



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Ecosistemas Agroforestales

Evaluación de un nuevo método de control para *Ceratitis capitata* y *Delotococcus aberiae* mediante el uso de nematodos entomopatógenos (Rhabditida: Heterorhabditidae y Steinernematidae)

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Sanidad y Producción Vegetal

AUTOR/A: Vicente Moreno, Alfonso

Tutor/a: Vacas González, Sandra

Director/a Experimental: Moya Sanz, M<sup>a</sup> del Pilar

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

## **Evaluación de un nuevo método de control para *Ceratitis capitata* y *Delottococcus aberiae* mediante el uso de nematodos entomopatógenos (Rhabditida: Heterorhabditidae y Steinernematidae).**

### **RESUMEN.**

La mosca mediterránea de la fruta (*Ceratitis capitata* Wiedemann) y el cotonet de Sudáfrica (*Delottococcus aberiae* (De Lotto)) son dos de las principales plagas que afectan actualmente a los cítricos de la cuenca mediterránea en general y de la Comunidad Valenciana en particular. Ambas especies presentan fases edáficas en su ciclo biológico, por lo que en el presente trabajo se explora el potencial de cinco productos comerciales basados en nematodos entomopatógenos (NEP) para el control de estas plagas.

La materia activa de estos productos son los infectivos juveniles (IJs) de los NEP *Heterorhabditis bacteriophora* (producto Larvanem), *Steinernema carpocapsae* (producto Capsanem) y *Steinernema feltiae* (productos Entonem, Nemaforce® Felti Powder y Steinernema-System). Se ha evaluado su patogenicidad frente a larvas L3 y pupas de *C. capitata*, y hembras adultas y machos N2 de *D. aberiae*. El potencial se evaluó determinando el porcentaje medio de mortalidad y el tiempo medio de supervivencia de los individuos mediante un screening inicial que incluía los cinco productos, en ensayos realizados en placa Petri sobre papel de filtro. Posteriormente, con el producto que ofreció los mejores resultados se realizó un ensayo dosis-respuesta en placa Petri con sustrato tierra, determinando la virulencia mediante el cálculo de la DL<sub>50</sub>.

En el caso de *C. capitata*, el screening se realizó con una dosis de 300 IJs/individuo. Las larvas fueron más susceptibles a la infección por los NEP que las pupas, obteniendo para estas últimas tasas de infección nulas. Sin embargo, la infección obtenida en larvas no es suficiente para determinar que estos productos sean una herramienta para el control de esta plaga y no se realizó el ensayo dosis-respuesta.

Para *D. aberiae*, el screening mostró que, a una dosis de 200 IJs/individuo, el producto con mayor potencial para el control de la plaga es Larvanem (*H. bacteriophora*), obteniéndose una mortalidad del 90% en machos en un periodo de 72 horas, y cercana al 80% en hembras en un periodo de 96 horas. En el posterior ensayo dosis-respuesta, aplicando dosis de 50, 100, 200 y 400 IJs/cochinilla, se obtuvo que la mortalidad tanto de machos N2 como de hembras adultas de *D. aberiae* aumenta conforme lo hace la dosis de IJs aplicada. Pese a ser el producto que mayor mortalidad causa, la DL<sub>50</sub> obtenida, 190 IJs en machos a las 72 horas y 200 IJs en hembras a las 96 horas, es mucho mayor y actúa en un mayor periodo de tiempo que en otros estudios de nematodos entomopatógenos contra otras especies de cochinillas.

Se discuten los posibles motivos de los resultados negativos de estos productos en el caso de *C. capitata*, así como los del éxito de Larvanem contra *D. aberiae* respecto del resto de productos, y cómo se podría aumentar su capacidad de control frente a esta plaga.

**Palabras clave.** *Ceratitis capitata*, *Delottococcus aberiae*, nematodos entomopatógenos, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae*, DL<sub>50</sub>.

## ABSTRACT

The Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata* Wiedemann) and the South African mealybug (*Delottococcus aberiae* (De Lotto)) are two of the main pests currently affecting citrus in the Mediterranean basin in general and in the Valencian Community in particular. Both species present edaphic phases in their biological cycle, so the present work explores the potential of five commercial products based on entomopathogenic nematodes (EPNs) for the control of these pests.

The active material of these products are the infective juveniles (IJs) of the EPNs *Heterorhabditis bacteriophora* (Larvanem product), *Steinernema carpocapsae* (Capsanem product) and *Steinernema feltiae* (Entonem, Nemaforce® Felti Powder and Steinernema-System products). Their pathogenicity has been evaluated against L3 larvae and pupae of *C. capitata*, and adult females and N2 males of *D. aberiae*. The potential was evaluated by determining the mean percentage of mortality and the mean survival time of the individuals through an initial screening that included the five products, in tests carried out in a Petri dish on filter paper. Subsequently, a dose-response assay was performed with the product offering the best results in a Petri dish with soil substrate, determining virulence by calculating the LD<sub>50</sub>.

In the case of *C. capitata*, the screening was performed with a dose of 300 IJs/individual. Larvae were more susceptible to infection by EPNs than pupae, obtaining null infection rates for the latter. However, the infection obtained in larvae is not sufficient to determine that these products have potential for the control of this pest and the dose-response assay was not performed.

For *D. aberiae*, the screening showed that, at a dose of 200 IJs/individual, the product with the greatest potential for controlling the pest is Larvanem (*H. bacteriophora*), obtaining 90% mortality in males in a period of 72 hours, and close to 80% in females in a period of 96 hours. In the subsequent dose-response test, applying doses of 50, 100, 200 and 400 IJs/mealybug, it was found that mortality of both N2 males and adult females of *D. aberiae* increased as the dose of IJs applied increased. Despite being the product that causes the highest mortality, the LD<sub>50</sub> obtained, 190 IJs in males at 72 hours and 200 IJs in females at 96 hours, is much higher and acts over a longer period of time than in other studies of entomopathogenic nematodes against other mealybug species.

The possible reasons for the negative results of these products in the case of *C. capitata* are discussed, as well as the reasons for the success of Larvanem against *D. aberiae* compared to the rest of the products, and how its control capacity against this pest could be increased.

**Key-words.** *Ceratitis capitata*, *Delottococcus aberiae*, entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae*, DL<sub>50</sub>.

**Alumno:** Alfonso Vicente Moreno

**Tutora académica:** Prof. Dña. Sandra Vacas González

**Tutora experimental:** Dra. Dña. María Pilar Moya Sanz

Valencia, septiembre de 2024

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría agradecer a mis tutoras Pilar y Sandra, por haberme dado la oportunidad de realizar las prácticas y este trabajo en el CEQA, por la ayuda y orientación ofrecida en laboratorio y por los miles de correcciones que han hecho para que este trabajo haya salido adelante... Gracias chicas!! ;)

También me gustaría agradecer al equipo del CEQA por lo majos y divertidos que han sido y por haberme tratado tan bien, en especial a Ilde, por enseñarme todo lo relacionado con el manejo de instrumental de laboratorio y por su gran ayuda en la realización de los ensayos.

## ÍNDICE

1.	Introducción.....	1
1.1	El cultivo de cítricos en España.....	1
1.2	La mosca Mediterránea de la fruta. ....	1
1.2.1	Origen, distribución e importancia.....	1
1.2.2	Ciclo biológico.....	2
1.2.3	Métodos de control. ....	2
1.3	El cotonet de Sudáfrica.....	4
1.3.1	Origen .....	4
1.3.2	Biología. ....	5
1.3.3	Métodos de control. ....	5
1.4	Control biológico mediante nematodos entomopatógenos. ....	7
2.	Justificación y objetivos.....	10
3.	Material y métodos. ....	11
3.1	Insectos.....	11
3.1.1	<i>Ceratitis capitata</i> . ....	11
3.1.2	<i>Delottococcus aberiae</i> . ....	11
3.2	Nematodos entomopatógenos.....	12
3.2.1	Origen y almacenamiento de los nematodos.....	12
3.2.2	Preparación de los nematodos.....	13
3.3	Determinación de la patogenicidad de los nematodos frente a <i>Ceratitis capitata</i> .....	14
3.4	Determinación de la patogenicidad de los nematodos frente a <i>Delottococcus aberiae</i> .....	15
3.5	Determinación de la virulencia de Larvanem ( <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> ) frente a <i>Delottococcus aberiae</i> .....	16
3.6	Análisis estadístico.....	19
4.	Resultados. ....	21
4.1	Patogenicidad de los nematodos frente a <i>Ceratitis capitata</i> . ....	21
4.2	Patogenicidad de los nematodos frente a <i>Delottococcus aberiae</i> . ....	21
4.2.1	Establecimiento de las condiciones experimentales. ....	21
4.2.2	Actividad entomopatógena de los diferentes nematodos.....	22
4.3	Determinación de la virulencia de Larvanem ( <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> ) frente a <i>Delottococcus aberiae</i> .....	26
4.3.1	Establecimiento de las condiciones experimentales. ....	26
4.3.2	Virulencia de las distintas dosis de Larvanem. ....	27

5.	Discusión.....	30
5.1	Efecto de los NEP sobre <i>Ceratitis capitata</i> . ....	30
5.2	Efecto de los NEP sobre <i>Delottococcus aberiae</i> .....	31
6.	Conclusiones.....	38
7.	Bibliografía.....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cajas de los productos.....	12
<b>Figura 2.</b> Portaobjetos con las 15 gotas sobre las que se realiza el recuento.....	13
<b>Figura 3.</b> Detalle de una gota bajo la lupa binocular. Ampliación 20x.....	13
<b>Figura 4.</b> Nematodos muertos con su característica forma en lanza. Ampliación 20x.....	13
<b>Figura 5.</b> Larvas/pupas de <i>C. capitata</i> de una placa sobre gotas de agua.....	14
<b>Figura 6.</b> Dos pupas de <i>C. capitata</i> diseccionadas (izq.) y una sin diseccionar (dcha.). Ampliación 6,3x.....	14
<b>Figura 7.</b> <i>Delottococcus aberiae</i> vistos en la lupa (Ampliación 12,5x).....	15
<b>Figura 8.</b> Ejemplo de cotonet que no se puede recuperar en el screening.....	15
<b>Figura 9.</b> Pocillo con gran cantidad de nematodos en el fondo que han salido del interior de la cochinilla (Ampliación 20x).....	16
<b>Figura 10.</b> Cotonet diseccionado con las agujas. (Ampliación 32x).....	16
<b>Figura 11.</b> Proceso de montaje de las placas para el ensayo dosis-respuesta.....	17
<b>Figura 12.</b> Proceso de montaje de las cajas para el ensayo dosis-respuesta.....	18
<b>Figura 13.</b> Ejemplo de individuo que no se puede recuperar en el ensayo dosis-respuesta.....	18
<b>Figura 14.</b> Disección de una larva de <i>C. capitata</i> (Ampliación 32x).....	21
<b>Figura 15.</b> Machos N2 de <i>D. aberiae</i> muertos por exceso de agua.....	22
<b>Figura 16.</b> Evolución temporal de la mortalidad acumulada (porcentaje $\pm$ error estándar) en el screening según el producto en (A) machos N2 y (B) hembras adultas de <i>D. aberiae</i> .....	24
<b>Figura 17.</b> Proporción de individuos de <i>D. aberiae</i> muertos con nematodos en su interior (porcentaje $\pm$ error estándar) respecto de los muertos totales según el producto en (A) machos N2, a las 72 horas, y (B) hembras adultas a las 96 horas en el screening.....	25
<b>Figura 18.</b> Variación del porcentaje ( $\pm$ error estándar) de humedad de la tierra a lo largo de los bioensayos dosis-respuesta.....	27
<b>Figura 19.</b> Mortalidad (porcentaje $\pm$ error estándar) alcanzada (A) a las 72 horas según la dosis de nematodos aplicados en machos N2 y (B) a las 96 horas en hembras adultas.....	28
<b>Figura 20.</b> Porcentaje ( $\pm$ error estándar) de individuos de cada sexo (machos N2 y hembras adultas) recuperados para su posterior disección según la dosis de nematodos aplicada.....	29

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tiempo de supervivencia medio de las cochinillas macho N2 y hembra adulta según el producto.....	24
<b>Tabla 2.</b> Virulencia del producto Larvanem frente a machos N2 y hembras adultas de <i>D. aberiae</i> .....	28
<b>Tabla 3.</b> Diámetro y longitud media de los juveniles infectivos (IJs) de las especies de NEP empleadas en el presente trabajo.....	32
<b>Tabla 4.</b> Diámetro medio del anillo anal de ninfas N2 y hembras de distintas especies de pseudocóccidos.....	33

## ABREVIATURAS

- NEP: nematodo entomopatógeno
- IJ: infectivo juvenil
- NFP: Nemaforce<sup>®</sup> Felti Powder
- SS: Steinernema-System
- DL<sub>50</sub>: dosis letal al 50%
- DL<sub>90</sub>: dosis letal al 90%
- HEP: hongo entomopatógeno

## 1. Introducción.

### 1.1 El cultivo de cítricos en España.

En España, el cultivo de cítricos es de gran importancia, pues es el primer país productor de la Unión Europea y el sexto del mundo. En el ámbito de cítricos en fresco, es el primer comercializador a nivel mundial, con un 25% de las exportaciones globales, lo que supone un valor medio de 3.300 millones de euros anuales (MAPA, 2023).

Entre las Comunidades Autónomas destacan la Región de Murcia, Andalucía y la Comunidad Valenciana respecto a producción, siendo esta última la primera productora a nivel nacional (representó el 50,6% de la producción nacional en la campaña 2022 - 2023). En la Comunidad Valenciana se producen mayoritariamente mandarinas y naranjas (42,3% y 48,7% de la producción total de cítricos en España en la campaña 2022 - 2023, respectivamente) (GVA, 2023), destacando comercialmente la mandarina Clemenules y las variedades de naranja, Navelina, Navelate y Valencia Navel.

Por la gran importancia de los cultivos cítricos a nivel nacional, y en concreto a nivel de la Comunidad Valenciana, es importante realizar una gestión eficiente de las plagas. Entre las distintas plagas que afectan a los cítricos en la Comunidad Valenciana destacan la mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) y el cotonet de Sudáfrica, *Delottococcus aberiae* (De Lotto) (Hemiptera: Pseudococcidae), las cuales se describirán a continuación.

### 1.2 La mosca Mediterránea de la fruta.

#### 1.2.1 Origen, distribución e importancia.

*Ceratitis capitata* es una plaga polífaga originaria del África subsahariana (Giunti et al., 2023) que, tanto gracias a su propio poder de dispersión como al comercio internacional de fruta, se ha extendido por muchas áreas tropicales y templadas, como la mediterránea o la sudamericana (Reyes y Ochando, 2004). En el caso concreto de España, este díptero se consideró plaga ya en 1842, y se cree que la colonización tuvo lugar a través del estrecho de Gibraltar y, a partir de ahí, se extendió a regiones más septentrionales (Malacrida et al., 1992). Este insecto es una plaga clave capaz de atacar a más de 350 especies, tanto silvestres como cultivadas, que pertenecen a 63 familias distintas. Las pérdidas económicas ocasionadas por esta plaga pueden ser directas: por el daño que causan la ovoposición de las hembras y la alimentación de las larvas en la fruta, impidiendo su comercialización; o indirectas, derivadas del coste de las medidas de gestión para su control o de las medidas cuarentenarias que establecen los países importadores, restringiendo así la comercialización de la fruta (Elqdhly et al., 2024).

### 1.2.2 Ciclo biológico.

El ciclo de vida de *C. capitata* dura entre 20 y 90 días, dependiendo de las condiciones climáticas y la fruta hospedadora. Tras aparearse, las hembras buscan un hospedador adecuado y hacen una puesta de entre 2 y 20 huevos bajo la piel de la fruta, pudiendo ovopositar un total de 200 a 500 huevos a lo largo de su vida. Cuando el huevo eclosiona, emerge una larva que se alimenta de la pulpa, siendo éste el estadio que mayor daño económico causa. Dentro del fruto completa sus tres estadios larvales y, finalmente, sale de la fruta y pupa en el suelo (Di Ilio y Cristofaro, 2021). Tras 9 - 12 días, se produce la emergencia del adulto y comienza de nuevo el ciclo biológico.

### 1.2.3 Métodos de control.

En primer lugar, la principal estrategia destinada a conocer qué métodos de control aplicar y en qué momento, consiste en realizar un seguimiento de los niveles poblacionales de la plaga mediante herramientas adecuadas de monitoreo. Se han desarrollado numerosos sistemas de trapeo para los adultos de la mosca mediterránea, donde se incluyen las trampas tipo Delta, las Jackson, las cromáticas pegajosas o las McPhail, siendo todas ampliamente utilizadas. Recientemente se han desarrollado trampas inteligentes (dispositivos electrónicos de captura) con el mismo objetivo (Giunti et al., 2023).

En España, el control de *C. capitata* se basaba, principalmente, en tratamientos terrestres y aéreos con insecticidas organofosforados, especialmente pulverizaciones con malatión (ahora prohibido en la Unión Europea), lo que llevó a la aparición de resistencias a este insecticida y de resistencias cruzadas a otras materias activas utilizadas para reemplazarlo como el spinosad y el lambda-cihalotrin (Juan-Blasco et al., 2013).

Para evitar el desarrollo de resistencias en las plagas y por la toma de consciencia, tanto social como gubernamental, de los riesgos que supone para la salud humana y para el medio ambiente un uso intensivo de plaguicidas, se realiza un manejo integrado de estas. En el caso de *C. capitata*, su manejo integrado se ha intentado abordar en España desde distintos ámbitos: el control biológico clásico y la búsqueda de parasitoides exóticos, el trapeo masivo, la quimioesterilización y la TIE (Juan-Blasco et al., 2013), si bien no todos ellos han llegado a ser implementados.

- *Control biológico.* El control biológico es uno de los métodos más respetuosos con el medio ambiente y rentables para la gestión de plagas a largo plazo (Giunti et al., 2023). Esta estrategia implica el uso de enemigos naturales como depredadores, parasitoides y patógenos. En el caso de *C. capitata*, dos de los parasitoides más estudiados como potenciales agentes de control biológico son los endoparasitoides koinobiontes exóticos de larvas, *Diachasmimorpha tryoni* Cameron (Hymenoptera: Braconidae), originario de Australia, y *D. longicaudata* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae), originario del sudeste asiático. Los endoparasitoides koinobiontes se caracterizan porque la hembra, al realizar la puesta, no mata al hospedador, sino que es la larva del parasitoide quien le produce la muerte durante su desarrollo. Tras su evaluación, se eligió a *D. longicaudata* para realizar sueltas en la Comunidad Valenciana, debido a su mayor longevidad y por presentar una mayor capacidad que *D. tryoni* para parasitar larvas cuando éstas son escasas (Martins et al., 2010). Siempre y cuando se pueda establecer una cría masiva del insecto eficaz y

económicamente competitiva, este parasitoide se podría considerar como complemento en el control de la plaga mediante la Técnica del Insecto Estéril (TIE) (Djellabi et al., 2021).

Otra especie de parasitoide importante contra *C. capitata* es *Aganaspis daci* (Weld) (Hymenoptera: Figitidae). De origen asiático, este parasitoide se identificó en España parasitando al díptero en higuera y cítricos en 2009. Es un endoparasitoide koinobionte que realiza la oviposición en el último estadio larvario (de Pedro et al., 2013).

Además de individualmente, también se ha estudiado el efecto conjunto de los dos parasitoides, *D. longicaudata* y *A. daci*, sobre el control de *C. capitata*, y se llegó a la conclusión de que ambas especies, al actuar juntas producen un mayor porcentaje de parasitismo que cuando actúan por separado (de Pedro et al., 2019). Otra combinación de enemigos naturales con resultados positivos en el control de *C. capitata* es la del parasitoide *A. daci* y el depredador *Pseudoophonus rufipes* De Geer (Coleoptera: Carabidae), obteniéndose una reducción de casi el 100% en las poblaciones de *C. capitata* debido al efecto aditivo que se consigue al combinarlos (de Pedro et al., 2023).

