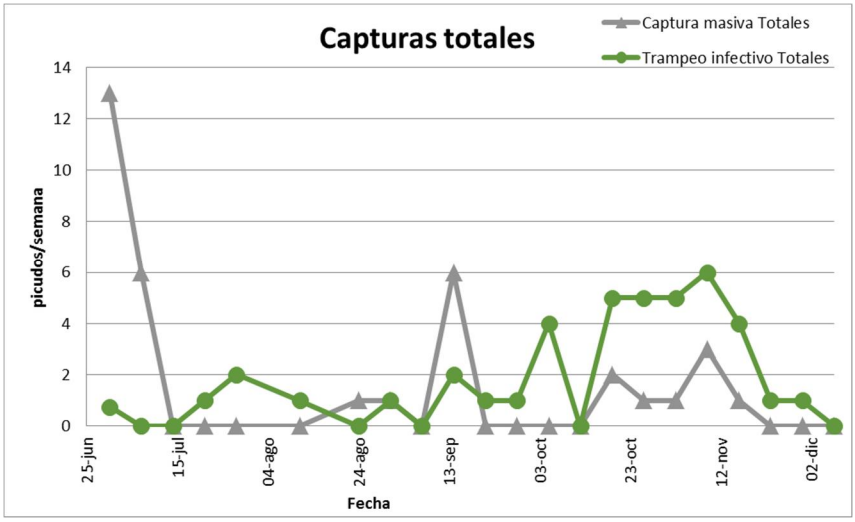
En la zona de Puntiró se colocó la segunda quincena de junio un trampeo masivo a razón de una trampa por ha (colocadas en una cuadrícula de 100 metros), con un total de 80 trampas. Las trampas de trampeo masivo eran de tipo Picusan y se rellenaron con 2 litros de agua+40ml de aceite parafínico+300 ml de melaza y un emisor de ferrugineol Pherosan de 1 gramo. En la zona central de la parcela se han dispuesto 4 trampas de seguimiento de la población y 8 palmeras centinela como en la parcela con tratamiento infectivo.

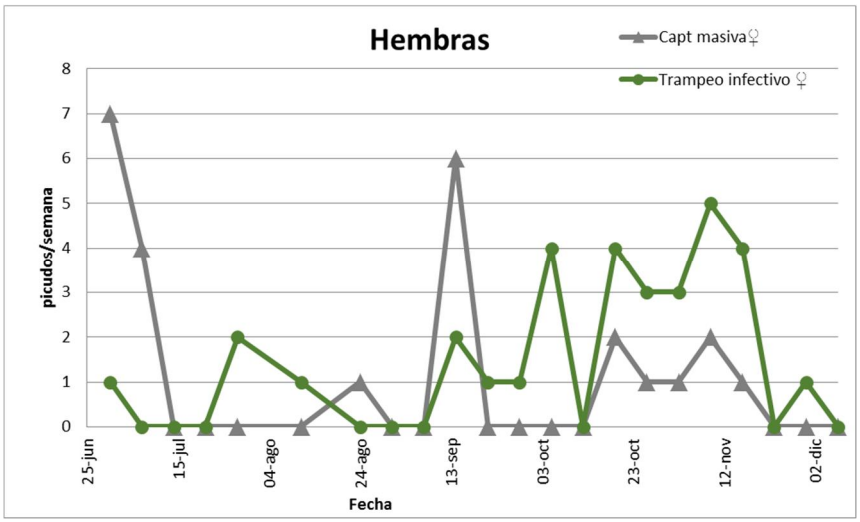
Los túneles infectivos se renovaron el 11 de septiembre por nuevos túneles con la nueva formulación y las palmeras centinela se abrieron e inspeccionaron entre el 10 y el 11 de septiembre. La reposición de las palmeras por palmeras nuevas se realizó el 17 de septiembre.

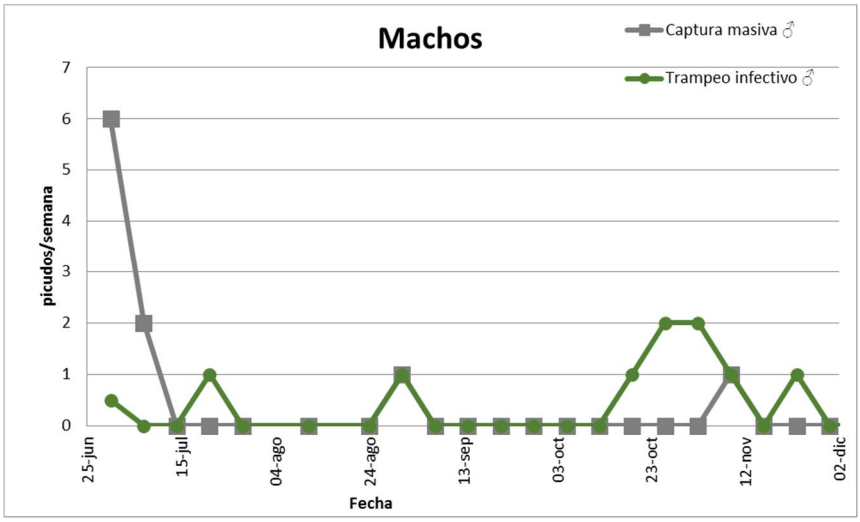
Resultados:

En la figura 8 se muestra la evolución de la población en cada una de las parcelas según su tratamiento. Las gráficas muestran que las poblaciones de picudo son mucho menores que en los ensayos de Ibiza, aunque parten de poblaciones elevadas con capturas que superan los 25 picudos en la parcela de Puntiró al principio del ensayo. Cabe señalar que los primeros valores de capturas tomados el 30 de junio corresponden a un período de 15 días en los que aún no estaba colocado el trampeo masivo ni el trampeo infectivo, lo que supone que son valores poblacionales previos a la colocación de trampas. La clara disminución de capturas que se produce a partir de la colocación de las trampas infectivas y de capturas masiva nos muestra cómo se reduce la población con estas técnicas.

Figura 8. Capturas de picudos por trampa y día en las parcelas de Son San Joan (tratamiento de infección), y Puntiró (captura masiva).







La población de picudo es muy similar en las dos localizaciones en la primera parte del ensayo (junio-primera quincena septiembre) salvo en la segunda semana de septiembre donde la población parece aumentar ligeramente en la zona tratada con captura masiva. Sin embrago, en la segunda parte del ensayo, tras la reposición de los túneles el 11 de septiembre se observa que las poblaciones en la zona de trampeo infectivo son superiores a las de la zona con captura masiva. Este efecto obedece claramente a que en las cuadrículas tratadas con captura masiva estamos reduciendo el número de picudos de forma directa e inmediata con todas las trampas instaladas, mientras que en la zona de trampeo infectivo los picudos sólo son capturados en las trampas de seguimiento ya que las trampas infectivas no retienen a los insectos. La reducción de las poblaciones en la zona tratada con trampas infectivas se debería observar cuando haya transcurrido, al menos, una generación desde la primera colocación de trampas infectivas. Este hecho hace recomendable repetir, al menos parcialmente, uno de los ensayos de infección en el mismo lugar en que se realizaron este año y poder observar de este modo si se produce una reducción eficaz de las poblaciones.

Tasas de infección:

Quincenalmente se tomó una muestra de los túneles infectivos para evaluar la pérdida de capacidad infectiva con el tiempo. Los resultados de las tasas de infección muestran que hay una acusada caída de la actividad infectiva del 85% los primeros 15 días de envejecimiento. Esta caída de la actividad es aún más acusada durante los siguientes 15 días llegando a valores de infección casi nulos al mes de la colocación. Este hecho ha provocado que el reemplazo de los túneles se adelantase a los 75 días y no se mantuviese los 85 días previstos, realizando la sustitución entre el 15 y 16 de septiembre. Para mejorar la eficacia de los túneles, en esta renovación se utilizó una nueva formulación del hongo cuya viabilidad se estudió en la segunda parte del ensayo.

Esta nueva formulación mantuvo una viabilidad superior al 2% en el primer mes de envejecimiento y del 1% a los 60 días de envejecimiento. Por las pruebas realizadas en los estudios previos de este proyecto sabemos que las viabilidades del primer mes son suficientes para provocar el 100% de mortalidad en los individuos que atraviesen el túnel en un período de 35 días. Debemos tener en cuenta que si bien el período para provocar mortalidad es elevado, los adultos dejan de alimentarse, reproducirse y moverse en un

plazo cercano a la semana, lo que significa un plazo suficiente para transmitir el patógeno pero no excesivamente elevado para seguir provocando daño. Las viabilidades del segundo mes ya están por debajo del límite de eficacia del túnel que habíamos establecido al principio del ensayo, lo que quiere decir que la cepa utilizada no resiste las condiciones ambientales como se pensaba y que sería recomendable utilizar una cepa más resistente para futuros ensayos.

Evaluación del daño en palmeras centinela

Las 16 palmeras centinela se colocaron el 15 de junio de 2015 en las dos parcelas en estudio (8 palmeras en la parcela tratada con trampas infectivas y 8 palmeras en la parcela tratada con trampeo masivo) y han permanecido hasta su disección el 10-11 de septiembre. En la disección se ha contado en número de palmeras afectadas y el número de insectos encontrados en su interior diferenciando entre las fases de adulto, larva y pupa.