- *Técnica del insecto estéril (TIE)*. La TIE consiste en la cría masiva de machos esterilizados mediante irradiación. Estos machos se sueltan en el campo para que se apareen con hembras silvestres y las inseminen con esperma estéril, lo que provoca una reducción de huevos fértiles y hace que las densidades de población de moscas se sitúen por debajo del umbral de daños económicos. Para aumentar la eficiencia de la TIE, solo se liberan machos, y para ello se han desarrollado cepas de sexado genético, que tienen distintos marcadores de selección como pupa blanca y sensibilidad letal a la temperatura (Porrás et al., 2020).

En Valencia, en 2007 se inició un programa de TIE con machos estériles Vienna-8 (cepa con los marcadores genéticos comentados anteriormente). Con este programa se protege un área de más de 140.00 hectáreas, y cada año se producen entre 13 y 15 millones de pupas de machos estériles para la liberación de los adultos vía aérea (Plá et al., 2021).

La TIE se debe complementar con otras medidas de gestión como el control biológico aumentativo, ya que podría tener un efecto sinérgico para el control de *C. capitata*, como ya se ha visto que ocurre con el tefrítido *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) al combinar el parasitoide *D. longicaudata* y la cepa de macho estéril Tap-7 (Montoya et al., 2023). Además, también se ha evaluado la posibilidad de que los machos estériles actúen como vectores de agentes de biocontrol microbiológicos, concretamente, de esporas de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Metarhizium brunneum* (Metschnikoff) Sorokin y *Cordyceps fumosorosea* (Wize) (Plá et al., 2021).

- *Quimioesterilización*. La quimioesterilización consiste en la esterilización de la mosca por medio de un regulador del desarrollo, siendo el lufenurón el más utilizado (Navarro-Llopis et al., 2007).

Estudios de campo realizados en Valencia con dispositivos de atracción y esterilización con lufenurón mostraron que a partir del segundo año de tratamiento y hasta el cuarto (duración del estudio), se produce una disminución notable en las

poblaciones de *C. capitata* (Navarro-Llopis et al., 2007). Sin embargo, en la actualidad, la quimioesterilización no se lleva a cabo por la prohibición del lufenurón, cuya venta fue cancelada en España en 2020, según el Registro de Productos Fitosanitarios del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (consultado el 3 de agosto de 2024).

- *Atracción y muerte*. En sentido amplio, la técnica de atracción y muerte consiste en la utilización de un atrayente para llevar al insecto hasta un agente de control que le provoque finalmente la muerte. Esta definición engloba a la técnica de trampeo masivo (*mass trapping*) y a las estaciones cebo (*bait stations*). En el trampeo masivo la mosca queda retenida por el adhesivo que se encuentra en la estructura de la trampa, muere por un plaguicida o se ahoga en agua (Giunti et al., 2023), mientras que en las estaciones cebo el individuo no queda retenido y puede morir, ser esterilizado o irse infectado con algún microorganismo tras el contacto o la ingestión de una formulación. Estudios realizados en cultivos de cítricos en Valencia muestran que el uso de técnicas de atracción y muerte reducen de forma efectiva las poblaciones de *C. capitata* manteniéndolas bajo el umbral de daño económico (Navarro-Llopis et al., 2013).

La mayoría de los dispositivos usados contra *C. capitata* cuentan con atrayentes alimenticios, y tienen como objetivo atraer a hembras adultas antes de la ovoposición. Entre los componentes de atracción, los más usados son acetato de amonio, trimetilamina y putrescina (Giunti et al., 2023). Los insecticidas autorizados actualmente para su uso en las trampas de captura masiva en cítricos son los piretroides deltametrina, esfenvalerato, o el  $\lambda$ -cihalotrin, de acuerdo con el Registro de Productos Fitosanitarios (consultado el 3 de agosto de 2024).

### 1.3 El cotonet de Sudáfrica.

#### 1.3.1 Origen.

*Delottococcus aberiae* es una plaga detectada por primera vez en España, en Benifairó de les Valls, Valencia, hace solo 15 años, en 2009, siendo una de las especies de cochinilla más recientemente introducida en la cuenca mediterránea (Pérez-Rodríguez et al., 2017).

El género *Delottococcus* es originario de Sudáfrica, y se creía que la introducción en España podría estar relacionada con la importación de cítricos o plantas ornamentales procedentes de la zona (Beltrà et al., 2013). Posteriormente, estudios basados en técnicas moleculares han establecido que la población invasora proviene efectivamente de cultivos de cítricos de la provincia de Limpopo, ubicada en el noroeste de Sudáfrica (Beltrà et al., 2015), si bien en esta zona *D. aberiae* se encuentra mayoritariamente en el olivo y en las partes basales del arbusto *Chrysanthemoides monilifera* (L.) T. Norl (Pérez-Rodríguez et al., 2018). En España se ha establecido sobre cítricos, caqui, níspero y granado (Gil et al., 2022).

### 1.3.2 Biología.

*Delottococcus aberiae* solo presenta reproducción sexual. Tras la cópula, la hembra realiza la puesta de huevos en ovisacos, y como diferencia respecto al resto de pseudocóccidos, puede producir varios ovisacos de los cuales se separa (MAPA, 2024). Tras la eclosión de los huevos, los individuos pasan por dos estadios ninfales y, después, las hembras y los machos comienzan a desarrollarse de forma diferente. Los machos pasan entonces por dos estadios pupales (prepupa y pupa) dentro de un capullo algodonoso antes de convertirse en machos adultos alados, mientras que las hembras pasan por una tercera fase ninfal antes de convertirse en hembras adultas y, en este caso, no desarrollan alas ni sufren una metamorfosis, solo se diferencian de las ninfas por el aumento de tamaño (Vacas et al., 2019). Este pseudocóccido presenta numerosas generaciones que se solapan a lo largo del año, al igual que otros pseudocóccidos. El máximo poblacional de *D. aberiae* suele producirse entre el 15 de junio y el 30 de julio, aunque en los últimos años se están observando máximos de captura de machos en agosto y repuntes en el mes de octubre (Navarro-Llopis et al., 2022).

Esta plaga se asocia en la Comunidad Valenciana con cítricos principalmente. Su gran importancia en cítricos viene dada por la reducción del tamaño de los frutos y por la grave deformación que causa en éstos. Además, también produce otros problemas más generales, asociados a todas las cochinillas, como la reducción del vigor y la producción de melaza. Esta sustancia promueve la aparición de hongos como la negrilla reduciéndose así, secundariamente, la tasa fotosintética del árbol (Beltrà et al., 2015). Los daños se han observado en naranjas del grupo Navel, Valencia y Sanguinas, así como en diferentes variedades de mandarinos e híbridos, sin que se haya observado una predilección clara por una variedad o grupo concreto (Tena et al., 2016). El ataque y daño de los frutos se puede producir desde la floración hasta el mes de julio (fruto pequeño, de un tamaño de 2,5 – 3 cm) (Tena et al., 2014). Es importante remarcar que el periodo en el que el porcentaje de daño es mayor es aquel que abarca desde el fruto recién cuajado hasta que éste adquiere 1 cm de diámetro (Soto, 2016).

Recientemente se han realizado estudios sobre las interacciones que establece esta cochinilla con hormigas nativas mediterráneas, destacando la relación mutualista entre *D. aberiae* y la hormiga *Lasius grandis* Forel (Hymenoptera: Formicidae) en cultivos de cítricos. La cochinilla obtiene de esta relación protección contra depredadores y parasitoides como los encírtidos, contribuyendo así la hormiga al establecimiento y dispersión de la plaga (Plata et al., 2024).

### 1.3.3 Métodos de control.

Inicialmente el método de control de este cotonet residía en la aplicación de insecticidas de amplio espectro como clorpirifos y metil clorpirifos, siendo necesarias de una a dos aplicaciones entre la caída de pétalos y junio (Pérez-Rodríguez et al., 2018). Desde la prohibición de estas materias activas por parte de la Comisión Europea en 2020, los únicos químicos de síntesis permitidos actualmente para el control de cochinillas harinosas (Pseudococcidae) en cítricos son deltametrina, acetamiprid y piriproxifen, pero hay otras materias activas autorizadas como aceite de naranja, de parafina o maltodextrina. En cuanto a los químicos nombrados, el acetamiprid es el más eficaz tanto para ninfas como para ovisacos, mientras que la deltametrina tiene cierta eficacia sobre ovisacos (MAPA, 2024).

Pese a la eficacia de estas sustancias activas, el control químico lleva asociado inconvenientes como el desarrollo de resistencias cruzadas, toxicidad contra enemigos naturales y efectos ambientales desfavorables, además de que las nuevas normativas restringen cada vez más el uso de plaguicidas, por lo que sería deseable apoyarse más en otros métodos alternativos y no tanto en el químico. Entre los métodos alternativos se encuentra el control biológico y el método de atracción y muerte mediante trampeo masivo.

Este último se ha podido desarrollar gracias al trabajo realizado por Vacas et al., (2019) en el CEQA-IAM de la Universitat Politècnica de València (UPV), en colaboración con la empresa Ecología y Protección Agrícola SL (EPA SL) y la Consellería de Agricultura de la GVA, para aislar e identificar la feromona sexual que producen las hembras vírgenes para atraer a los machos. Esta feromona se integra en un dispositivo, producido por EPA SL y comercializado con el nombre de Vynyty Citrus® por Bayer Crop Science España SL. Este dispositivo combina el efecto atrayente de feromonas sexuales de eficacia probada para 3 especies de insectos de la familia Coccoidea (*Aonidiella aurantii* Maskell, *Planococcus citri* Risso y *D. aberiae*), junto con una piretrina natural como insecticida. Este dispositivo se coloca desde principios de febrero a marzo con una densidad de un dispositivo por árbol. Se ha observado que con este dispositivo no se llega a controlar las poblaciones muy altas en una sola generación, pero sí disminuye las poblaciones paulatinamente a lo largo de generaciones sucesivas (MAPA, 2024).

La feromona también se utiliza para conocer la densidad poblacional de *D. aberiae* utilizando trampas blancas pegajosas con emisores de caucho tipo tapón de goma impregnados con la feromona sexual de la especie. Gracias a estas trampas se ha podido establecer una red de detección y seguimiento de este pseudocócido en la Comunidad Valenciana (Navarro-Llopis et al., 2022).

Respecto al control biológico de *D. aberiae*, éste se encuentra todavía en desarrollo. No hay enemigos naturales presentes en la Comunidad Valenciana que controlen la plaga de forma eficaz, ya que los depredadores, principalmente el coccinélido *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae), aparecen cuando el daño en el fruto ya está hecho, y los parasitoides presentes son incapaces de parasitar a las poblaciones de cochinilla por diversos motivos (Tena et al. 2017; Soto et al., 2020). Esto llevó a la búsqueda de parasitoides en la región de procedencia de *D. aberiae*, encontrando que dos especies de himenópteros no descritas hasta ese momento, *Anagyrus aberiae* Guerrieri (Hymenoptera: Encyrtidae) y *Allotropia delottococci* Förster (Hymenoptera: Platygasteridae), eran las que más parasitaban a este cotonet (Soto et al. 2020). *Anagyrus aberiae* fue la seleccionada, en un primer momento, para su importación a España y su establecimiento permanente en parcelas de cítricos. Cabe destacar que este parasitoide es capaz de atacar a todos los estadios de desarrollo del cotonet, pero tiene preferencia por las hembras adultas; además, muestra especificidad por *D. aberiae*, siendo su capacidad de parasitar a otras cochinillas como *Pseudococcus viburni* Signoret y *Pseudococcus longispinus* (Targioni Tozzetti) muy baja (Soto et al. 2020). Desde la primera suelta del parasitoide en campo en abril de 2020 hasta finales de 2021 no se consiguió un control eficaz de la plaga debido a su bajo establecimiento y al porcentaje de parasitismo, ya que varía en función de la época y aumenta coincidiendo con el descenso de las poblaciones de cotonet (Baixauli, 2021).

Otra estrategia dentro del biocontrol que se está evaluando gira en torno a la relación mutualista entre *L. grandis* y *D. aberiae*, según la cual, la hormiga ofrece protección al cotonet y favorece su dispersión. En base a esto, como medida de gestión de la plaga se está considerando excluir la presencia de hormigas en los árboles, ya que se ha visto que esto permite un aumento de la abundancia de predadores generalistas, como crisopas y arañas, y se reduce la densidad de las poblaciones y la proporción de frutos dañados por *D. aberiae* (Plata et al., 2023).

#### **1.4 Control biológico mediante nematodos entomopatógenos.**

Debido a la reciente normativa introducida por la Comisión Europea en el 2020 en el marco del Pacto Verde Europeo, los agricultores están obligados a reducir el uso de productos fitosanitarios químicos en un 50% para 2030, tomando de esta forma gran peso otros métodos de protección de cultivos, como el control biológico, dentro del cual se enmarca el control microbiológico (Holka y Kowalska, 2023). Los agentes entomopatógenos de control microbiológico son los hongos, bacterias, virus, protozoos y nematodos.

Algunos ejemplos de agentes entomopatógenos efectivos contra plagas son las bacterias del género *Bacillus* (destacando *Bacillus thuringiensis*), *Clostridium* o *Pseudomonas*. Entre los hongos destacan *Metarhizium acridum* (Driver y Milner), *Akanthomyces lecanii* (Zimm.), *B. bassiana* o *C. fumosorosea*, que son ampliamente comercializados y utilizados como bioplaguicidas debido a su amplio espectro de infección. Entre los virus entomopatógenos destacan los Baculovirus, que pueden infectar y matar a gran cantidad de insectos plaga, teniendo cada especie especificidad por un insecto; son especialmente utilizados contra orugas de lepidópteros y, al igual que las bacterias, deben ser ingeridos para causar la muerte del insecto. Por último, en el caso de los protozoos destaca el uso del microsporidio *Nosema pyrausta* (Paillot) en Europa para regular las poblaciones del taladro del maíz, *Ostrinia nubilalis* (Hübner). Este protozoo aún está en etapas iniciales de desarrollo comercial (Sabbahi et al., 2022). El caso de los nematodos entomopatógenos se va a desarrollar en profundidad ya que es el agente entomopatógeno de control biológico utilizado en este estudio.

Los nematodos entomopatógenos (NEP) son un tipo de nematodos parásitos de insectos utilizados mediante control biológico inundativo (Rahoo et al., 2017). Se caracterizan por encontrarse asociados a bacterias entomopatógenas. En esta asociación, los nematodos infectivos juveniles (IJs) se encuentran en el suelo, esperando un insecto susceptible al que infectar. Una vez el huésped entra en contacto con el IJ, estos penetran al cuerpo del insecto a través de aperturas naturales como ano, boca o espiráculos, o los hay capaces de entrar por tejidos blandos como la membrana intersegmental. Una vez el IJ se encuentra dentro del insecto, en el hemocele libera las bacterias simbióticas, que proliferan rápidamente y secretan diversas exoenzimas, metabolitos tóxicos y factores de virulencia que matan al hospedador en un periodo de 24 – 48 horas (Ciche y Ensign, 2003). El nematodo completa su ciclo en el interior del insecto, y tras dos o tres generaciones en su interior, cuando la comida es escasa, los IJs emergen y buscan nuevos hospedantes que infectar (Cruz-Martínez et al., 2017).

Los NEP han sido descritos en unas 23 familias distintas, pero los principales con mayor interés para el control biológico pertenecen a las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* (Lacey y Georgis, 2012), y estos parásitos de insectos se pueden encontrar de forma natural en suelos (Jean-Baptiste et al., 2021). En la primera familia destacan los géneros *Steinernema* Travassos y *Neosteinernema* Nguyen y Smart, mientras que en la segunda destacan los géneros *Heterorhabditis* Poinar (Thanwisai et al., 2022) y *Oscheius* Andrassy (Elqdhly et al., 2024). Todas las especies de estos géneros han evolucionado de forma mutualista con bacterias entomopatógenas que se encuentran en la parte anterior del intestino; en el caso de *Steinernema*, con *Xenorhabdus*, en el caso de *Heterorhabditis* con *Photorhabdus* (Singh et al., 2022), y en el caso de *Oscheius* con *Serratia* (Elqdhly et al., 2024). Para *Neosteinernema* aún no se ha identificado la bacteria asociada (Thanwisai et al., 2022).

Las tres bacterias, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus* y *Serratia*, son un ejemplo de convergencia evolutiva, ya que han desarrollado un mutualismo con su nematodo de forma independiente. La relación mutualista entre nematodo y bacteria se explica de la siguiente manera: el nematodo le ofrece refugio y protección a la bacteria y la transporta al intestino medio del insecto, mientras que el papel de la bacteria es matar al insecto hospedante, degradar el tejido del intestino medio, evitar que en el cadáver se desarrollen otros microorganismos del suelo y proteger al nematodo de la respuesta inmune del hospedador (Clarke, 2008). Estas tres bacterias pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y una característica que diferencia estos géneros del resto de bacterias de esta familia es que su ciclo de vida pasa por tres fases consecutivas: fase forética en el nematodo huésped, fase patógena en el cuerpo del insecto y fase saprofítica en el cadáver del insecto (Elqdhly et al., 2024).

Numerosas especies y cepas de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* han sido evaluados para el control de plagas, entre los que cabe destacar los nematodos *Steinernema feltiae* Filipjev (Rhabditida: Steinernematidae), *Steinernema carpocapsae*, Weiser (Rhabditida: Steinernematidae) y *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Rhabditida: Heterorhabditidae), entre otros.

Los NEP se han evaluado contra diversos grupos de insectos como Dípteros, Lepidópteros, Isópteros, Hemípteros, Himenópteros o Coleópteros (Labaude y Griffin, 2018). Para el caso concreto de dípteros tefrítidos, hasta ahora se han evaluado un total de 32 especies de NEP contra 18 especies de mosca, centrándose la mayoría de ellos en las especies que mayores daños económicos causan como *C. capitata*, *Bactrocera oleae* (Rossi) o *Rhagoletis cerasi* (Linnaeus). En todos ellos se ha evaluado su susceptibilidad a los NEP en sus distintos estadios de desarrollo y en condiciones de laboratorio y campo. Se ha demostrado que tienen potencial para infectar y matar larvas y adultos, y de esta forma se pueden considerar agentes de control biológico efectivos para estas plagas (Toledo et al., 2023).

En el caso concreto de *C. capitata* los estudios de susceptibilidad a NEP se han probado frente a todos los estadios y, al igual que en el resto de tefrítidos, el estadio más susceptible es el de larva, seguido del de adulto y, por último, el de pupa (infección muy baja o nula). Aunque los estudios en laboratorio son numerosos, las distintas concentraciones de nematodo aplicadas, las distintas cepas y las distintas condiciones experimentales hacen difícil la comparación de los estudios, aunque la eficacia de los

NEP queda demostrada (Shaurub et al., 2021; Loulou et al., 2022; Badr et al., 2024). Los estudios en campo son escasos, pero han demostrado la eficacia de los géneros *Steinernema* (Lindegren et al., 1990; Abdel-Razek y Abd-Elgawad, 2021) y *Heterorhabditis* (Minas et al., 2016) reduciendo las poblaciones de la mosca. Entre todos los nematodos destaca *S. feltiae*, el cual es producido de forma comercial y se ha visto que es capaz de causar una gran mortalidad de mosca, tanto en laboratorio como en campo (Kapranas et al., 2023). En los estudios más recientes se combina el uso de NEP con hongos entomopatógenos para evaluar su efecto conjunto (Gava y Paranhos, 2023).

En el caso de los pseudocóccidos, los estudios de susceptibilidad a NEP siempre se realizan utilizando hembras adultas y, mayoritariamente, contra especies que causan daños en cultivos de Sudáfrica, por ejemplo, *Planococcus ficus* (Signoret) (Vieux y Malan, 2013) o *P. viburni* (Mathulwe et al., 2021), y América, como *Dysmicoccus vaccinii* Miller y Polavarapu (Stuart et al., 1997), *Dysmicoccus brevipes* Cockerell (Zart et al., 2021) o *Saccharicoccus sacchari* Cockerell (Monteiro et al., 2022). En el caso de pseudocóccidos que afectan a cultivos en España los estudios son escasos. Se pueden encontrar estudios contra *P. citri*, importante en cítricos españoles, utilizando aislados de NEP turcos (Najm et al., 2023), sudafricanos (van Niekerk y Malan, 2012) o brasileños (Barbosa Negrisoni et al., 2013), pero no hay estudios para otras plagas importantes de cítricos españoles como *P. longispinus* o *D. aberiae*.

## 2. Justificación y objetivos.

Dados los motivos expuestos anteriormente, las nuevas normativas europeas respecto a la utilización de fitosanitarios hacen necesario el desarrollo de métodos alternativos para el control de plagas. El control microbiológico con NEP podría ser una herramienta efectiva, por lo que en este trabajo se va a evaluar la susceptibilidad de larvas L3 y pupas de *C. capitata*, así como de hembras adultas y machos N2 de *D. aberiae* frente a diferentes productos comerciales conteniendo los NEP de las especies *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae* y *S. feltiae*.

El principal objetivo es valorar una posible estrategia de lucha contra dichas plagas mediante el control de la fase edáfica de su ciclo vital. En el caso de *C. capitata*, las larvas saltan del fruto al suelo para pupar donde permanecen hasta que se forma el adulto. En el caso de las hembras adultas de *D. aberiae* se ha visto que algunas migran a la base del tronco y suelo para poner el ovisaco entre los meses de marzo y mayo (Tena et al., 2014). Para los machos, aún no se ha registrado la presencia de ellos en el suelo, pero es una opción probable debido a que la propia hembra deja el ovisaco en el suelo y, también, por su similitud con otros pseudocóccidos como *P. viburni*, *P. citri* y *P. longispinus* de los que sí se ha registrado, recientemente, la emergencia de machos adultos del suelo (Vercher et al., 2023).

### 3. Material y métodos.

#### 3.1 Insectos.

##### 3.1.1 Ceratitis capitata.

Las larvas y pupas de *C. capitata* utilizadas en los estudios provienen de una cría de laboratorio que se mantiene en las instalaciones del CEQA-IAM de la UPV, bajo condiciones controladas de temperatura ( $25 \pm 1^\circ \text{C}$ ), humedad relativa ( $50 \pm 5\%$ ) y fotoperiodo (16h:8h, luz:oscuridad).

Las moscas adultas se mantienen, con agua y una dieta que consiste en autolisado de levadura y azúcar (1:4, w/w), en jaulas de metacrilato, con una de sus caras siendo de tela de visillo, a través de la cual las hembras realizan la ovoposición. Bajo esta tela se encuentra un envase con agua para la recolección de los huevos. Dos veces a la semana el envase se vacía y se recogen los huevos puestos durante 6 horas. Una vez recogidos, se disponen sobre una dieta elaborada con una mezcla de los siguientes ingredientes: 100 g de salvado de trigo, 25 g de sacarosa, 12,5 g de levadura de cerveza, 1 g de Nipagin™ (metilparabén), 1 g de Nipazol™ (parahidroxibenzoato de propilo), ambos suministrados por la casa comercial Guinama S.L.U. (Valencia, España), 3,75 mL de ácido clorhídrico al 37%, suministrado por Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, España) y 250 mL de agua destilada.

Los huevos sembrados sobre la dieta se mantienen en oscuridad. Transcurridos siete días, el envase con la siembra se coloca sobre una bandeja con arena para que el último estadio larvario (L3) salte a la arena y lleve a cabo la pupación. Esta arena se tamiza todos los días para obtener pupas de una edad determinada. Las pupas obtenidas se guardan en placas Petri con la fecha de obtención y se mantienen en el insectario de cría de *C. capitata* hasta su uso.

##### 3.1.2 Delottococcus aberiae.

Los machos N2 y las hembras adultas de *D. aberiae* utilizadas en este trabajo proceden de una cría de laboratorio mantenida en las instalaciones del CEQA-IAM de la UPV, a una temperatura de  $23 \pm 2^\circ \text{C}$ , un  $50 \pm 10\%$  de humedad relativa y sin fotoperiodo, en régimen de oscuridad constante.

Estas cochinillas se disponen sobre limones verdes procedentes de agricultura ecológica (Rio Tinto Fruit; El Campillo, Huelva). Antes de proceder a la infestación, se lavan los limones para eliminar restos de otras plagas y se cubren con parafina hasta su media sección, para reducir su desecación y acotar la zona en que se pueden asentar los insectos. Sobre la mitad libre del limón se colocan ovisacos para que emerjan las ninfas y se vaya desarrollando la población. Los limones infestados se mantienen en envases de plástico con ventilación en la tapa del envase, a través de tela de visillo.

## 3.2 Nematodos entomopatógenos.

### 3.2.1 Origen y almacenamiento de los nematodos.

Las cepas utilizadas se obtuvieron de Koppert España (La Mojonera, Almería) (productos Capsanem, Entonem y Larvanem) y Biobest España (La Mojonera, Almería) (productos Steinernema-System y Nemaforce® Felti Powder). Los productos utilizados se describen a continuación:

- Larvanem. El ingrediente activo es *Heterorhabditis bacteriophora*, conteniendo un total de 50 millones de IJs en un sobre. La composición es 86% *H. bacteriophora* y 14% material inerte biodegradable. El fabricante es Koppert B.V. (Berkel en Rodenrijs, Holanda). Nº registro España: 484/2007.
- Capsanem. El ingrediente activo de este producto es *Steinernema carpocapsae*, y contiene un total de 50 millones de IJs distribuidos en dos sobres. La composición es 86% *S. carpocapsae* y 14% material inerte biodegradable. El fabricante es Koppert B.V. (Berkel en Rodenrijs, Holanda). Nº registro España: 494/2007.
- Entonem. El ingrediente activo es *Steinernema feltiae*, con un total de 50 millones de IJs en un sobre. La composición es 86% *S. feltiae* y 14% material inerte biodegradable. El fabricante es Koppert B.V. (Berkel en Rodenrijs, Holanda). Nº registro España: 493/2007.
- Nemaforce® Felti Powder (a partir de ahora abreviado como NFP). El ingrediente activo es *Steinernema feltiae*, con un total de 50 millones de IJs en un sobre. El fabricante es Biobest Group N.V. (Westerlo, Bélgica). Nº registro España: 026/2024
- Steinernema-System (a partir de ahora abreviado como SS). El ingrediente activo es *Steinernema feltiae*, en una formulación de tipo gel que contiene 50 millones de IJs en una bandeja de plástico en una caja de cartón. El fabricante es Biobest Group N.V. (Westerlo, Bélgica). Nº registro España: 509/2007

Las cajas de estos productos (Figura 1) se guardan antes y después de cada uso en una cámara fría programada a  $5 \pm 1^\circ \text{C}$ .



Figura 1. Cajas de los productos.

### 3.2.2 Preparación de los nematodos.

La preparación de los nematodos se inicia pesando entre 150 y 300 mg del producto comercial en un tubo Falcon de 50 mL. Posteriormente, los nematodos se hidratan añadiendo 10 mL de agua destilada estéril al tubo y se tapa con papel de aluminio para protegerlo de la luz solar. Para poder determinar la concentración de nematodos en la suspensión original, a partir de ésta se realizan 2 diluciones (1/5 y 1/10). Diez microlitros de cada dilución se colocan sobre un portaobjetos y se observan en el microscopio estereoscópico con el fin de seleccionar la que contiene una cantidad adecuada de nematodos para poder realizar un recuento seguro.

Posteriormente, de la dilución elegida se colocan 15 gotas de 10 µl en un portaobjetos (Figura 2) y, utilizando la lupa, se realiza el recuento de nematodos de todas ellas (Figura 3).



Figura 2. Portaobjetos con las 15 gotas sobre las que se realiza el recuento.



Figura 3. Detalle de una gota bajo la lupa binocular. Ampliación 20x.

El recuento se hace únicamente de los individuos viables. Los muertos, identificables por su típica forma en lanza (Figura 4), no se consideran en el recuento.



Figura 4. Nematodos muertos con su característica forma en lanza (círculo rojo). Ampliación 20x.

El número de nematodos vivos por 10 µL se calculó como el valor medio del recuento de las 15 gotas. A partir de este valor se obtuvo la concentración de NEP por mL, que será la base para preparar las concentraciones a evaluar en los diferentes bioensayos.

### 3.3 Determinación de la patogenicidad de los nematodos frente a *Ceratitis capitata*.

La patogenicidad de cada NEP se evaluó en placa Petri frente al tercer estadio larvario y frente a pupas de 4 – 5 días, en ambos casos a una dosis de 300 IJs por individuo. A su vez, dentro del tercer estadio larvario (L3) la susceptibilidad se evaluó frente a larvas L3 tempranas (aquellas que tardarán en pupar más de 24 h) y L3 tardías (cuya pupación se realizará en menos de 6 h). La selección de las larvas L3 se hizo en función de su tamaño, las cuales tienen unas dimensiones características de entre 6,5 y 9 mm de largo y 1,2 y 1,5 mm de ancho (Elqdhly et al., 2024).

La obtención de los individuos a ensayar, justo en el preciso momento establecido, se realizó de la siguiente forma:

- Obtención de pupas. Días antes a la realización del ensayo se tamizó la tierra sobre la que se encuentra la dieta para conseguir pupas del tiempo deseado. Se tamizó en días consecutivos para conocer el tiempo exacto de desarrollo de la pupa y se seleccionó el rango de 4-5 días.
- Obtención de larvas.
  - Larvas L3 tardías: inmediatamente antes de realizar el bioensayo se tamizó la arena bajo la dieta para recuperar las larvas que habían saltado de la dieta y aún no habían pasado a pupa.
  - Larvas L3 tempranas: el día del bioensayo se coge dieta con larvas que han estado evolucionando desde huevo, aproximadamente, 7-8 días y, con mucho cuidado, se van seleccionando las larvas con un tamaño superior a 6,5 mm de longitud.

Para evaluar la patogenicidad de los distintos NEP, 10 larvas o pupas se colocaron en placas Petri de 55 mm de diámetro que contenían, cubriendo toda la superficie de la base, papel de filtro estéril. El ensayo consistió en aplicar sobre el papel de filtro, con una micropipeta, 3000 IJs en un volumen de 500µL (es decir, 300IJs/50µL por individuo). En el caso del control se aplicaron 500µL de agua destilada estéril. Posteriormente, las placas se sellaron con Parafilm y se dejaron en el insectario de cría de *C. capitata*, durante 72 horas, en oscuridad. Pasado este tiempo, los individuos son lavados de forma superficial con agua destilada, y cada uno ellos se coloca sobre una gota de agua (Figura 5) y se abren con un bisturí para determinar la presencia de nematodos en su interior (Figura 6), cuantificando, de esta forma, el nivel de infección por los nematodos. Para cada tratamiento, se realizaron 5 réplicas (placas) por bioensayo y un total de 2 bioensayos.

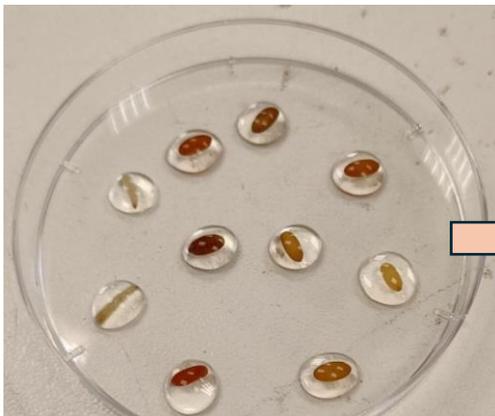


Figura 5. Larvas/pupas de *C. capitata* de una placa sobre gotas de agua.



Figura 6. Dos pupas de *C. capitata* disecionadas (izq.) y una sin disecionar (dcha.). Ampliación 6,3x.

### 3.4 Determinación de la patogenicidad de los nematodos frente a *Delottococcus aberiae*.

La patogenicidad de cada NEP fue evaluada en placa Petri de 55 mm de diámetro con papel de filtro estéril sobre su base (10 individuos/placa) frente a machos N2 y hembras adultas, independientemente, a una dosis de 200 IJs/cochinilla. En el caso de los machos, se aplican 40µL por cochinilla (400 µL/placa), mientras que para las hembras el volumen aplicado por cochinilla es de 50µL (500 µL/placa).

La diferenciación entre hembras adultas y machos N2 se realiza por el tamaño y el color. Los machos tienen una coloración más oscura y tienen un tamaño menor, además de poder empezar a observar los primeros filamentos del capullo algodonoso que producen (Figura 7).



Figura 7. *Delottococcus aberiae* vistos en la lupa (Ampliación 12,5x). Las flechas amarillas señalan a los machos N2, mientras que los círculos marcan a hembras adultas.

Tras la aplicación del nematodo, estas placas se sellan con Parafilm y se dejan en el insectario de cría de *D. aberiae*.

Estas placas se revisan a las 24, 48, 72 y 96 horas en el caso de hembras, y hasta las 72 horas en el caso de machos para registrar la evolución de la mortalidad. Para determinar si un individuo está vivo o muerto se golpea ligeramente con una aguja de punta roma, y se asume que está vivo si hay respuesta al estímulo. Los individuos muertos y que se pueden recuperar, se colocan sobre una tela de visillo dispuesta encima de un recipiente. Los individuos que no se pueden recuperar de la placa debido a que se encuentran en un estado avanzado de descomposición, se registran como muertos sin posibilidad de evaluar la infección por el NEP (Figura 8).



Figura 8. Ejemplo de cottonet que no se puede recuperar del screening. Se caracterizan porque se deshacen al intentar recuperarlos para colocarlos sobre la tela de visillo. El círculo rojo rodea el surco realizado en su cuerpo al intentar cogerlo (Ampliación 50x).

A los individuos que se han recuperado y se encuentran sobre la tela de visillo se les echa 3 mL de agua destilada estéril con una micropipeta para lavarlos superficialmente, de forma que se elimine cualquier nematodo que pudiese estar sobre la superficie del insecto. Después, se colocan en placas multipocillo de 96 (Biologix Europe GmbH; Hallbergmoos, Alemania). En cada pocillo se vierten previamente 200  $\mu$ L de agua destilada estéril, y sobre esta agua se deposita la cochinilla muerta, quedando cada pocillo con un insecto. Estas placas se trasladan al insectario de cría del cotonet.

Transcurridas de 48 a 72 horas (horquilla de tiempo independiente a que sean machos o hembras), se observan los pocillos bajo la lupa. Los individuos de los pocillos que contienen una cantidad abundante de nematodos en el fondo se establecen como muertos por acción de los mismos (Figura 9). El resto de los individuos se diseccionan, utilizando agujas entomológicas y bajo microscopio estereoscópico, para determinar la presencia de nematodos en su interior (Figura 10).



Figura 9. Pocillo con gran cantidad de nematodos en el fondo que han salido del interior de la cochinilla (Ampliación 20x).



Figura 10. Cotonet diseccionado con las agujas. Se observa como sale un nematodo de gran tamaño de su interior (flecha amarilla) (Ampliación 32x).

Cada bioensayo consistió en 4 repeticiones (placas) por tratamiento y se realizaron un total de dos bioensayos.

### 3.5 Determinación de la virulencia de *Larvanem (Heterorhabditis bacteriophora)* frente a *Delottococcus aberiae*.

Una vez evaluada la patogenicidad de los distintos NEP, se seleccionó el que mostró mayor potencial de control, tanto sobre machos como sobre hembras de *D. aberiae*, para evaluar su virulencia a partir de un estudio dosis-respuesta. El ensayo se diseñó para realizarse en tierra, buscando ya una metodología más cercana al uso del nematodo en condiciones de campo cuando es aplicado en suelo.

La tierra utilizada en los ensayos procede de una parcela de cítricos de la localidad de Chiva (Valencia) y corresponde a una porción del suelo de hasta, aproximadamente, 10 cm de profundidad. Se llevó al laboratorio, donde se pasó por un tamiz de 2 mm, utilizándose la porción de tamaño de partícula inferior a los 2 mm. Posteriormente, la tierra se secó a 80 °C, durante 2 días, en estufa de vacío y se esterilizó en autoclave a 121° durante 30 min.

Para realizar el ensayo dosis-respuesta se probaron 4 dosis distintas: 50, 100, 200 y 400 nematodos/cochinilla, además del control.

El estudio se realizó en placas de 55 mm de diámetro en cuya tapa se realizó un agujero de 5 mm. En cada placa se pusieron 18 gramos de tierra con una humedad relativa del 20% (previamente esta tierra ha sido secada en la estufa de vacío).

El montaje de las placas para la aplicación del nematodo es el siguiente (Figura 11): en un vaso de 120 mL se homogenizan los 18 gramos de tierra con 2,7 mL de agua destilada. Tras esto, en la placa se colocan entre 15 y 16 gramos de tierra húmeda. Sobre ella se coloca tela de visillo y encima 10 cochinillas, las cuales se cubren con una segunda tela de visillo (esto se hace para facilitar su localización y recuperación) y, por último, los 2 – 3 gramos de tierra restantes. Sobre esta tierra se aplican las distintas dosis de los nematodos en un volumen de 900  $\mu$ L, que es el restante para que la placa alcance el 20% de HR. En el caso del control se añaden 900  $\mu$ L de agua destilada estéril. Por último, la placa se tapa y se asegura con una goma. Se preparan 4 placas (repeticiones) por tratamiento, y el bioensayo entero se realiza tres veces de forma independiente.

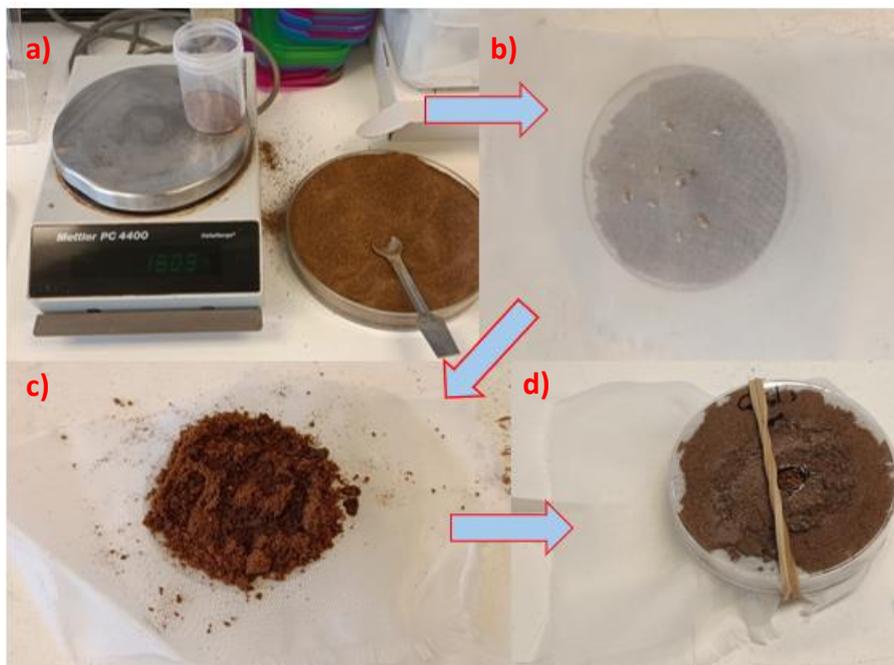


Figura 11. Proceso de montaje de las placas para el ensayo dosis-respuesta. a) Peso de 18 gramos de tierra. b) 15 - 16 gramos de tierra + tela de visillo y cotonet. c) Tela de visillo + tierra restante sobre el cotonet. d) Se pone la tapa y se asegura con una goma.