Los resultados de la inspección que se pueden observar en la tabla 2 muestran que, si bien el porcentajes de palmeras infectadas es superior en la zona tratada con captura masiva que en la zona tratada con trampas infectivas, estas diferencias no son significativas, ya que la reducción de palmeras afectadas es de solo un 12%. Sin embargo, el número de formas vivas por palmera resultó superior en la zona tratada con trampas infectivas, aunque estas diferencias no llegan a ser significativas en el test de datos apareados para los individuos totales ($t=1.31$; $P=0.23$), ni para el numero de larvas ($t=0.60$; $P=0.55$). Por lo tanto se puede afirmar que el tratamiento con trampas infectivas en este primer período ha tenido la misma eficacia respecto a la protección de palmeras que el trampeo masivo con una trampa por ha.

Tabla 2: Resumen de la inspección de palmeras centinela tras 3 meses en campo

Palmera	Parcela con tratamiento infectivo (Son San Joan)				Parcela de captura (Puntiró)			
	Infestada	Adultos	Larvas	Capullos	Infestada	Adultos	Larvas	Capullos
1	1	2	2	2	1	0	1	0
2	0	0	0	0	1	1	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1	2	0	0	1	0	1	0
8	1	0	1	2	1	1	0	0

	Trampeo infectivo	**Testigo**
% palmeras infestadas	38%	50%
Formas vivas/palmera	1,375	0,5
Larvas/palmera	0,375	0,25

Foto 1. Palmeras centinela en la parcela tratada con trampas infectivas

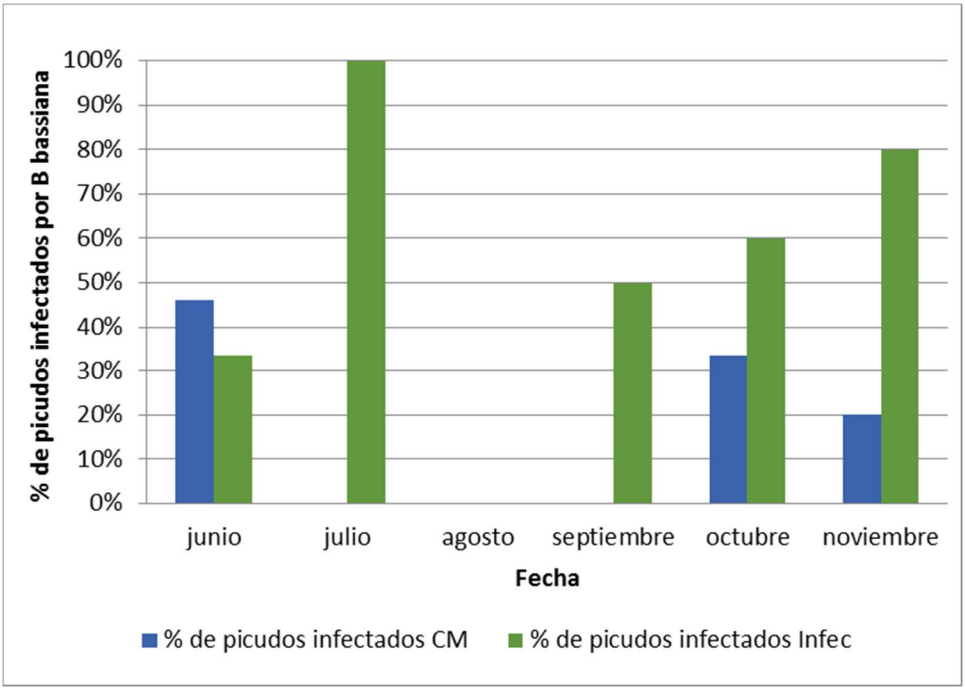
La segunda inspección de las palmeras centinela que se colocaron en septiembre se realizó el 16 de diciembre. En esta prospección no se encontró ninguna palmera centinela afectada en ninguno de las dos parcelas de ensayo. Este hecho fue especialmente llamativo en la parcela tratada con trampas infectiva ya que, en el centro del octógono que formaban las palmeras centinela en su posición, había una palmera de 4 metros de altura muy afectada por el ataque de picudo desde antes de la colocación de este ensayo (Foto1). Debemos tener en cuenta que dicha palmera tenía en su interior adultos de picudo con capacidad para colonizar nuevas palmeras, pero que aun así, ninguna de las 8 palmeras centinela que la rodeaban resultó afectada.