Las placas montadas y tratadas se meten en cajas de metacrilato con tapa (dimensiones: 24,5 cm de alto, 30 cm de ancho y 25 cm de fondo). Estas cajas tienen ventilación en un lateral mediante apertura con tela de visillo (dimensiones: 13 cm de alto y 20 cm de ancho). En el interior de la caja se coloca un envase con 4,2 – 4,5 g de algodón con 50 mL de agua para que se mantenga la humedad en el interior. La caja se mantiene en el insectario de cría de *C. capitata*. Se monta una caja para el ensayo de las hembras y otra caja para los machos (Figura 12).

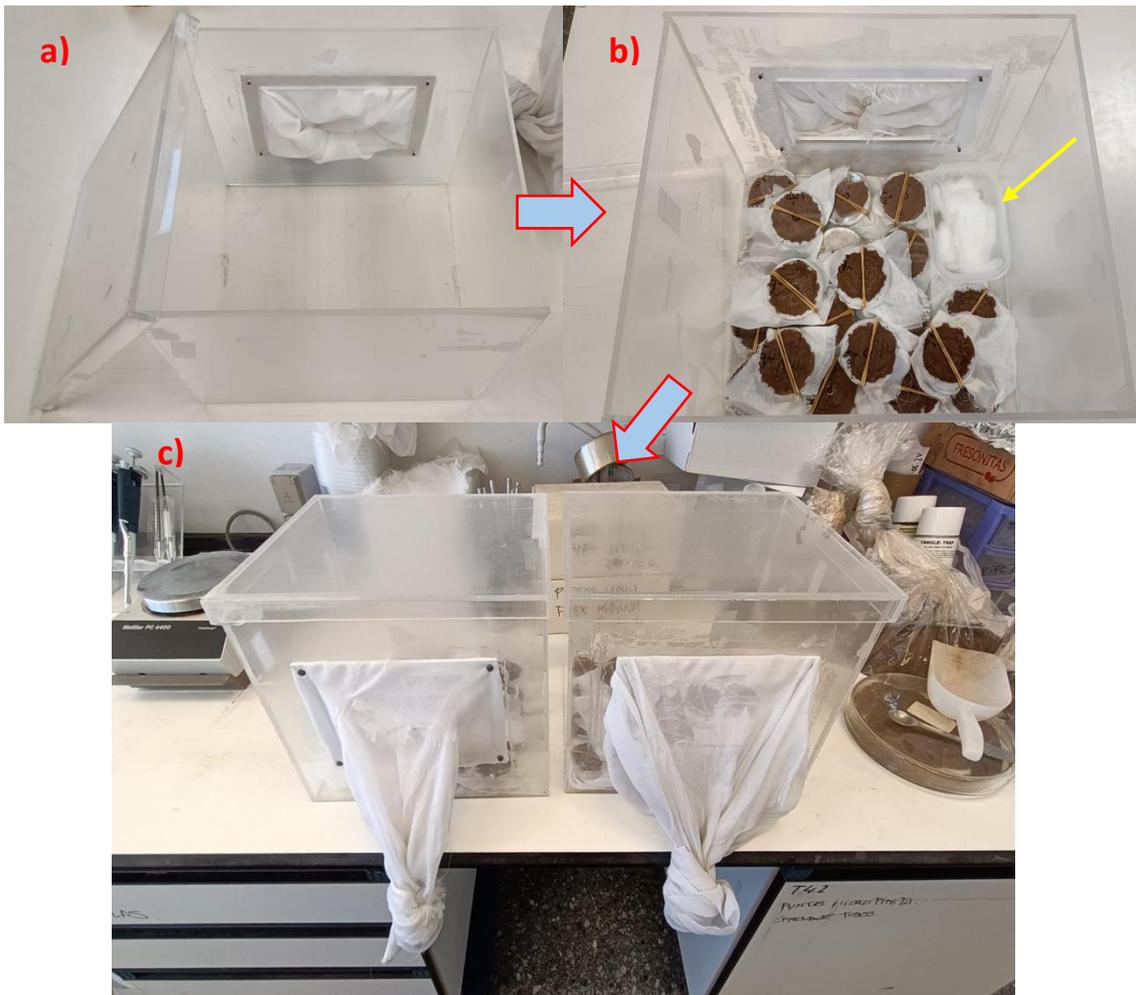


Figura 12. Proceso de montaje de las cajas para el ensayo dosis-respuesta. a) Caja de metacrilato en la que se observa la apertura lateral con la manga de visillo. b) Caja llena con placas montadas y con la fuente de humedad (algodón empapado con agua destilada) (flecha amarilla). c) Cajas separadas para machos y hembras.

Estas placas se revisan a las 96 horas en el caso de hembras y a las 72 horas en el caso de machos. Para valorar la mortalidad se procede según lo descrito en el apartado 4, distinguiendo también entre los individuos muertos recuperables y los que no se pueden recuperar (Figura 13).



Figura 13. Ejemplo de individuo que no se puede recuperar en el ensayo dosis-respuesta. Se caracterizan porque se deshacen al intentar cogerse para colocarlo sobre la tela de visillo.

El círculo rojo rodea el surco realizado en su cuerpo al intentar cogerlo. Las flechas amarillas señalan nematodos sobre el cadáver (Ampliación 50x).

Para este ensayo se hizo un seguimiento de la humedad para conocer su disminución con el paso del tiempo y así determinar si era necesario realizar alguna modificación para que se mantuviese alrededor del 20% si esta disminuía mucho. Las medidas de la humedad se hicieron el mismo día de aplicación de agua a la tierra (T0) y a las 48, 72 y 96 horas tras esto.

Para determinar la humedad en cada tiempo lo que se hace es con un sacabocados de acero extraer alrededor de un gramo de tierra de una placa. La tierra extraída se pesa y posteriormente se lleva a la estufa de vacío para secarla durante unas 6 horas. La arena seca se pesa de nuevo y así se determina la humedad que ha perdido y el porcentaje de humedad en la placa.

Esta placa es extra y únicamente tiene los 18 gramos de tierra al 20% de humedad, no hay cochinillas ni tela de visillo. Se realizan extracciones de dos placas en cada tiempo.

### **3.6 Análisis estadístico.**

Tras realizar el screening con los diferentes formulados de NEP, los porcentajes medios de mortalidad obtenidos para cada sexo y cada tiempo de evaluación se compararon mediante un análisis de la varianza (ANOVA) simple. La variable respuesta fue el porcentaje de mortalidad y el factor considerado fue el tratamiento (control, Larvanem, Capsanem, Entonem, NFP y SS). Previamente al análisis se comprobó mediante un gráfico de probabilidad normal si los datos se ajustaban a esta distribución, y en caso negativo se les aplicó una transformación  $\arcsen(\sqrt{x})$  para homogeneizar la varianza y cumplir con los requisitos del ANOVA. Tras el ANOVA se aplicó un test de múltiple rango LSD (*Least Significant Differences*;  $P < 0,05$ ) para saber qué tratamientos eran significativamente diferentes. Adicionalmente, se guardaron los residuos de cada análisis para comprobar que seguían una distribución normal. Estos análisis se realizaron con el software STATGRAPHICS Centurion 19, versión 19.1.2. Se siguió el mismo procedimiento para el análisis de los resultados de los ensayos dosis-respuesta; en este caso, introduciendo el porcentaje de mortalidad como variable respuesta y la dosis de nematodos como variable explicativa. Este procedimiento también fue el seguido para determinar las diferencias existentes entre los porcentajes de individuos muertos con nematodos en su interior confirmados mediante disección acumulados a las 72 horas en machos y a las 96 horas en hembras según el tratamiento. El porcentaje de individuos muertos con nematodo en su interior, respecto del porcentaje de individuos muertos, es la variable respuesta, mientras que la variable explicativa es el tratamiento en el screening inicial, y la dosis de nematodos en el ensayo dosis – respuesta.

Los cálculos relacionados con la curva de supervivencia (estimador de Kaplan-Meier y posterior Mantel-Cox) se realizaron con el software IBM® SPSS® Modeler v. 16. A partir de los datos obtenidos en el screening inicial, se definen los eventos muerte y censura de forma binaria (1 y 0, respectivamente), y el factor, que son los tratamientos: control, Larvanem, Capsanem, Entonem, NFP y SS. Con la variable del tiempo, el evento, y el factor se obtiene la curva de supervivencia para cada tratamiento según las horas. Con este mismo procedimiento se obtiene también la estimación del tiempo medio de supervivencia para cada tratamiento. Para determinar si existen diferencias significativas entre las distintas curvas primero se ejecuta una prueba Log-Rank (Mantel-Cox)

combinada, y si existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), se aplica entonces una prueba Log-Rank (Mantel-Cox) por pares para conocer entre qué tratamientos existen esas diferencias.

Los datos obtenidos en el ensayo dosis-respuesta se emplearon en una regresión Probit y su posterior análisis para la determinación de la dosis letal al 50% ( $DL_{50}$ ) y los intervalos de confianza. Para realizar la regresión Probit se determina como variable dependiente la mortalidad, previamente codificada de forma binaria (0 para individuo vivo, y 1 para individuo muerto), y como variable independiente (factor) la dosis. Como la significancia es inferior a 0,05 tanto en machos como hembras no es necesario aplicar el factor de heterogeneidad. Estos análisis se realizaron con el software IBM® SPSS® Modeler v. 16.

## 4. Resultados.

### 4.1 Patogenicidad de los nematodos frente a *Ceratitis capitata*.

En este trabajo se ha evaluado la susceptibilidad de diferentes estadios de desarrollo de *C. capitata* frente a los formulados de los nematodos seleccionados. Concretamente, los estudios se centraron en el posible efecto de estos sobre larvas de tercer estadio de desarrollo, diferenciando entre larvas tempranas y tardías, así como frente a pupas por ser los estadios susceptibles de ser controlados mediante la aplicación de los nematodos en el suelo.

El estadio más susceptible a la infección por nematodos fue el de las larvas L3, y más concretamente, las larvas L3 tempranas (Figura 14). En particular, presentaron especial susceptibilidad frente a Entonem (*S. feltiae*), obteniéndose una media del 7% de infección (7 individuos infectados en total de los 100 empleados y diseccionados). Para larvas L3 tardías, de todos los individuos diseccionados en los dos ensayos (n=500), solo tres individuos fueron infectados, sin destacar un nematodo en concreto (1% de infección para Capsanem, Entonem y SS; n=100 para cada tratamiento teniendo en cuenta los dos bioensayos). En el caso de las pupas, ninguno de los IJs de los NEP probados fue capaz de causar infección.



Figura 14. Disección de una larva de *C. capitata*. El círculo rojo marca nematodos que han salido de su interior. Ampliación 32x.

Debido a la escasa o nula actividad de estos nematodos frente a *C. capitata*, no se prosiguieron los estudios en torno a esta plaga.

### 4.2 Patogenicidad de los nematodos frente a *Delottococcus aberiae*.

Para *D. aberiae* se estudió la patogenicidad de los 5 productos frente a hembras adultas y machos N2 para determinar si alguno de ellos supone una potencial herramienta para el control de esta cochinilla, en principio, cuando se encuentra en el suelo.

#### 4.2.1 Establecimiento de las condiciones experimentales.

Previamente a la realización de los ensayos biológicos destinados a evaluar la patogenicidad de los nematodos, se tuvieron que establecer las condiciones experimentales en las placas Petri, que resultaron ser diferentes para machos y hembras. Estas pruebas preliminares nos permitieron fijar los periodos de evaluación de la actividad de los nematodos (96 horas para hembras y 72 horas para machos), así como,

los volúmenes de agua por placa para aplicar los NEP (500  $\mu$ L para las hembras y 400  $\mu$ L para los machos). En el caso de las hembras, las condiciones iniciales de 500  $\mu$ L y 96 horas de evaluación fueron capaces de mantener la mortalidad en las placas control siempre en niveles muy bajos hasta el final del ensayo (entre el 2,5% y el 15%), mientras que la mortalidad era muy alta en machos (entre el 47,78% y el 77,17%) en esas condiciones, probablemente debido a un exceso de agua. En este caso, la mortalidad podría provocarse cuando los individuos pierden su cubierta cérica (exuvia), adquiriendo en ese momento un exceso de agua tal como se aprecia, por la forma hinchada de su cuerpo, en la Figura 15.

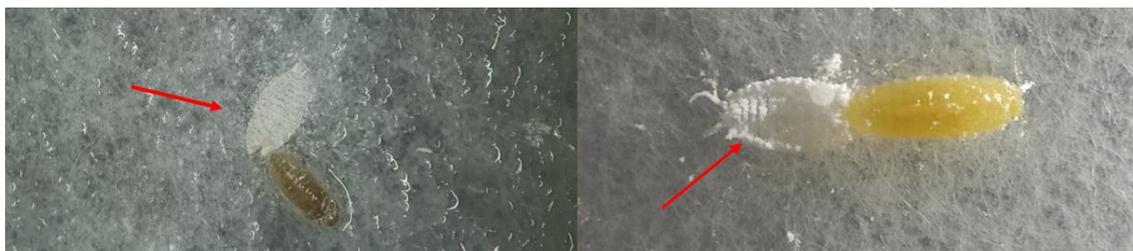


Figura 15. Machos N2 de *D. aberiae* muertos por exceso de agua. Se observa el desprendimiento de la exuvia (flecha roja) y el cuerpo hinchado.

Por ello, para la evaluación de los machos, se probaron otros volúmenes de agua (300, 400 y 500  $\mu$ L) y otros periodos de tiempo (24, 48, 72 y 96 h). De aquí se obtuvo que la mejor combinación era un volumen de aplicación de 400  $\mu$ L y un periodo de evaluación de 72 horas, ya que con 500  $\mu$ L la mayoría de los individuos estaban muertos en el periodo de 24 – 48 horas, con 300  $\mu$ L el papel de filtro de la placa se secaba antes de las 48 horas, y con 400  $\mu$ L, la supervivencia de los individuos control era adecuada a las 72 horas (mortalidad siempre inferior al 15%) mientras que, a las 96 h, la supervivencia ya disminuía considerablemente, mostrando mortalidades superiores al 46%.

#### 4.2.2 Actividad entomopatogénica de los diferentes nematodos.

El primer resultado a destacar es que todos los nematodos se han mostrado activos, en mayor o menor grado frente a *D. aberiae* a la dosis de 200 IJs/cochinilla.

El segundo resultado a destacar es que, en general, se observó que los machos tienen mayor susceptibilidad a los IJs de los NEP evaluados que las hembras, en base al tiempo requerido para mostrar un nivel similar de eficacia (Figuras 16A y 16B).

A las 24 horas tras la aplicación de los tratamientos, se observaron bajos porcentajes de mortalidad en ambos sexos, siendo la máxima de 7,5% en machos (Figura 16A) y del 5% en hembras (Figura 16B). En este periodo, y solo en el caso de los machos, la mortalidad media causada por Larvanem y Capsanem difieren significativamente de la del control en el test de comparación de medias ( $F = 3$ ;  $gl = 5$ ;  $P = 0,02$ ).

En el periodo de 48 horas, la mortalidad causada por Larvanem es significativamente superior a la alcanzada en el control en machos, al igual que Capsanem ( $F = 12,91$ ;  $gl = 5$ ;  $P < 0,00$ ). Para hembras, el ANOVA no indica diferencias significativas en general ( $F = 1,6$ ;  $gl = 5$ ;  $P = 0,18$ ), pero el test LSD sí determina diferencias entre grupos, siendo Larvanem el único tratamiento que difiere significativamente del control.

A las 72 horas, se sigue la tendencia en machos de que los únicos tratamientos que difieran del control sean Larvanem y Capsanem ( $F = 19,97$ ;  $gl = 5$ ;  $P < 0,00$ ). En hembras se mantiene que solo Larvanem difiere del control ( $F = 3,75$ ;  $gl = 5$ ;  $P = 0,01$ ).

A las 96 horas en hembras, se mantienen las mismas diferencias con el control que a las 72 horas, a excepción de que por primera vez NFP y Capsanem también difieren ( $F = 15,41$ ;  $gl = 5$ ;  $P < 0,00$ ).

En resumen, de los 5 productos ensayados, el que tiene mayor eficacia tanto en machos como en hembras es Larvanem (*H. bacteriophora*) con un porcentaje medio de mortalidad de  $89,69 \pm 5,72\%$  en machos a las 72 horas, y de un  $77,50 \pm 6,03\%$  en hembras a las 96 horas. El producto que presenta menor efectividad es Steinerma-System (SS; *S. feltiae*) en hembras, causando una mortalidad de  $11,53 \pm 3,52\%$  a las 96 horas, y Nemaforce® Felti Powder (NFP; *S. feltiae*) en machos, causando una mortalidad de  $11,67 \pm 5,43\%$  a las 72 horas. Cabe destacar que la mortalidad media alcanzada en los controles al final del ensayo es de  $8,75 \pm 4,48\%$  en hembras y del  $10,28 \pm 7,56\%$  en machos.

Los resultados del tiempo de supervivencia medio (TSM) según el tratamiento se muestran en la Tabla 1. El análisis ha determinado que existen diferencias significativas en el tiempo de supervivencia tanto para machos [Log Rank (Mantel-Cox):  $\chi^2 = 116,42$ ;  $gl = 5$ ;  $P < 0,00$ ] como para hembras [Log Rank (Mantel-Cox):  $\chi^2 = 39,91$ ;  $gl = 5$ ;  $P < 0,00$ ] entre los distintos tratamientos.

Larvanem es el producto que demostró mayor actividad contra las cochinillas, ya que ha mostrado los menores TSMs, tanto en machos (2,40 días) como en hembras (3,40 días). En el caso de los machos, este producto se mostró, además, estadísticamente más activo que el resto de los productos mientras que, en el caso de hembras, también se observaron diferencias estadísticamente significativas con el resto de los productos excepto con Capsanem (*S. carpocapsae*), el cual mostró un TSM sobre las cochinillas adultas de 3,65 días.

Por otra parte, no se observó una diferencia significativa entre el control y los tratamientos Entonem, NFP y SS, todos ellos conteniendo *S. feltiae* como ingrediente activo, tanto para machos como para hembras. Esto indica que, aunque se ha podido detectar un cierto grado de mortalidad, el nivel de actividad es tan bajo que no es suficiente para mostrar diferencias significativas con el control.

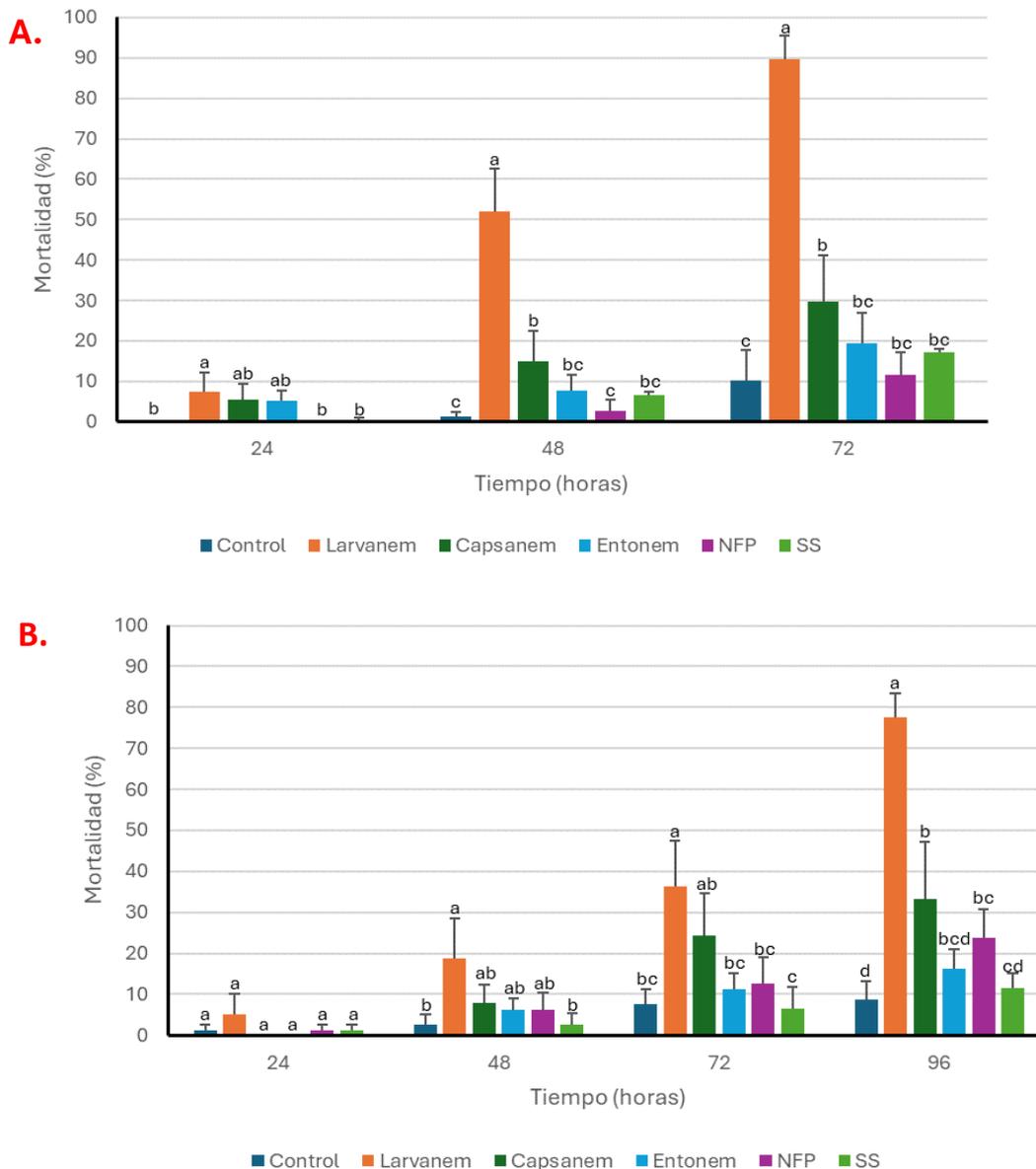


Figura 16. Evolución temporal de la mortalidad acumulada (porcentaje  $\pm$  error estándar) en el screening según el producto en (A) machos N2 y (B) hembras adultas de *D. abieriae*. En estos gráficos, para un mismo tiempo de evaluación, barras etiquetadas con diferentes letras difieren significativamente en el análisis de la varianza (test LSD,  $P < 0,05$ ).

Tabla 1. Tiempo de supervivencia medio de las cochinillas macho N2 y hembra adulta según el producto.

Producto	Tiempo de supervivencia medio (TSM), en días (95% I.C.)*	
	Machos N2	Hembras adultas
Larvanem	2,40 $\pm$ 0,07 (2,26 – 2,54) <sup>a</sup>	3,40 $\pm$ 0,10 (3,20 – 3,60) <sup>a</sup>
Capsanem	2,80 $\pm$ 0,06 (2,69 – 2,92) <sup>b</sup>	3,65 $\pm$ 0,08 (3,50 – 3,80) <sup>ab</sup>
Entonem	2,87 $\pm$ 0,05 (2,77 – 2,98) <sup>bc</sup>	3,83 $\pm$ 0,06 (3,71 – 3,94) <sup>c</sup>
NFP	2,97 $\pm$ 0,02 (2,94 – 3,00) <sup>c</sup>	3,80 $\pm$ 0,07 (3,67 – 3,93) <sup>bc</sup>
SS	2,93 $\pm$ 0,03 (2,88 – 2,99) <sup>bc</sup>	3,86 $\pm$ 0,06 (3,74 – 3,98) <sup>c</sup>
Control	2,99 $\pm$ 0,01 (2,96 – 3,01) <sup>c</sup>	3,89 $\pm$ 0,05 (3,79 – 3,99) <sup>c</sup>

\*Para cada sexo, los valores con distinto superíndice indican la existencia de diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

En cuanto a los individuos muertos, hay que mencionar que no todos ellos tenían nematodos en su interior al realizar la disección. Sin embargo, se han podido encontrar individuos muertos con NEP en su interior para todos los productos probados en machos (Figura 17A) y, de forma similar, todos los productos excepto Steinernema System (SS) han sido capaces de parasitar y provocar la muerte a hembras (Figura 17B). En concreto, el  $66,15 \pm 9,73\%$  del total de machos muertos en el tratamiento con Larvanem resultó con nematodos en su interior, sin diferencias significativas con el  $57,79 \pm 18,05\%$  obtenido con Capsanem (Figura 17A); sin embargo, sí las hubo entre Larvanem y el resto de los productos, los cuales obtuvieron porcentajes cercanos al 30% ( $F = 3,17$ ;  $gl = 4$ ;  $P < 0,03$ ). En el caso de las hembras, el porcentaje medio de muertos con nematodos en su interior conseguido en el tratamiento con Larvanem fue de  $80,09 \pm 6,29\%$ , significativamente mayor que los conseguidos con el resto de productos ( $F = 7,89$ ;  $gl = 4$ ;  $P < 0,00$ ) (Figura 17B).

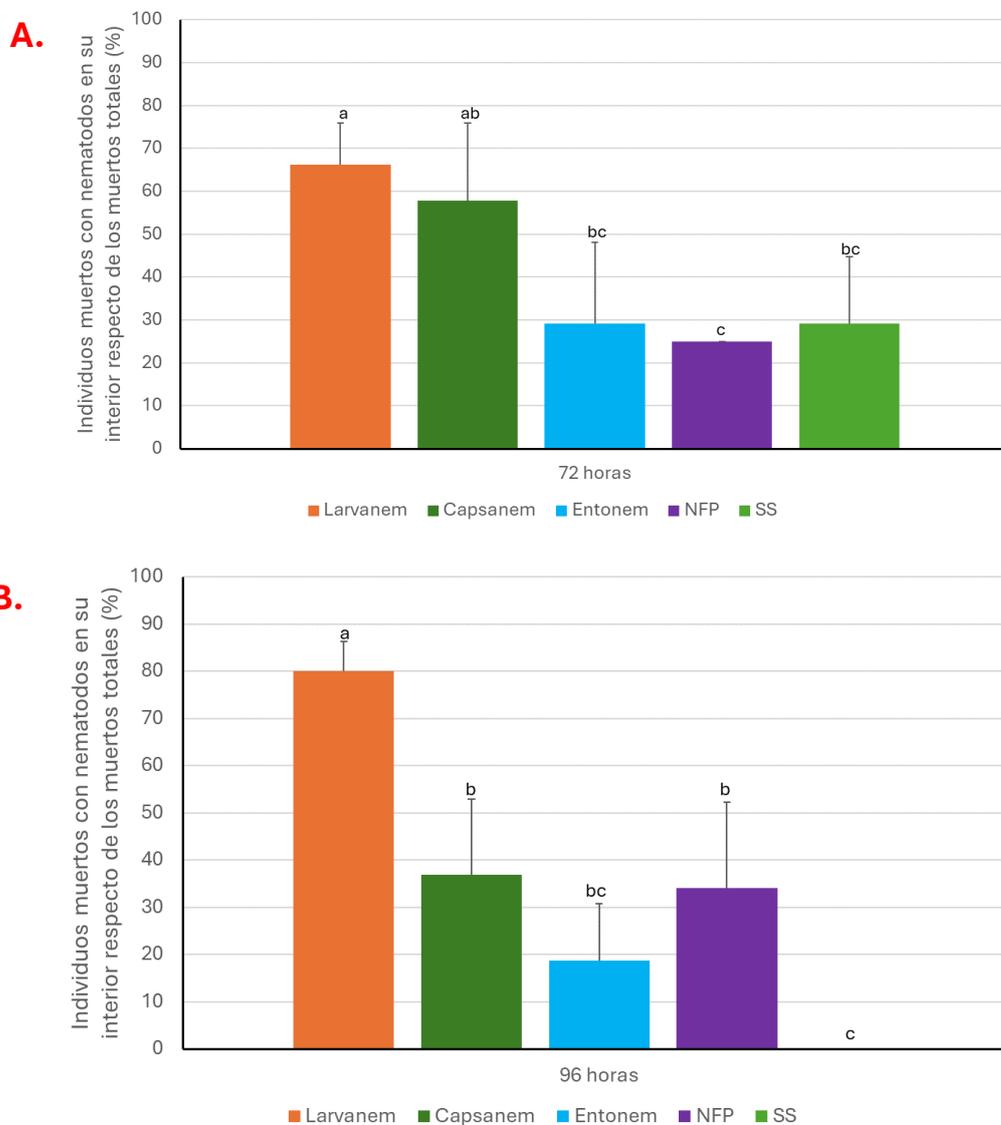


Figura 17. Proporción de individuos de *D. abieriae* muertos con nematodos en su interior (porcentaje  $\pm$  error estándar) respecto de los muertos totales según el producto en (A) machos N2, a las 72 horas, y (B) hembras adultas a las 96 horas en el screening. En estos gráficos, barras etiquetadas con diferentes letras difieren significativamente en el análisis de la varianza (test LSD,  $P < 0,05$ ).

Como todos los individuos se encontraban en las mismas condiciones y lo único que varía es la exposición ante un nematodo u otro, para evaluar la patogenicidad de los distintos productos se ha tenido en cuenta la mortalidad total (haya o no nematodos en el interior) para cada intervalo de tiempo, ya que la causa más probable de la mortalidad es el nematodo. En el caso del ensayo dosis-respuesta que se describe a continuación, por este mismo motivo, también se va a tener en cuenta la mortalidad total, aunque también se comenten los resultados obtenidos de las disecciones.

Por último, es importante destacar que en este ensayo no se hace una distinción entre individuos muertos que se pueden recuperar y que no, ya que estos últimos se pueden considerar irrelevantes al ser únicamente 4 machos los que no se pudieron recuperar del total de los dos bioensayos realizados (1% de los machos totales tratados, n=400).

### **4.3 Determinación de la virulencia de Larvanem (*Heterorhabditis bacteriophora*) frente a *Delottococcus aberiae*.**

En función de los resultados del estudio de patogenicidad de los diferentes productos basados en los NEP frente a *D. aberiae* se seleccionó el producto Larvanem, por su mayor patogenicidad, para realizar un estudio en mayor profundidad. El objetivo fue determinar la virulencia del nematodo para evaluar su potencial como posible agente de biocontrol de la cochinilla mediante su aplicación en suelo.

#### **4.3.1 Establecimiento de las condiciones experimentales.**

Para el estudio de la virulencia de Larvanem en tierra, la humedad elegida fue de un 20% en base a estudios preliminares realizados en laboratorio en los que se determinó que esta humedad era la adecuada para la evaluación de los estadios de estudio seleccionados de *D. aberiae* (desarrollo de machos N2 a machos adultos y supervivencia de hembras adultas), además de ser una humedad óptima en tierra para el nematodo. Una vez determinada la humedad adecuada para realizar los estudios, se evaluaron diferentes modificaciones en los dispositivos de ensayo (las placas Petri), fundamentalmente a nivel de los diámetros de aireación en las tapas, para conseguir que la humedad permaneciese lo más estable posible a lo largo del experimento.

Los resultados del seguimiento de la variación de la humedad a lo largo de los experimentos se muestran en la Figuras 18. En las condiciones experimentales previamente fijadas se obtuvo una estabilidad alta de la humedad, disminuyendo sólo en torno a un 4% durante las primeras 48 horas. Posteriormente, y hasta las 96 horas, momento en el que finalizó el experimento, la humedad permaneció prácticamente estable.

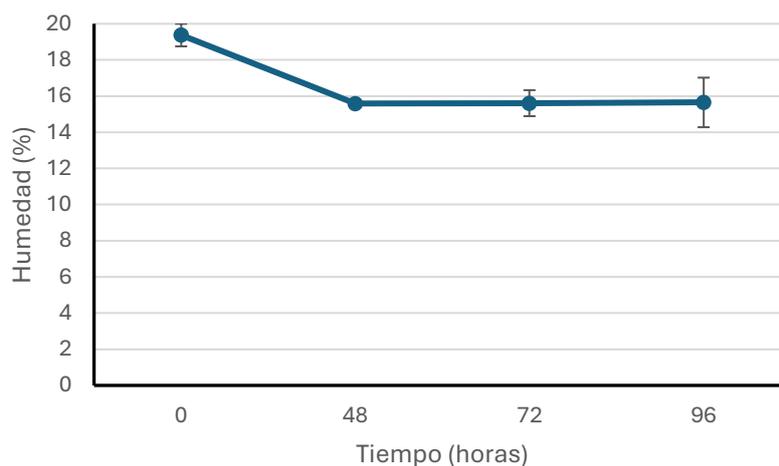


Figura 18. Variación del porcentaje ( $\pm$  error estándar) de humedad de la tierra a lo largo de los bioensayos dosis-respuesta ( $n = 2$ ).

#### 4.3.2 Virulencia de las distintas dosis de Larvanem.

Para determinar la virulencia de los IJs de *H. bacteriophora* presentes en el producto Larvanem se realizó un estudio dosis-respuesta que nos permitiría obtener la  $DL_{50}$  como parámetro de virulencia. Las dosis estudiadas fueron 50, 100, 200 y 400 IJs/cochinilla, siendo las mismas para machos y para hembras. Además, de acuerdo con las condiciones establecidas en los estudios de patogenicidad, el periodo de evaluación fue de 72 horas para los machos y 96 horas para hembras.

El primer resultado a destacar es que la mayor mortalidad se alcanzó a la mayor dosis probada (400 IJs/cochinilla), tanto en machos como hembras (Figuras 19A y 19B, respectivamente); en ambos casos se obtienen niveles de mortalidad cercanos al 70%, si bien dicha actividad en machos se alcanza a las 72 horas mientras que las hembras requieren un periodo de 96 horas. Además, también en ambos casos, se observa que la tasa de mortalidad aumenta conforme se incrementa la dosis empleada de nematodos.

Para conocer si existían diferencias significativas entre la mortalidad alcanzada con las distintas dosis se realizó un ANOVA simple, determinando que el factor dosis tenía un efecto significativo sobre la mortalidad, tanto para machos ( $F = 48,86$ ;  $gl = 4$ ;  $P < 0,00$ ) como para hembras ( $F = 75,90$ ;  $gl = 4$ ;  $P < 0,00$ ). El test LSD realizado posteriormente para la comparación de medias determinó la existencia de diferencias significativas entre todas las mortalidades alcanzadas, aumentando conforme lo hace la dosis aplicada de NEP.

Una vez conocida la mortalidad alcanzada en las distintas dosis se pudo calcular la  $DL_{50}$  en machos y hembras mediante una regresión Probit. La Tabla 2 muestra las  $DL_{50}$  estimadas, a los tiempos estipulados, para los machos y hembras.

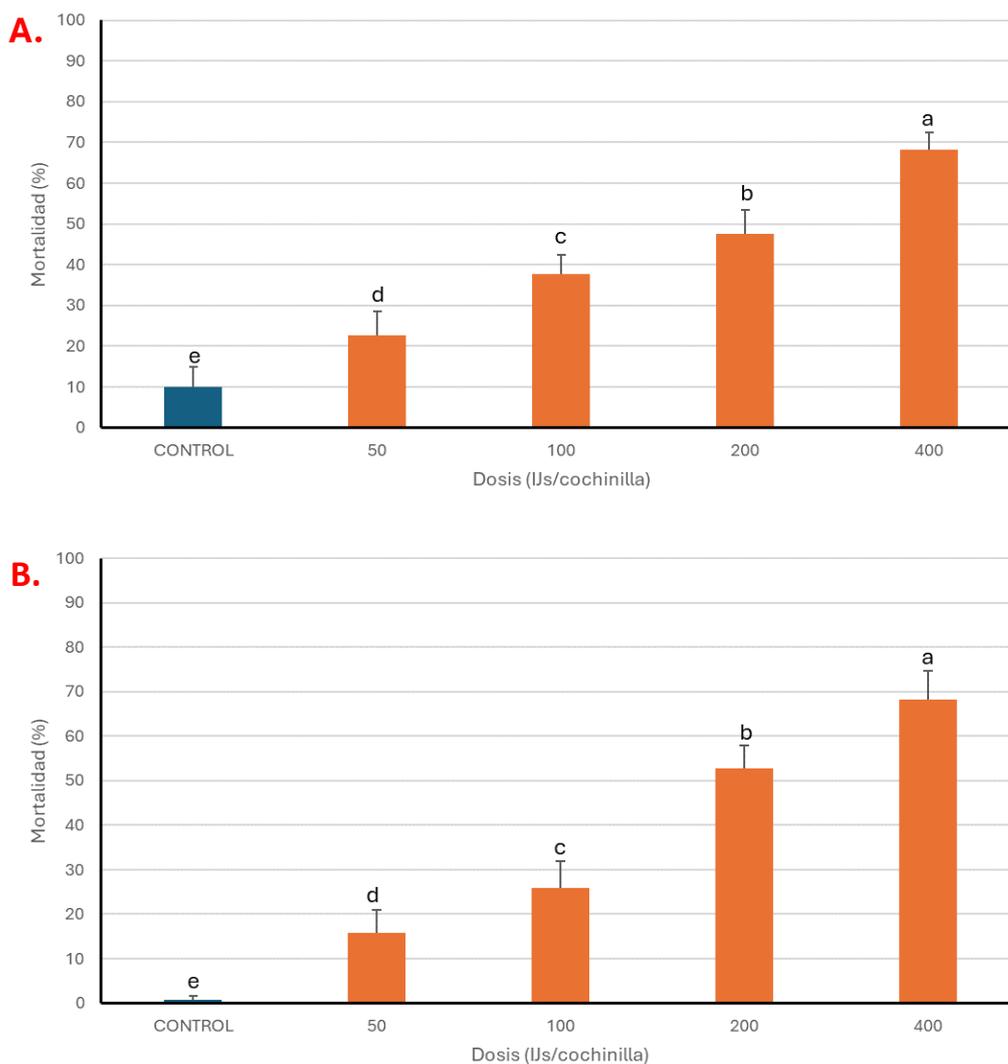


Figura 19. Mortalidad (porcentaje  $\pm$  error estándar) alcanzada (A) a las 72 horas según la dosis de nematodos aplicados en machos N2 y (B) a las 96 horas en hembras adultas. En estos gráficos, barras etiquetadas con diferentes letras difieren significativamente en el análisis de la varianza (test LSD,  $P < 0,05$ ).

Tabla 2. Virulencia del producto Larvanem frente a machos N2 y hembras adultas de *D. abieriae*.

	Tiempo (h)	Pendiente*	DL <sub>50</sub> (95% I.C.)**	$\chi^2$	gl	Sig
<b>Machos</b>	72	1,30 $\pm$ 0,12	189,57 (166,01 – 219,92)	12,98	10	0,23
<b>Hembras</b>	96	1,72 $\pm$ 0,12	203,70 (173,81 – 245,03)	18,35	10	0,49

\*Pendiente ( $\pm$  error estándar) de las rectas de regresión. \*\*Los valores de las DL<sub>50</sub> muestran en número de nematodos/insecto, y su intervalo de confianza al 95%, necesarios para provocar el 50% de mortalidad en la población sujeta a estudio.

De acuerdo con los datos de la Tabla 2, el sexo más susceptible a la infección por los IJs del producto Larvanem son los machos N2, ya que, en comparación con las hembras adultas, estos alcanzan la DL<sub>50</sub> con un menor número de IJs y en un periodo de tiempo más corto.

En cuanto a la proporción de muertos con nematodos en su interior, se ha observado un rango que va desde el  $15,42 \pm 7,70\%$  hasta el  $43,52 \pm 15,09\%$  en machos, y desde el  $41,41 \pm 14,96\%$  hasta el  $62,92 \pm 13,38\%$  en hembras, sin mostrarse diferencias significativas entre las dosis, ni en el caso de machos ( $F = 1,88$ ;  $gl = 3$ ;  $P = 0,15$ ) ni de hembras ( $F = 0,78$ ;  $gl = 3$ ;  $P = 0,51$ ).