Estudio de infección

Quincenalmente se ha estudiado que porcentaje de los picudos capturados en el centro de cada parcela estaban realmente infectados por *Beauveria bassiana*. Para ello los picudos capturados se han esterilizado externamente y sembrado en una cámara húmeda con temperatura controlada. Este proceso se hace individualmente con cada insecto de forma que podemos saber qué porcentaje de los insectos capturados están infectados internamente por el hongo.

Los resultados de la infección se muestran en la figura 9. En este caso podemos observar que el porcentaje de picudos infectados durante el mes de julio es del 100% de los picudos capturados mientras que en agosto es del 0%. Esta variación es debida a que le número de capturas durante agosto es muy baja (Figura 8) lo que hace que los valores de infección varíen enormemente de un mes a otro. Sin embargo es importante resaltar que, a partir del mes de septiembre en que las capturas son más elevadas, las tasas de infección se sitúan, en promedio de los tres meses, por encima del 60% en la zona tratada con trampas infectivas, mientras que en la zona tratada con trampeo masivo no alcanza en promedio el 20%. Debemos tener en cuenta que no solo estamos afectando a más de un 40% más de la población, sino que estos individuos infectados serán capaces de transmitir la infección a otros individuos, por lo que la proporción de población afectada será muy superior a ese 40%. De forma global, las tasas de infección conseguidas en noviembre, de un 80% de los adultos recapturados infectados con el hongo demuestran una gran eficacia de las trampas en la atracción-infección de dichos individuos.

Figura 9. Porcentaje de picudos infectados internamente con el hongo *Beauveria bassiana* según la zona de la que han sido recogidos



CONCLUSIONES:

Los ensayos realizados tanto en Ibiza como en Mallorca demuestran que este tipo de trampas puede reducir las poblaciones de picudos y, por lo tanto, reducir el daño que provoca. Esta conclusión ha sido directamente observable en los ensayos de Ibiza en que los resultados muestran un porcentaje de palmeras centinela afectadas menor en la zona tratada con trampas infectivas que en la zona testigo. En el ensayo de Mallorca este efecto no es tan apreciable ya que se compara el tratamiento con trampas infectivas respecto a un control con trampeo masivo colocando una trampa por hectárea. Este tratamiento control también ha reducido la presión de plaga a niveles muy bajos, lo que se demuestra con la ausencia de daño en las palmeras centinela del centro de cada parcela. El tratamiento con trampas infectivas ha conseguido el mismo resultado de evitar el daño en palmeras centinela, por lo que debemos asumir una eficacia al menos igual que la captura masiva. Sin embargo podemos observar que un porcentaje de hasta el 80% de los picudos capturados en el ensayo de trampas infectivas estaban infectados por el hongo, lo que hace pensar en que la eficacia del método infectivo puede resultar superior al de captura masiva.

La cepa del hongo utilizado para estos ensayos de infección fue aislada por la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) de picudos infectados naturalmente. Esta cepa, si bien tiene una capacidad infectiva innegable y una virulencia adecuada, ha resultado ser no tan resistente a las condiciones ambientales adversas como algún hongo comercial ensayado por la UPV. Además esta cepa de la UPV no tiene registro como producto fitosanitario y la inversión necesaria para registrarlo excede las posibilidades de la propia UPV. Por dichos motivos, en futuros ensayos sería recomendable utilizar una cepa comercial que además de tener ventajas funcionales como la resistencia ambiental, podría aplicarse directamente en campo sin precisar de un largo proceso de registro.

Finalmente, respecto a posibilidades futuras de aplicación, el método de atracción infección ha mostrado buenos indicios de eficacia en los ensayos realizados. Estos indicios deberían comprobarse en futuros ensayos en los que el efecto acumulado de los tratamientos y mejoras en la formulación y diseño del sistema de atracción y muerte podrían mejorar sustancialmente los resultados. Los resultados de Ibiza muestran resultados positivos en parcelas de sólo 12 ha por lo que se puede plantear reducir las superficies de ensayo de Mallorca a parcelas de entre 20 y 40 ha sin riesgo a perder eficacia. Esto permitiría realizar el tratamiento con trampas infectivas en 3 parcelas y 3 controles con trampeo masivo casi con el mismo esfuerzo que ha supuesto realizar los ensayos en 2015 en superficies de 100

ha. Por ello para 2016 se plantea repetir la experiencia en las parcelas de 2015 reduciendo su superficie a cerca de 30ha y el número de palmeras centinela a 4 por parcela, pero repitiéndola en otras dos localizaciones en cada tratamiento. Este diseño de ensayos le daría mucha más potencia a los resultados y proporcionaría conclusiones más definitivas sobre el sistema y su posible aplicación.

Valencia a 25 de enero de 2016

Fdo: Vicente Navarro Llopis