En este ensayo, a diferencia de lo sucedido en el estudio de la patogenicidad, sí tiene importancia el porcentaje de individuos que pudieron ser recuperados para su posterior disección y los que no debido a su avanzado estado de descomposición. En la Figura 20 se puede observar como el porcentaje de individuos macho que se pueden recuperar tiene una tendencia descendente conforme aumenta la dosis de nematodos, existiendo diferencias significativas entre la menor dosis (50 IJs/cochinilla) y la mayor (400 IJs/cochinilla) ( $F = 2,37$ ;  $gl = 3$ ;  $P < 0,08$ ). En el caso de las hembras, esta relación no es tan clara, y el ANOVA no indica diferencias significativas entre dosis ( $F = 1,79$ ;  $gl = 3$ ;  $P = 0,17$ ). En ambos casos, el mínimo de individuos recuperados tiene lugar a la máxima dosis de nematodos, siendo de un  $82,36 \pm 7,72\%$  en hembras, y de un  $55,06 \pm 6,86\%$  en machos.

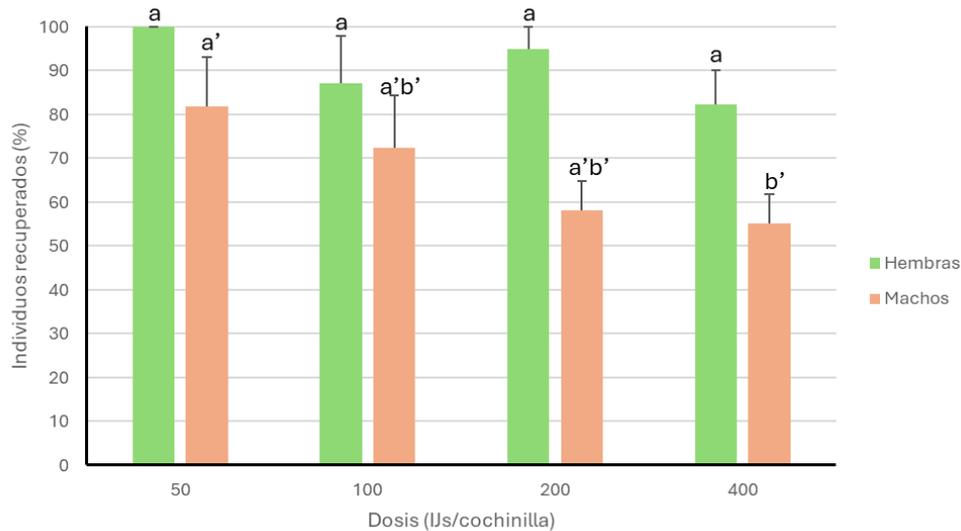


Figura 20. Porcentaje ( $\pm$  error estándar) de individuos de cada sexo (machos N2 y hembras adultas) recuperados para su posterior disección según la dosis de nematodos aplicada. En este gráfico, barras etiquetadas con diferentes letras dentro de un mismo sexo difieren significativamente en el análisis de la varianza (test LSD,  $P < 0,05$ ).

## 5. Discusión.

*Ceratitis capitata* y *Delottococcus aberiae* son dos de las principales plagas que afectan a los cítricos en la Comunidad Valenciana. Los daños producidos al cultivo por *C. capitata* derivan de la oviposición de las hembras en la corteza de los frutos y el posterior desarrollo de la larva en el mismo, causando su pudrición. En el caso de *D. aberiae*, el principal daño que origina es la deformación del fruto, pero también la deposición de melaza, tanto en fruto como en hojas, y el posterior desarrollo de negrilla sobre la misma, que causan una depreciación del valor del fruto y una disminución de la tasa fotosintética del árbol disminuyendo su rendimiento. Por estos daños que causan, y las actuales restricciones impuestas al uso de plaguicidas, es importante buscar nuevas formas de control para estas plagas, siendo los nematodos entomopatógenos una opción interesante al tener estas dos plagas una fase de su ciclo de vida en el suelo.

### 5.1 Efecto de los NEP sobre *Ceratitis capitata*.

Ninguno de los productos probados contra los distintos estadios de *C. capitata* bajo nuestras condiciones de estudio se puede considerar efectivo para el control de esta plaga.

En el caso de las pupas, nuestros resultados coinciden con los obtenidos, en otros estudios en placa, donde se valora la susceptibilidad de este tefrítido frente a *H. bacteriophora*, *S. feltiae* y *S. carpocapsae*. Por ejemplo, Malan y Manrakhan (2009) obtuvieron un 0% de infección para pupas de *C. capitata* a una dosis de 200 IJs/pupa, utilizando distintas especies y cepas de *Heterorhabditis*, entre ellas las cepas SF1, SF134, SF268 de *H. bacteriophora*. Otro ejemplo es el de Karagoz et al. (2009) donde se expusieron aislados turcos de *S. feltiae*, *S. carpocapsae* y *H. bacteriophora* a pupas a una concentración 500 IJs/300  $\mu$ L para 20 pupas (25 IJs/pupa), obteniéndose un 0% de infección.

Sin embargo, en los estudios de semicampo con tierra estéril sí se consigue una mortalidad que pone de manifiesto la capacidad de estos nematodos de infectar y matar a pupas de esta mosca a 200 IJs/pupa, por ejemplo, las cepas 11KG y TOK20 de *H. bacteriophora*, la cepa Tokat-Bakışlı05 de *S. carpocapsae* y la cepa Tokat-Emir de *S. feltiae* causan una mortalidad de entre el 43 y el 52% (Yağcı et al., 2021). Con aislados turcos de estas especies, la tasa de mortalidad disminuye hasta unos valores de entre el 25 y el 34%, aun siendo la misma concentración de 200 IJs/pupa (Gözel y Genç, 2021). También en condiciones de tierra estéril se ha descrito que *H. bacteriophora* cepa HB, es capaz de causar una mortalidad del 30% de pupas a una concentración de 200 IJs/pupa (Jean-Baptiste et al., 2021).

En ensayos de laboratorio en placa con larvas L3, Mokrini et al. (2020) obtuvieron con las cepas SF-MOR9 y SF-MOR10 de *S. feltiae*, y la cepa HB-MOR7 de *H. bacteriophora* una tasa de infección cercana al 12% a una dosis de 100 IJs/larva a las 48 horas. Para *S. carpocapsae* (ALL), en ensayos en placa, se ha obtenido una mortalidad de L3 a los 5 días tras la aplicación de 220 IJs en 1 mL para 20 larvas (11 IJs/larva) cercana al 80% (Rohde et al., 2020). También en placa, a una concentración de 200 IJs/larva, las cepas SF1, SF134 y SF268 de *H. bacteriophora* causan una infección de entre el 80 y el 95% (Malan y Manrakhan, 2009).

Para el tercer estadio larvario también hay numerosos ejemplos de cepas efectivas en semicampo sobre tierra estéril a una concentración de 200 IJs/larva. Por ejemplo, *H. bacteriophora* (11KG) y (TOK20), *S. carpocapsae* (Tokat-Bakışlı05) y *S. feltiae* (Tokat-Emir) causan todas ellas más de un 70% de mortalidad (Yağcı et al., 2021). Con aislados turcos de *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae* y *S. feltiae* se obtuvo entre un 71 y un 96% de mortalidad de larvas L3 en tierra estéril (Gözel y Genç, 2021). En el estudio de Medina et al. (2008), se evaluó la susceptibilidad de L3 a los IJs de los productos Larvanem y Entonem en un medio con vermiculita a una concentración de 100 IJs/cm<sup>2</sup>, obteniendo una emergencia de adultos cercana al 45% con Larvanem, y una emergencia cercana al 55% con Entonem.

Todos estos estudios muestran, en general, que las larvas de *C. capitata* son más susceptibles a la infección por nematodos que las pupas. Sin embargo, la gran variabilidad existente entre estudios a la hora de elegir concentraciones, cepas y modo de aplicación deriva en una gran diversidad de mortalidades, haciendo que sea muy complicado poder establecer comparaciones o sacar conclusiones más concretas.

Que la mortalidad sea mayor en individuos L3 que en pupas también se observa en este ensayo, aunque a unos niveles muchos menos significativos. El motivo por el que las larvas son más susceptibles a los NEP es porque emiten mayor cantidad de CO<sub>2</sub>, atrayendo a los nematodos, y además porque las larvas tienen unas aberturas naturales de mayor tamaño, facilitando la entrada de los NEP (Shaurub et al., 2021).

El motivo por el que las cepas comerciales utilizadas en el presente trabajo no han resultado efectivas en larvas se podría deber a las diferencias existentes entre cepas para distintos factores biológicos, como la capacidad de encontrar a la presa o la capacidad de parasitarla e infectarla (Hazir et al., 2003), pudiendo ser menores en las cepas comerciales contra esta plaga respecto de otras cepas. Tampoco se puede descartar que estos resultados negativos en larvas, respecto de otros estudios, se puedan deber a las condiciones experimentales en las que se han llevado a cabo los ensayos. Por ejemplo, en los estudios comentados las larvas/pupas son depositadas, de forma independiente, en pocillos de placas multipocillo de 24, y a cada una de ellas se les aplica una dosis, lo que podría favorecer la parasitación tanto por proximidad al huésped como por densidad de los parásitos. En nuestros ensayos, sin embargo, las larvas/pupas se colocan en grupos de 10, sobre placas Petri de 55 mm, lo que puede aumentar considerablemente la distancia entre el huésped y el parásito, así como, disminuir la densidad por unidad de superficie de este último.

Igualmente, sería interesante realizar estos ensayos en condiciones de semicampo, mediante la aplicación de los nematodos en suelo, para comprobar si la mortalidad aumenta en pupas y larvas.

## **5.2 Efecto de los NEP sobre *Delottococcus aberiae*.**

Para *D. aberiae*, el producto Larvanem (*H. bacteriophora*) es el que ha demostrado mayor potencial de control de la plaga de entre todos los productos probados. Estos resultados corroboran la capacidad de los NEP, especialmente del género *Heterorhabditis*, para infectar y matar a cochinillas, como ya se ha visto en estudios previos con otras especies de pseudocóccidos, realizados en condiciones de laboratorio

en placa. Najm et al. (2023) evaluaron distintas especies y cepas de *Heterorhabditis* y *Steinernema* a distintas concentraciones contra hembras de *P. citri* y concluyeron que el género *Heterorhabditis* era el más eficaz frente a ese pseudocóccido. De entre sus resultados cabe destacar que obtuvieron una mortalidad cercana al 60% en hembras cuando eran sometidas a una dosis de 200 IJs/hembra de la cepa FLH-4H de *H. bacteriophora*. En otro estudio, también sobre la eficacia de distintas especies y cepas de NEP contra *P. citri* y a una dosis de 200 IJs/hembra, *H. bacteriophora* (SF351) causó una mortalidad cercana al 75% (van Niekerk y Malan, 2012). Mathulwe et al. (2022) obtuvieron también que las especies del género *Heterorhabditis* eran las más eficaces para el control de cochinillas, en este caso *P. viburni*, también a una concentración de 200 IJs/cochinilla. En concreto demostraron que el NEP que causó una mayor mortalidad fue *H. indica* (SGS) Poinar, causando un 79% de mortalidad en hembras adultas.

Cabe destacar que, hasta lo que hemos podido averiguar, no existen estudios en la literatura científica acerca de la eficacia de NEP sobre estadios de pseudocóccidos diferentes a la hembra adulta. Sin embargo, sí se ha encontrado un artículo de la susceptibilidad de ninfas de segundo estadio (sin diferenciar entre hembras y machos) y hembras adultas de *P. citri* a aislados de las bacterias simbiotas de los IJs de *S. feltiae* (KCS-4S), *S. carpocapsae* (E-76) y *H. bacteriophora* (FLH-4H), entre otros (Özdemir y Yüksel, 2024).

Los motivos que podrían determinar por qué el género *Heterorhabditis* en general, y *H. bacteriophora* en particular, causa en este estudio una mayor mortalidad que el género *Steinernema* en cochinillas se puede deber a los siguientes factores:

1. El tamaño de los orificios naturales de entrada en las cochinillas y el de los infectivos juveniles. Este es un factor determinante, ya que los NEP entran por aberturas naturales en los hospedadores, y si el IJ no puede penetrar por las mismas se debería, por tanto, dificultar la infección.

Tabla 3. Diámetro y longitud media de los juveniles infectivos (IJs) de las especies de NEP empleadas en el presente trabajo.

	Diámetro medio (µm)*	Longitud media (µm)*	Referencia
<b><i>Heterorhabditis bacteriophora</i></b>	23 (18 – 31)	558 (512 – 671)	(Poinar, 1975)
<b><i>Steinernema carpocapsae</i></b>	25 (20 – 30)	558 (436 – 650)	(Gaugler y Kaya, 1990)
<b><i>Steinernema feltiae</i></b>	31 (27 – 41)	807 (779 – 841)	(Flores et al., 2021)

\*Dimensiones extraídas de las referencias que se incluyen en la tabla.

Según la bibliografía consultada (Tabla 3), de las tres especies ensayadas en el presente trabajo, *S. feltiae* tiene los infectivos juveniles de mayor tamaño tanto en longitud como en diámetro. Entre *S. carpocapsae* y *H. bacteriophora* no hay diferencias en la longitud media, pero sí en el diámetro, siendo los IJs de *H. bacteriophora* de menor tamaño.

En cuanto a las medidas de los orificios por los que pueden penetrar los nematodos, la única información que se ha podido encontrar en la literatura es la medida del anillo anal del cotonet, un anillo esclerotizado que rodea a la abertura anal (Mani y Shivaraju, 2016). Para el caso de las hembras adultas de *D. aberiae*, se deduce que el diámetro medio del anillo anal debe ser de unos 82  $\mu\text{m}$  (rango de entre 66 – 98  $\mu\text{m}$ ), ya que de acuerdo con Miller y Giliomee (2011), su dimensión es entre 2,0 y 1,7 veces menor que la seta más larga del anillo anal, y esta seta mide entre 132 y 166  $\mu\text{m}$ . Para el caso del diámetro del anillo anal de ninfas N2, no se ha encontrado bibliografía que lo especifique para el caso de *D. aberiae*. En cambio, esta medida si se conoce para otras especies de pseudocóccidos (Tabla 4). Como el diámetro medio del anillo anal de estas especies es conocido también para hembras adultas y es similar al de *D. aberiae* (82  $\mu\text{m}$ ), por homología se podría especular que el anillo anal del segundo estadio ninfal de *D. aberiae* tendría un diámetro de entre 38 y 43  $\mu\text{m}$ .

Tabla 4. Diámetro medio del anillo anal de ninfas N2 y hembras de distintas especies de pseudocóccidos.

	Diámetro medio ( $\mu\text{m}$ ) del anillo anal*	
	Ninfas N2	Hembras adultas
<i>P. burnerae</i>	43 (40 – 48)	74 (63–88)
<i>P. longispinus</i>	42 (37 – 48)	84 (75–107)
<i>P. citri</i>	38 (35 – 41)	81 (72–96)

\*Datos extraídos del trabajo de Wakgari y Giliomee (2005)

De esta manera, el diámetro establecido para el anillo anal de *D. aberiae*, tanto en hembras adultas (66-98  $\mu\text{m}$ ) como en N2 de machos (35-41  $\mu\text{m}$ ), es superior al diámetro medio de los nematodos empleados (Tabla 3), por lo que *a priori* no parece una causa importante de la baja eficacia. Sin embargo, dado el mayor tamaño de *S. feltiae* respecto al resto, podría encontrar más dificultades para su entrada, lo que podría explicar en parte que los productos probados cuyo agente activo es este nematodo hayan causado las mortalidades más bajas.

2. Presencia de diente dorsal en el género *Heterorhabditis*. Los IJs de este género presentan un diente alargado en la región apical, lo que les permite perforar cualquier parte blanda de la cutícula del hospedador y penetrar en él, mientras que el género *Steinernema* carece de este y los IJs se ven estrictamente obligados a penetrar por aberturas naturales (Trejo-Meléndez et al., 2024). Esto podría explicar que la mortalidad causada por *H. bacteriophora* sea mayor que la causada por los IJs del género *Steinernema*, ya que poseen más recursos para conseguir penetrar en el insecto.
3. Estrategia de búsqueda del alimento. La búsqueda de alimento de los IJs se puede clasificar en dos grupos: estrategia de crucero (“cruise”) y estrategia de emboscada (“ambush”). En el primer grupo, el IJ busca de forma activa a la presa, mientras que en el segundo, el IJ permanece inmóvil esperando a detectar una presa. Los IJ con la primera estrategia tienen una mayor probabilidad de encontrar presas sedentarias y de hábitos crípticos, mientras que los que siguen la estrategia de emboscada son muy eficaces encontrando individuos con gran movilidad. *Heterorhabditis bacteriophora* lleva a cabo la estrategia de crucero, *S. carpocapsae* la de emboscada

y *S. feltiae* una estrategia intermedia (Lewis et al., 2006). Según esto, *H. bacteriophora* tiene que ser el que mayor mortalidad causa, ya que las cochinillas en las placas tienen una movilidad muy baja.

4. Susceptibilidad a las bacterias simbiotes. Las bacterias simbiotes de los NEP producen una gran diversidad de metabolitos con diferentes bioactividades insecticidas e inmunosupresoras, teniendo la composición y las cantidades de compuestos bioactivos un papel crucial en la mortalidad de los insectos hospedadores (Özdemir y Yüksel, 2024). En el caso del género *Photorhabdus* (bacteria simbiote del género *Heterorhabditis*), algunos de los metabolitos que se producen son: pigmentos de antraquinona, rabduscina, darobactina, ácido trans-cinámico y trans-estilbenos, mientras que el género *Xenorhabdus* (bacteria simbiote del género *Steinernema*) produce nematofina, xenotetrapéptidos y bencilidenacetona, entre otros (Cimen et al., 2022).

Entre los insectos existen distintas sensibilidades a estos compuestos tóxicos liberados por las bacterias simbiotes del intestino de los NEP. En el caso concreto de los pseudocóccidos, en un artículo en el que se estudia la susceptibilidad de las bacterias simbiotes de distintos NEP contra *P. ficus* se obtuvo que las ninfas N2 son más sensibles a los compuestos producidos por las bacterias *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii* (bacteria de *H. bacteriophora*) obteniéndose una mortalidad del 90% a las 72 horas. En el caso de hembras adultas, a las 96 horas *Xenorhabdus nematophila* (bacterias de *S. carpocapsae*) y *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii* obtienen las mayores mortalidades, con un 97,5% las dos (Özdemir y Yüksel, 2024). Estos resultados se podrían extrapolar a *D. aberiae*, ya que coincide con los resultados obtenidos en el screening, según los cuales con el nematodo *H. bacteriophora* se ha conseguido la mayor mortalidad en machos, y con *H. bacteriophora* y *S. carpocapsae* las mayores mortalidades en hembras.

Dado que *H. bacteriophora* siempre se encuentra en la posición más favorable respecto a estos cuatro factores (menor diámetro de los IJs, presencia de diente dorsal, estrategia de cruceo para la búsqueda de alimento y bacterias simbiotes más virulentas), podemos sugerir que han sido determinantes para el éxito de esta especie, ya que ha sido el nematodo que mayor mortalidad ha causado de forma significativa tanto en hembras adultas como en machos N2.

También es importante destacar el papel que tienen los factores abióticos en las tasas de infección de los nematodos. De los distintos factores abióticos que afectan a los nematodos (radiación UV, textura y humedad del suelo, temperatura...), el que más podría condicionar la tasa de infección en los ensayos del screening es la temperatura, ya que este no se ha realizado en suelo y se ha mantenido en condiciones de oscuridad. Las distintas especies de nematodos empleados para este ensayo tienen diferentes rangos óptimos de temperatura para llevar a cabo la infección. En el caso de *H. bacteriophora*, el rango va de 15° C a 25° C (Mason y Hominick, 1995), el de *S. carpocapsae* de 5° C a 25° C (Kung et al., 1991) y el de *S. feltiae* va de 15° C a 28° C (Hazir et al., 2001). Dado que los ensayos se llevaron a cabo en laboratorio bajo un rango de temperatura comprendido entre 21 - 25°C, podemos sugerir que la temperatura no ha sido determinante a la hora de la infección.

En cuanto al hecho de no encontrar NEPs en el interior de todos los individuos muertos que han sido expuestos a los tratamientos, no se ha encontrado bibliografía en la que se describa que el IJ, una vez ha entrado en el hospedador haya salido antes de pasar a estado adulto. En el ciclo del NEP, el IJ al entrar en el hospedador libera las bacterias simbiotas produciendo la muerte del insecto, y se convierte en un juvenil funcional de tercer estadio alimentándose del insecto y pasando a J4. Tras esto, el J4 muda y da lugar a un adulto anfimítico (machos y hembras) en el género *Steinernema* y hermafrodita en el género *Heterorhabditis*, y tras esta primera generación se siguen generaciones anfimíticas en ambos géneros.

Los adultos depositan los huevos en el hospedador, excepto en el caso de los hermafroditas, donde el huevo eclosiona en el útero y el desarrollo de los J1 se produce gracias al consumo del tejido parental. Este J1 muda dos veces, dando lugar al J3, y teniendo este dos capas de membrana externa, la cutícula del primer y segundo estadio, protegiendo el cuerpo del nematodo. Cuando el cadáver del insecto se queda sin nutrientes, los nematodos J3 pasan a IJs y abandonan el cadáver del insecto (Askary, 2010; Půža, 2015). El ciclo desde que el IJ infecta al hospedador y se generan nuevos IJs en el género *Steinernema* oscila entre 7 – 10 días, mientras que en el género *Heterorhabditis* oscila entre 12 – 15 días (Askary, 2010). Sin embargo, en este trabajo se ha observado que ya salían nematodos de los individuos en un plazo de 48 – 72 horas tras la muerte de una cochinilla. Además, para el caso del ensayo en tierra, a las 72 horas en machos y a las 96 horas en hembras, ya se observaban individuos con un elevado grado de descomposición, en la que el cotonet ha perdido la integridad y los nematodos se encontraban por la superficie de este.

Esta situación podría deberse a que las cochinillas son tan pequeñas que el nematodo no puede llegar a cumplir su ciclo por el poco alimento que suponen estos insectos. Sin embargo, hay estudios en los que se ha registrado que los NEP *Heterorhabditis zealandica* Poinar y *Steinernema yirgalemense* Tesfamariam, Gozel, Gaugler y Adams ha podido completar su ciclo dentro de hembras adultas de *P. ficus* (en 14 y 9 días, respectivamente) (Vieux y Malan, 2013), *P. viburni* (en 10 y 8 días, respectivamente) (Stokwe y Malan, 2016) y *P. citri* (en 8 y 6 días, respectivamente) (van Niekerk y Malan, 2012).

Respecto al ensayo dosis-respuesta realizado con el producto Larvanem (*H. bacteriophora*), se observa que cuanto mayor es la concentración de IJs/cochinilla, mayor es la mortalidad de forma significativa. Esto también se ha descrito en estudios previos de susceptibilidad de cochinillas frente a NEP, como es el caso de *P. citri* (Najm et al., 2023; van Niekerk y Malan, 2012), *P. ficus* (Vieux y Malan, 2013) y *P. viburni* (Stokwe y Malan, 2016), en todos los casos sobre hembras adultas y en placa.

Si nos centramos en la dosis de 200 IJs/cochinilla, dosis utilizada tanto en el screening de productos como en el ensayo dosis-respuesta, observamos que la mortalidad alcanzada en el screening para Larvanem, en el caso de los machos, es cercana al 90% (72 horas) y al 80% en hembras (96 horas), mientras que en el ensayo dosis-respuesta esta mortalidad disminuye hasta cerca del 50%, tanto en machos como en hembras. La disminución general en machos y hembras se puede deber a las distintas características de las condiciones de ensayo: sobre papel de filtro en el screening y sobre sustrato tierra

en dosis-respuesta. En el papel de filtro no hay obstáculos para que el IJ encuentre a la cochinilla, mientras que en tierra se dificulta la búsqueda. En concreto, que disminuya más la mortalidad en machos que en hembras se puede deber a que la localización de presas por parte del género *Heterorhabditis* es por quimiorrecepción de señales emitidas por los insectos como CO<sub>2</sub>, amoníaco y otros compuestos volátiles orgánicos (Lewis et al., 2006). Según esto, una posible hipótesis para explicar este resultado sería que los machos N2 empleados para los ensayos se encuentran a punto de realizar el capullo, y lo forman en las 72 horas que dura el ensayo, entrando en un periodo de inactividad (pupa); en este estadio, presumiblemente, producen menos volátiles que las hembras adultas, dificultando así que el IJ encuentre al macho. Esto, sin embargo, no deja de ser una hipótesis y debería ser comprobado empíricamente.

En cuanto a la virulencia del Larvanem frente a *D. aberiae*, las DL<sub>50</sub> obtenidas en los experimentos en tierra descritos en el presente trabajo, han resultado próximas a los 190 nematodos/cochinilla a las 72 horas para machos y a 200 nematodos/cochinilla en 96 horas para hembras. Esto es un número elevado de nematodos, en un periodo de tiempo también prolongado, en comparación a otros estudios realizados con otras especies de cochinillas. Por ejemplo, a las 48 horas, la DL<sub>50</sub> para hembras adultas de *P. viburni* con *H. zealandica* (J34) es de 54 nematodos, y la dosis letal al 90% (DL<sub>90</sub>) es de 336 nematodos por insecto (Stokwe y Malan, 2016). Para hembras adultas de *P. ficus*, la DL<sub>50</sub> a las 48 horas de un producto comercial de *H. bacteriophora* es de 36 nematodos/insecto, mientras que esta disminuye con *H. zealandica* siendo de 19 nematodos por insecto la DL<sub>50</sub> y de 82 la DL<sub>90</sub> (Vieux y Malan, 2013). Para *P. citri*, a las 72 horas, la DL<sub>50</sub> en hembras adultas para *H. zealandica* es de 11 nematodos/insecto y la DL<sub>90</sub> es de 162 nematodos/insecto (van Niekerk y Malan, 2012). Sin embargo, todos estos ensayos se han llevado a cabo en placa, no en tierra, por lo que el nematodo puede tener mayor facilidad a la hora de encontrar e infectar a la cochinilla. Es posible que estos valores descritos de DL aumentasen si los ensayos se realizasen, al igual que en el presente trabajo, en tierra simulando la situación de una aplicación real en campo.

Si tenemos en cuenta la DL<sub>50</sub> obtenida para hembras, y que la DL<sub>90</sub> no se ha calculado porque está fuera del rango de mortalidades conseguidas, y se compara con estos estudios se puede concluir que Larvanem, pese a ser el que mayor mortalidad causó de todos los nematodos probados, tiene un potencial limitado para controlar las poblaciones de *D. aberiae*.

En general, los EPN de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* son prometedores para el control biológico de insectos plaga que habitan en el suelo o que tienen hábitos crípticos (Askary, 2010), incluyendo las cochinillas en esta descripción. Sin embargo, de los diferentes nematodos ensayados, el más efectivo en este estudio, *H. bacteriophora* (producto Larvanem), no ha sido tan efectivo como otros aislados de NEP para otros pseudocóccidos, ya que se ha obtenido una DL<sub>50</sub> más alta y en un mayor plazo de tiempo que en los estudios mencionados anteriormente. Es posible que se pudiera conseguir una mayor mortalidad utilizando aislados de la región de origen de *D. aberiae*, ya que se espera que las especies nativas estén más adaptadas a parasitar a presas de su misma región (Labaude y Griffin, 2018). Sin embargo, el utilizar aislados de regiones determinadas no es práctico a la hora de estandarizar y extender su uso, además de que

se recomienda no introducir especies de NEP en países donde no se haya registrado su presencia (Bathon, 1996) por lo que la mejor opción sería combinar el uso de los NEP comerciales activos ya registrados con otros métodos de control dentro de un programa de gestión integrada de plagas. Esto se puede llevar a cabo mediante la combinación de NEP con otros organismos de control biológico como los hongos entomopatógenos (HEP). Los HEP son un grupo diverso de hongos microscópicos capaces de infectar y causar enfermedades en insectos y otros artrópodos, encontrándose la mayoría en el orden Hypocreales y en el orden Entomophthorales (Pell et al., 2009).

En diversos estudios se ha observado la virulencia de distintos HEP frente a especies de pseudocócidos como *P. ficus* (Mohamed, 2016), *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Nawaz y Freed, 2022), *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley (Xu et al., 2017) o *P. citri* (FitzGerald et al., 2016), demostrando su potencial para el control de estas plagas. Respecto al uso combinado de HEP y NEP, los estudios son muy diversos para determinadas plagas de lepidópteros y coleópteros (revisado en Půža y Tarasco (2023)). Para pseudocócidos, solo se ha encontrado un estudio donde se evalúa el efecto de esta combinación, y es frente a *P. viburni*, utilizando el nematodo *Heterorhabditis indica* Poinar a una concentración de 200 IJs/50  $\mu$ L y los hongos *Metarhizium pinghaense* Chen and Guo y *M. robertsii* (Metschn.) Sorokin (de forma independiente) a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL en laboratorio, observándose que tiene un efecto aditivo en la mortalidad de la cochinilla. Por separado, a los 5 días se consigue una mortalidad media del 73,8% para *M. pinghaense* y del 82,5% para *M. robertsii*, mientras que con *H. indica*, a los 2 días se consigue una mortalidad del 76,3%. Con la aplicación simultánea del *H. indica* y *M. pinghaense* se obtiene la mayor mortalidad, que es del 95% a los 5 días, mientras que la combinación de *H. indica* con *M. robertsii* causa una mortalidad de 85% (Mathulwe et al., 2023).

En el caso concreto de *D. aberiae* no se han encontrado estudios que evalúen la susceptibilidad de esta cochinilla frente a HEP. En nuestro laboratorio se han llevado a cabo pruebas preliminares para evaluar la susceptibilidad de *D. aberiae* frente a diferentes cepas de *B. bassiana* obteniéndose resultados muy positivos. Estos estudios pueden ser un punto de partida para la evaluación de la estrategia combinada NEP-HEP para el control de *D. aberiae*.

## 6. Conclusiones.

En el presente trabajo se han llevado a cabo una serie de experimentos con el objetivo de elucidar el efecto de distintos formulados comerciales de NEP: Larvanem (*H. bacteriophora*), Capsanem (*S. carpocapsae*), Entonem, Steinernema-System y Nemaforce® Felti Powder (*S. feltiae* estos tres últimos), sobre dos plagas de gran importancia para el cultivo de cítricos en Valencia: la mosca mediterránea de la fruta, *C. capitata*, y el cotonet de Sudáfrica, *D. aberiae*. Los resultados obtenidos nos han permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. Los productos comerciales de NEP no han sido efectivos contra los distintos estadios de *C. capitata* ensayados en placa Petri. En el caso de pupas, estos resultados coinciden con otros estudios en placa descritos en la literatura científica, mientras que en el caso de larvas, se han publicado resultados favorables al utilizar aislados locales de NEP.

Sería necesario realizar ensayos en condiciones de semicampo con estos NEP comerciales contra larvas y pupas, pues en bibliografía se ha visto que las mortalidades causadas por los NEP son mayores en este tipo de ensayos.

2. Los machos N2 y hembras adultas de *D. aberiae*, han mostrado ser susceptibles a la infección por estos NEP ensayados en placa Petri. De los distintos productos probados, Larvanem (*H. bacteriophora*) es el que mayor actividad insecticida tiene a una dosis de 200 IJs/cochinilla, además de que esta actividad aumenta de forma estadísticamente significativa conforme lo hacen nuestras dosis de ensayo. Esto ocurre en ambos sexos.

Sin embargo, esta actividad insecticida es inferior a la obtenida en otros estudios, por lo que futuras líneas de investigación previas a un ensayo en campo deberían estudiar otras cepas de nematodos, o la combinación del Larvanem con otros organismos de control biológico como los hongos entomopatógenos, para obtener mortalidades más elevadas.

## 7. Bibliografía.

Abdel-Razek, A. S., & Abd-Elgawad, M. M. M. (2021). Spinosad combined with entomopathogenic nematode for biocontrol of the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata* [Wiedemann]) on citrus. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 112. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00458-7>

Askary, T. (2010). Nematodes as Biocontrol Agents (pp. 347-378). [https://doi.org/10.1007/978-90-481-3333-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3333-8_13)

Badr, F. A. A., Elhefny, A. A., Azazy, A. M., & Elhadidy, N. M. (2024). Virulence and biochemical activities of *Heterorhabditis indica* (Nematoda: Heterorhabditidae) against *Bactrocera zonata* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 57(4), 296-314. <https://doi.org/10.1080/03235408.2024.2351139>

Baixauli, H. (2021, noviembre 19). El Gobierno autoriza la importación de otro parasitoide para combatir el cotonet. <https://www.phytoma.com/noticias/noticias-de-actualidad/el-gobierno-autoriza-la-importacion-de-otro-parasitoide-para-combatir-el-cotonet>

Barbosa Negrisola, C. R. de C., Negrisola Júnior, A. S., Botton, M., Garcia, M. S., & Bernardi, D. (2013). Evaluation of efficacy of 18 strains of entomopathogenic nematodes (Rhabditida) against *Planococcus citri* (Risso, 1813) (Hemiptera: Pseudococcidae) under laboratory conditions. *Experimental Parasitology*, 134(3), 295-298. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.02.002>

Bathon, H. (1996). Impact of Entomopathogenic Nematodes on Non-target Hosts. *Biocontrol Science and Technology*, 6(3), 421-434. <https://doi.org/10.1080/09583159631398>

Beltrà, A., Addison, P., Ávalos, J. A., Crochard, D., Garcia-Marí, F., Guerrieri, E., Giliomee, J. H., Malausa, T., Navarro-Campos, C., Palero, F., & Soto, A. (2015). Guiding Classical Biological Control of an Invasive Mealybug Using Integrative Taxonomy. *PLOS ONE*, 10(6), e0128685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128685>

Beltrà, A., Marí, F., & Soto, A. (2013). El cotonet de Les Valls, *Delottococcus aberiae*, nueva plaga de los cítricos. *Levante Agrícola*, 419, 348-352.

Ciche, T. A., & Ensign, J. C. (2003). For the Insect Pathogen *Photorhabdus luminescens*, Which End of a Nematode Is Out? *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1890-1897. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1890-1897.2003>

Cimen, H., Touray, M., Gulsen, S. H., & Hazir, S. (2022). Natural products from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*: Mechanisms and impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(12), 4387-4399. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12023-9>

Clarke, D. J. (2008). *Photorhabdus*: A model for the analysis of pathogenicity and mutualism. *Cellular Microbiology*, 10(11), 2159-2167. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01209.x>

Cruz-Martínez, H., Ruiz-Vega, J., Matadamas-Ortíz, P. T., Cortés-Martínez, C. I., & Rosas-Díaz, J. (2017). Formulation of entomopathogenic nematodes for crop pest control – a review. *Plant Protection Science*, 53(1), 15-24. <https://doi.org/10.17221/35/2016-PPS>

de Pedro, L., Beitia, F., & Tormos, J. (2023). Two Better Than One? Potential Effects of Intraguild Predation on the Biological Control of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) by the Parasitoid *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae) and the Predator *Pseudophonus rufipes* (Coleoptera: Carabidae). *Agronomy*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/agronomy13010087>

de Pedro, L., Tormos, J., Harbi, A., Ferrara, F., Sabater-Muñoz, B., Asís, J. D., & Beitia, F. (2019). Combined use of the larvo-pupal parasitoids *Diachasmimorpha longicaudata* and *Aganaspis daci* for biological control of the medfly. *Annals of Applied Biology*, 174(1), 40-50. <https://doi.org/10.1111/aab.12468>

De-Pedro, L., Martínez, R., Harbi, A., Ferrara, F., Tormos, J., Asís, J. D., & Sabater-Munoz, B. (2013). Un nuevo enemigo natural de la *Ceratitis capitata* (Diptera Tephritidae) identificado en la Comunidad Valenciana: El parasitoide *Aganaspis daci* (Hymenoptera, Figitidae). *Levante Agrícola*, 416, 153-157.

Di Ilio, V., & Cristofaro, M. (2021). Polyphenolic extracts from the olive mill wastewater as a source of biopesticides and their effects on the life cycle of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 41(1), 359-366. <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00224-6>

Djellabi, B., Herrero-Schell, J., Ababsa, L., Sekour, M., & Beitia, F. (2021). Parasitic fitness of a strain of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera, Braconidae) reared on irradiated larvae of a Vienna-8 strain of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). *Fruits*, 76(6), 282-288. <https://doi.org/10.17660/th2021/76.6.4>

Elqdhy, M., Ait Hamza, M., Askarne, L., Fossati-Gaschignard, O., Lakhtar, H., El Mousadik, A., Ait Benoumar, A., Msanda, F., & Boubaker, H. (2024). Biology, ecology and control of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), with special reference to biological control using entomopathogenic nematode (EPN): a review. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 131(2), 365-402. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00855-0>

FitzGerald, V. C. C., Hill, M. P., Moore, S. D., & Dames, J. F. (2016). Screening of entomopathogenic fungi against citrus mealybug, *Plannococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae). *African Entomology*, 24(2), 343-351. <https://doi.org/10.4001/003.024.0343>

Flores, P., Alvarado, A., Lankin, G., Lax, P., Prodan, S., & Aballay, E. (2021). Morphological, molecular and ecological characterization of a native isolate of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) from southern Chile. *Parasites & Vectors*, 14(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04548-7>

Gaugler, R., & Kaya, H. (1990). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press.

Gava, C. A. T., & Paranhos, B. A. J. (2023). Combining the virulent *Beauveria bassiana* (Balsam) Vuillemin LCB289 and nematode strains to control pupae of *Ceratitis capitata* Wiedemann. *Biocontrol Science and Technology*, 33(4), 383-396. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2191300>

Gil, Á. M., Climent, J. M. L., Barreda, A. T., & Espadas, A. L. (2022). Guía de Gestión Integrada de Plagas para el cultivo de Cítricos. [https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/guiagipcitricos\\_vers2\\_tcm30-57942.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/guiagipcitricos_vers2_tcm30-57942.pdf)

Giunti, G., Benelli, G., Campolo, O., Canale, A., Kapranas, A., Liedo, P., Meyer, M., Nestel, D., Ruii, L., Scolari, F., Wang, X., & Papadopoulos, N. (2023). Management of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*: Past, present, and future. *Entomologia Generalis*, 43, 1241-1263. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2023/2136>

Gözel, Ç., & Genç, H. (2021). Implementing local entomopathogenic nematodes to control Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae). *Turkish Journal of Entomology*, 45(3), Article 3. <https://doi.org/10.16970/entoted.970210>

GVA. (2023). Previsión de la cosecha de cítricos. Comunitat Valenciana. Campaña 2023/2024. Generalitat Valenciana, Conselleria de Agricultura, Ganadería y Pesca. [https://portalagrari.gva.es/documents/366567370/374418026/Informe+Aforo+2023+WEB.pdf/20024c74-c460-a897-b869-9150f19e7379?t=1694764845505#:~:text=Las%20estimaciones%20para%20la%20presente,previas%20\(%2B1%2C7%25\).](https://portalagrari.gva.es/documents/366567370/374418026/Informe+Aforo+2023+WEB.pdf/20024c74-c460-a897-b869-9150f19e7379?t=1694764845505#:~:text=Las%20estimaciones%20para%20la%20presente,previas%20(%2B1%2C7%25).)

Hazir, S., Kaya, H., Stock, S., & Keskin, N. (2003). Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests. *Turkish Journal of Biology*, 27(4), 181-202.

Hazir, S., Stock, S. P., Kaya, H. K., Koppenhöfer, A. M., & Keskin, N. (2001). Developmental Temperature Effects on Five Geographic Isolates of the Entomopathogenic Nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 77(4), 243-250. <https://doi.org/10.1006/jipa.2001.5029>

- Holka, M., & Kowalska, J. (2023). The Potential of Adjuvants Used with Microbiological Control of Insect Pests with Emphasis on Organic Farming. *Agriculture*, 13(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/agriculture13091659>
- Jean-Baptiste, M. C., de Brida, A. L., Bernardi, D., da Costa Dias, S., de Bastos Pazini, J., Leite, L. G., Wilcken, S. R. S., & Garcia, F. R. M. (2021). Effectiveness of Entomopathogenic Nematodes Against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) Pupae and Nematode Compatibility with Chemical Insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 114(1), 248-256. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa301>
- Juan-Blasco, M., Sabater-Muñoz, B., Argilés, R., Jacas, J. A., Ortego, F., & Urbaneja, A. (2013). Effects of Pesticides Used on Citrus Grown in Spain on the Mortality of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) Vienna-8 Strain Sterile Males. *Journal of Economic Entomology*, 106(3), 1226-1233. <https://doi.org/10.1603/EC12464>
- Kapranas, A., Chronopoulou, A., Peters, A., Antonatos, S., Lytra, I., Milonas, P., & Papachristos, D. (2023). Early and off-season biological control of medfly with entomopathogenic nematodes: From laboratory experiments to successful field trials. *Biological Control*, 179, 105173. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105173>
- Karagoz, M., Gulcu, B., Hazir, C., Kaya, H. K., & Hazir, S. (2009). Biological control potential of Turkish entomopathogenic nematodes against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Phytoparasitica*, 37(2), 153-159. <https://doi.org/10.1007/s12600-008-0020-5>
- Kung, S.-P., Gaugler, R., & Kaya, H. K. (1991). Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57(2), 242-249. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(91\)90123-8](https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90123-8)
- Labaude, S., & Griffin, C. T. (2018). Transmission Success of Entomopathogenic Nematodes Used in Pest Control. *Insects*, 9(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/insects9020072>
- Lacey, L. A., & Georgis, R. (2012). Entomopathogenic Nematodes for Control of Insect Pests Above and Below Ground with Comments on Commercial Production. *Journal of Nematology*, 44(2), 218-225.
- Lewis, E. E., Campbell, J., Griffin, C., Kaya, H., & Peters, A. (2006). Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 38(1), 66-79. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.007>
- Lindgren, J., Wong, T., & Mcinnis, D. (1990). Response of Mediterranean Fruit-Fly (Diptera, Tephritidae) to the Entomogenous Nematode *Steinernema Feltiae* in Field-Tests in Hawaii. *Environmental Entomology*, 19(2), 383-386. <https://doi.org/10.1093/ee/19.2.383>
- Loulou, A., Guerfali, M. M., Muller, A., Bhat, A. H., Abolafia, J., Machado, R. A. R., & Kallel, S. (2022). Potential of *Oscheius tipulae* nematodes as biological control agents against *Ceratitis capitata*. *PLoS ONE*, 17(6), e0269106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269106>
- Malan, A. P., & Manrakhan, A. (2009). Susceptibility of the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and the Natal fruit fly (*Ceratitis rosa*) to entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100(1), 47-49. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.09.007>
- Malacrida, A. R., Guglielmino, C. R., Gasperi, G., Baruffi, L., & Milani, R. (1992). Spatial and temporal differentiation in colonizing populations of *Ceratitis capitata*. *Heredity*, 69(2), 101-111. <https://doi.org/10.1038/hdy.1992.102>
- MAPA - Ministerio de agricultura, pesca y alimentación (2023, 15 de septiembre). El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación comunica una previsión de producción de 5,75 millones de toneladas de cítricos en la campaña 2023/2024 [Nota de prensa]. [https://www.mapa.gob.es/ca/prensa/230915aforocitricos\\_tcm34-660265.pdf](https://www.mapa.gob.es/ca/prensa/230915aforocitricos_tcm34-660265.pdf)
- MAPA - Ministerio de agricultura, pesca y alimentación (2024, mayo). Plan de acción de *Delottococcus aberiae* (De Lotto). [https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/plan\\_accion\\_d\\_aberiae\\_mayo2024\\_tcm30-684109.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/plan_accion_d_aberiae_mayo2024_tcm30-684109.pdf)

- Mani, M., & Shivaraju, C. (2016). Morphology. En M. Mani & C. Shivaraju (Eds.), *Mealybugs and their Management in Agricultural and Horticultural crops* (pp. 7-18). Springer India. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2677-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2677-2_2)
- Martins, D. S., Skouri, W., Chermiti, B., Aboussaid, H., El-Messoussi, S., Oufdou, K., Carbonell, E. A., Sabater-Munoz, B., & Beitia, F. J. (2010). Analysis of two larval-pupal parasitoids (Hymenoptera, Braconidae) in the biological control of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) in Spanish Mediterranean areas. *Electronico*, 252-258. <https://redivia.gva.es/handle/20.500.11939/7338>
- Mason, J. M., & Hominick, W. M. (1995). The effect of temperature on infection, development and reproduction of heterorhabditids. *Journal of Helminthology*, 69(4), 337-345. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00014929>
- Mathulwe, L. L., Malan, A. P., & Stokwe, N. F. (2021). A review of the biology and control of the obscure mealybug, *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae), with special reference to biological control using entomopathogenic fungi and nematodes. *African Entomology*, 29(1), 1-16. <https://doi.org/10.4001/003.029.0001>
- Mathulwe, L. L., Malan, A. P., & Stokwe, N. F. (2022). Laboratory screening of entomopathogenic fungi and nematodes for pathogenicity against the obscure mealybug, *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Biocontrol Science and Technology*, 32(4), 397-417. <https://doi.org/10.1080/09583157.2021.2010653>
- Mathulwe, L., Malan, A., & Stokwe, N. (2023). Combined effect of entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis indica* with entomopathogenic fungi, *Metarhizium pinghaense* and *M. robertsii* against the obscure mealybug, *Pseudococcus viburni*. *International Journal of Pest Management*, 1-11. <https://doi.org/10.1080/09670874.2023.2209043>
- Medina, P., Corrales, E., González-Núñez, M., Smaghe, G., & Viñuela, E. (2008). Effects of *Beauveria bassiana*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. megidis* and *Steinernema feltiae* on the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* and the very sensitive braconid *Psytalia concolor* in the lab. *IOBC/wprs Bulletin*.
- Miller, D., & Giliomee, J. (2011). Systematic Revision of the Mealybug Genus *Delottococcus* Cox & Ben-Dov (Hemiptera: Pseudococcidae). *African Entomology*, 19, 614-640. <https://doi.org/10.4001/003.019.0306>
- Minas, R., Souza, R., Dolinski, C., Carvalho, R., & Burla, R. (2016). Potential of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) to control Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) soil stages. *Nematoda*, 3. <https://doi.org/10.4322/nematoda.02016>
- Mohamed, G. S. (2016). Virulence of Entomopathogenic Fungi against the Vine Mealy bug, *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 26(1), 47-51.
- Mokrini, F., Laasli, S.-E., Benseddik, Y., Joutei, A. B., Blenzar, A., Lakhali, H., Sbaghi, M., Imren, M., Özer, G., Paulitz, T., Lahlali, R., & Dababat, A. A. (2020). Potential of Moroccan entomopathogenic nematodes for the control of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae). *Scientific Reports*, 10(1), 19204. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76170-7>
- Monteiro, G. G., Paulo, H. H., Nascimento, D. D., Pelegrini, G., Lacerda, L. M., Chacon-Orozco, J., Leite, L. G., & Polanczyk, R. A. (2022). Virulence of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria, under laboratory conditions, aiming controlling *Saccharicoccus sacchari* (Cockerell, 1895) (Hemiptera: Pseudococcidae) on sugarcane. *Brazilian Journal of Biology*, 84, e253780. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.253780>
- Montoya, P., Flores-Sarmiento, E., López, P., Ayala, A., & Cancino, J. (2023). Additive Effect of Releasing Sterile Insects Plus Biocontrol Agents against Fruit Fly Pests (Diptera: Tephritidae) under Confined Conditions. *Insects*, 14(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/insects14040337>
- Najm, E. S., Yüksel, E., & Canhilal, R. (2023). Biocontrol Potential of Turkish Entomopathogenic Nematodes Against the Citrus Mealybug, *Planococcus citri* (Risso, 1813) (Hemiptera: Pseudococcidae) Under Laboratory Conditions. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 26(1), 55-61. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogavi.1029502>

- Nawaz, M., & Freed, S. (2022). Pathogenicity of Different Isolates of Entomopathogenic Fungi on Cotton Mealybug, *Phenacoccus solenopsis* Tinsley. *Pakistan Journal of Zoology*, 54(1), 275-282. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/20161124031127>
- Navarro-Llopis, V., Gavara Vidal, A., & Vacas, S. (2022). Dinámica poblacional y distribución de la plaga del cotonet de Sudáfrica *Delottococcus aberiae* De Lotto (Hemiptera: Pseudococcidae) en la Comunidad Valenciana. *Phytoma España. La revista profesional de sanidad vegetal*, 340, 50-55.
- Navarro-Llopis, V., Primo, J., & Vacas, S. (2013). Efficacy of attract-and-kill devices for the control of *Ceratitis capitata*. *Pest Management Science*, 69(4), 478-482. <https://doi.org/10.1002/ps.3393>
- Navarro-Llopis, V., Sanchis, J., Primo-Millo, J., & Primo-Yúfera, E. (2007). Chemosterilants as control agents of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in field trials. *Bulletin of Entomological Research*, 97(4), 359-368. <https://doi.org/10.1017/S0007485307005081>
- Özdemir, M., & Yüksel, E. (2024). Toxicity of Spirotetramat and Cell-free Supernatants of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* Bacteria On the Citrus Mealybug, *Planococcus Citri* and Its Coccinellid Predator, *Cryptolaemus Montrouzieri*. *Journal of Crop Health*, 76(4), 811-820. <https://doi.org/10.1007/s10343-024-00990-0>
- Pell, J. K., Hannam, J. J., & Steinkraus, D. C. (2009). Conservation biological control using fungal entomopathogens. *BioControl*, 55(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9245-6>
- Pérez-Rodríguez, J., Catalán, J., Urbaneja, A., Tena, A., Pérez-Rodríguez, J., Catalán, J., Urbaneja, A., & Tena, A. (2018). Control químico de la nueva plaga de cítricos, el cotonet de les Valls, *Delottococcus aberiae*. *Levante Agrícola: Revista internacional de cítricos*, 440, 46-49.
- Pérez-Rodríguez, J., Martínez-Blay, V., Soto, A., Selfa, J., Monzó, C., Urbaneja, A., & Tena, A. (2017). Aggregation Patterns, Sampling Plan, and Economic Injury Levels for the New Citrus Pest *Delottococcus aberiae* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Economic Entomology*, 110(6), 2699-2706. <https://doi.org/10.1093/jee/tox258>
- Plá, I., García de Oteyza, J., Tur, C., Martínez, M. Á., Laurín, M. C., Alonso, E., Martínez, M., Martín, Á., Sanchis, R., Navarro, M. C., Navarro, M. T., Argilés, R., Briascos, M., Dembilio, Ó., & Dalmau, V. (2021). Sterile Insect Technique Programme against Mediterranean Fruit Fly in the Valencian Community (Spain). *Insects*, 12(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/insects12050415>
- Plata, Á., Gómez-Martínez, M. A., Beitia, F. J., & Tena, A. (2023). Exclusion of Mediterranean ant species enhances biological control of the invasive mealybug in citrus. *Pest Management Science*, 79(6), 2056-2065. <https://doi.org/10.1002/ps.7380>
- Plata, Á., Gómez-Martínez, M. A., Beitia, F. J., & Tena, A. (2024). Native ants facilitate the invasion by *Delottococcus aberiae* in Mediterranean citrus. *Journal of Pest Science*, 97(1), 255-267. <https://doi.org/10.1007/s10340-023-01615-7>
- Poinar, G. (1975). Description and Biology of a New Insect Parasitic Rhabditoid, *Heterorhabditis Bacteriophora* N. Gen., N. Sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae N. Fam.). *Nematologica*, 21, 463-470. <https://doi.org/10.1163/187529275X00239>
- Porras, M. F., Meza, J. S., Rajotte, E. G., Bourtzis, K., & Cáceres, C. (2020). Improving the Phenotypic Properties of the *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) Temperature-Sensitive Lethal Genetic Sexing Strain in Support of Sterile Insect Technique Applications. *Journal of Economic Entomology*, 113(6), 2688-2694. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa220>
- Půža, V. (2015). Control of Insect Pests by Entomopathogenic Nematodes. En B. Lugtenberg (Ed.), *Principles of Plant-Microbe Interactions* (pp. 175-183). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_19)
- Půža, V., & Tarasco, E. (2023). Interactions between Entomopathogenic Fungi and Entomopathogenic Nematodes. *Microorganisms*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010163>

- Rahoo, A. M., Mukhtar, T., Gowen, S. R., Rahoo, R. K., & Abro, S. I. (2017). Reproductive potential and Host Searching Ability of Entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*. *Pakistan Journal of Zoology*, 49(1), 229-234. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2017.49.1.229.234>
- Reyes, A., & Ochando, M. D. (2004). Mitochondrial DNA variation in Spanish populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Tephritidae) and the colonization process. *Journal of Applied Entomology*, 128(5), 358-364. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2004.00858>
- Rohde, C., Mertz, N. R., & Junior, A. M. (2020). Entomopathogenic nematodes on control of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Revista Caatinga*, 33, 974-984. <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n412rc>
- Sabbahi, R., Hock, V., Azzaoui, K., Saoiabi, S., & Hammouti, B. (2022). A global perspective of entomopathogens as microbial biocontrol agents of insect pests. *Journal of Agriculture and Food Research*, 10, 100376. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100376>
- Shaurub, E.-S. H., Soliman, N. A., & Sabbour, M. M. (2021). Development of the soil-inhabiting stages of *Ceratitis capitata* infected with entomopathogenic nematodes: Insights on survival. *Invertebrate Reproduction & Development*, 65(3), 155-162. <https://doi.org/10.1080/07924259.2021.1920482>
- Singh, A. K., Kumar, M., Ahuja, A., Vinay, B. K., Kommu, K. K., Thakur, S., Paschapur, A. U., Jeevan, B., Mishra, K. K., Meena, R. P., & Parihar, M. (2022). Chapter 6 - Entomopathogenic nematodes: A sustainable option for insect pest management. En A. Rakshit, V. S. Meena, P. C. Abhilash, B. K. Sarma, H. B. Singh, L. Fraceto, M. Parihar, & A. K. Singh (Eds.), *Biopesticides* (pp. 73-92). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823355-9.00007-9>
- Soto, A. (2016, diciembre). *Delottococcus aberiae*: Viabilidad de su control biológico. <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/284-diciembre-2016/delottococcus-aberiae-viabilidad-de-su-control-biologico>
- Soto, A., Benito, M., Puig Bargaúes, J., Mocholí, S., & Martínez Blay, V. (2020). Avances en la aplicación del control biológico del cotonet *Delottococcus aberiae* (De Lotto) (Hemiptera: Pseudococcidae). *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, 318, 26-30.
- Stokwe, N. F., & Malan, A. P. (2016). Susceptibility of the obscure mealybug, *Pseudococcus viburni* (Signoret) (Pseudococcidae), to South African isolates of entomopathogenic nematodes. *International Journal of Pest Management*. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09670874.2015.1122250>
- Stuart, R. J., Polavarapu, S., Lewis, E. E., & Gaugler, R. (1997). Differential Susceptibility of *Dysmicoccus vaccinii* (Homoptera: Pseudococcidae) to Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Journal of Economic Entomology*, 90(4), 925-932. <https://doi.org/10.1093/jee/90.4.925>
- Tena, A., Catalán, J., Bru, P., & Urbaneja, A. (2014). Primeros pasos para la gestión integrada del nuevo cotonet, *Delottococcus aberiae* (De Lotto) (hemiptera: Pseudococcidae). *Levante Agrícola: Revista internacional de cítricos*, 424, 305-306.
- Tena, A., García-Bellón, J., & Urbaneja, A. (2017). Native and naturalized mealybug parasitoids fail to control the new citrus mealybug pest *Delottococcus aberiae*. *Journal of Pest Science*, 90(2), 659-667. <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0819-7>
- Tena, A., Pérez-Rodríguez, J., & Urbaneja, A. (2016). Bases para la gestión integrada del cotonet de les Valls, *Delottococcus aberiae*. *Phytoma España. La revista profesional de sanidad vegetal*, 284, 82-84.
- Thanwisai, A., Muangpat, P., Meesil, W., Janthu, P., Dumida, A., Subkrasae, C., Ardpairin, J., Tandhavanant, S., Yoshino, T. P., & Vitta, A. (2022). Entomopathogenic Nematodes and Their Symbiotic Bacteria from the National Parks of Thailand and Larvicidal Property of Symbiotic Bacteria against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Biology*, 11(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/biology11111658>
- Toledo, J., Moran-Aceves, B. M., Ibarra, J. E., & Liedo, P. (2023). Can Entomopathogenic Nematodes and Their Symbiotic Bacteria Suppress Fruit Fly Pests? A Review. *Microorganisms*, 11(7), 1682. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071682>

- Trejo-Meléndez, V. J., Ibarra-Rendón, J., & Contreras-Garduño, J. (2024). The evolution of entomopathogeny in nematodes. *Ecology and Evolution*, 14(2), e10966. <https://doi.org/10.1002/ece3.10966>
- Vacas, S., Navarro, I., Marzo, J., Navarro-Llopis, V., & Primo, J. (2019). Sex Pheromone of the Invasive Mealybug Citrus Pest, *Delottococcus aberiae* (Hemiptera: Pseudococcidae). A New Monoterpenoid with a Necrodane Skeleton. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01443>
- van Niekerk, S., & Malan, A. P. (2012). Potential of South African entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) for control of the citrus mealybug, *Planococcus citri* (Pseudococcidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(2), 166-174. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.07.023>
- Vercher, R., González, S., Sánchez-Domingo, A., & Sorribas, J. (2023). A Novel Insect Overwintering Strategy: The Case of Mealybugs. *Insects*, 14(5), 481. <https://doi.org/10.3390/insects14050481>
- Vieux, P. D., & Malan, A. (2013). The Potential Use of Entomopathogenic Nematodes to Control *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae). *South African Journal of Entology and Viticulture*, 34(2), Article 2. <https://doi.org/10.21548/34-2-1109>
- Wakgari, W. M., & Giliomee, J. (2005). Description of adult and immature females of six mealybug species (Hemiptera: Pseudococcidae) found on citrus in South Africa. *African Entomology*, 13, 281-332.
- Xu, J., Shao, Z., Wang, Z., Wang, Z., Wu, J., & Ali, S. (2017). Effect of the Entomopathogenic Fungus, *Isaria fumosorosea* on Mortality and Oxidative Stress Response of the Pink hibiscus mealybug, *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 27(2), 255-260.
- Yağcı, M., Akdeniz Fırat, T., Erdoğan, F. D., & Şahin, M. (2021). Virulence of four entomopathogenic nematode against different stages of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00472-9>
- Zart, M., de Macedo, M. F., Simões Santos Rando, J., Doneze, G. S., Brito, C. P., de Souza Poletto, R., & Alves, V. S. (2021). Performance of entomopathogenic nematodes on the mealybug, *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae) and the compatibility of control agents with nematodes. *Journal of Nematology*, 53, e2021-20. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2021-020>