



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Instituto Universitario de Gestión Forestal Sostenible

MÁSTER:

**INVESTIGACIÓN EN CONSERVACIÓN Y USO SOSTENIBLE DE SISTEMAS
FORESTALES**

**Métodos de control biológico frente a la avispa
del castaño *Dryocosmus kuriphilus*
(Hymenoptera; Cynipidae) en Cantabria:
parasitoides autóctonos y hongos
entomopatógenos**

Alumno: Francisco Javier Dorado Reyes

Tutora: Mercedes Fernández Fernández

Cotutor: Julio Javier Díez Casero

Julio de 2018



1. Resumen

La avispa del castaño *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (1951) (Hymenoptera; Cynipidae) es una de las plagas más importantes del género *Castanea* en el mundo. Desde que se detectara en España, en 2012, todos los esfuerzos en controlar la plaga han sido en vano, y actualmente, la avispa se encuentra en la mayor parte del área de distribución de *Castanea sativa* Mill. En 2016, se llevaron a cabo liberaciones experimentales controladas del parasitoide exótico *Torymus sinensis* Kamijo, único método de control eficaz hasta la fecha en el mundo, pero los riesgos potenciales de su utilización hacen necesario buscar alternativas. El objetivo de este trabajo ha sido el de plantear otros métodos para lograr un control eficaz, evitando en lo posible, los efectos negativos que puedan darse sobre la comunidad ecológica donde se aplique. Para tal fin, en 2017, se recogieron de dos castaños, 250 agallas para su disección, y 239 para llevar a cabo la emergencia en laboratorio de los posibles parasitoides. Adicionalmente, se sembraron 13 agallas necrosadas con el objetivo de aislar e identificar los hongos asociados. A partir de ellos, se seleccionaron para llevar a cabo la prueba de entomopatogenicidad: *Fusarium proliferatum*, *Gnomoniopsis* sp. y *Colletotrichum acutatum*. Se identificaron siete especies autóctonas de parasitoides asociadas a *D. kuriphilus* en Cantabria siendo las más abundantes: *Sycophila variegata* y *Torymus auratus*. La tasa de parasitación promedio difirió significativamente entre los árboles muestreados. Las mayores tasas se asociaron con el castaño rodeado de quercíneas. La prueba de patogenicidad ha demostrado el potencial entomopatógeno de *C. acutatum* y *F. proliferatum* frente a *D. kuriphilus*, y podrían ser usados como controladores naturales alternativos.

Palabras clave

Avispa del castaño · *Sycophila variegata* · *Torymus auratus* · *C. acutatum* · *F. proliferatum*





2. Abstract

The Asian chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* (1951) (Hymenoptera; Cynipidae) is one of the most important pest of the genus *Castanea* worldwide. After the first detection in Spain (2012) and despite all efforts to control it, the pest is currently present in the most of the *Castanea sativa* Mill. distribution area. In 2016, Spanish government began to release the exotic parasitoid *Torymus sinensis* Kamijo in a controlled manner, the only effective control method in the world until now, but the potential risks of using it makes necessary to look for other alternatives. The objective of this work has been to raise alternatives, in order to achieve an effective control method that prevent negative effects on the ecological community where it is applied. For that purpose, in 2017, 250 and 239 galls from two *C. sativa* trees were collected in order to dissect some of them and to place the rest in emergence boxes. In addition, 13 necrotic galls were plated to isolate and identify the associated fungi. From them, three fungal isolates were selected for the entomopathogenicity test: *Fusarium proliferatum*, *Gnomoniopsis* sp. and *Colletotrichum acutatum*. Seven indigenous parasitoids associated to *D. kuriphilus* in Cantabria were identified, being the most abundant *Sycophila variegata* and *Torymus auratus*. Significant differences in the average parasitism rate between sampled trees were found. Higher parasitism rates was linked with greater specific richness in the forest of oak trees surrounding the chestnuts sampled, which probably act as indigenous parasitoids reservoir. The entomopathogenic potential of *C. acutatum* and *F. proliferatum* against *D. kuriphilus* has been demonstrated and, moreover, these fungi could be used as alternative natural controllers.

Keywords

Asian chestnut gall wasp · *Sycophila variegata* · *Torymus auratus* · *C. acutatum* · *F. proliferatum*





3. Introducción

La avispija del castaño *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (1951), es un insecto himenóptero de la familia Cynipidae. Es una plaga originaria de China (Aebi *et al.*, 2006) que ataca a diversas especies del género *Castanea*, siendo una de las más susceptibles, *C. sativa* (castaño europeo) (Bosio y Vettorazzo, 2005). Este himenóptero comenzó su dispersión alrededor de 1940 cuando llegó a Japón (Oho y Umeya, 1975), extendiéndose a Corea en 1958 (Cho y Lee, 1963) y a EEUU en 1974 (Payne *et al.*, 1975). Posteriormente, se detecta en Europa en Italia en 2002 (Brussino *et al.*, 2002), y se dispersa rápidamente por todo el área de distribución de *C. sativa*. En España, se advirtió su presencia por primera vez en 2012 en varias comarcas catalanas (La Selva, Alt Empordà, Baix Empordà, Garrotxa, Gironès, Osona, Maresme y Vallès Oriental; Pujade-Villar *et al.*, 2013), y un año más tarde, se encontró en Cantabria (BOCn161, 2013). En 2014, informan sobre su presencia en Galicia (Lugo, Ourense y A Coruña; Pérez-Otero y Mansilla, 2014), Asturias (Gobierno del Principado de Asturias, 2014), Málaga (BOJA, 2015) y Navarra (Navarra, 2014). En 2016, se detecta en Madrid y en Vizcaya. En lo que se refiere a la comunidad de Castilla y León, se detectó por primera vez en 2015, al norte de la provincia de Burgos, seguidamente en El Bierzo (León) (JCyL, 2017), y recientemente, en Zamora (2018).

La avispija del castaño es una especie univoltina con reproducción partenogenética de tipo telítoca (es decir, las hembras se desarrollan a partir de huevos no fertilizados) (Pérez-Otero *et al.*, 2017). Durante el verano, las hembras de *D. kuriphilus* realizan una puesta de aproximadamente 200 huevos (unos 5 huevos por yema) durante su corta vida (5 días a 25°C y 10 días a 15°C; Bernardo *et al.* 2013) (Cho y Lee, 1963). Los huevos eclosionan en aproximadamente 30 días (Cho y Lee, 1963). Se suceden tres estadios larvarios antes de pasar a pupa: un primer estadio larvario que se desarrolla muy lentamente desde el verano (julio-agosto) hasta finales de marzo-abril del año siguiente, un estadio intermedio desde mediados de abril-mayo y que se extiende durante un mes, y un estadio terminal, presente en las agallas desde finales de abril hasta finales de mayo (Viggiani y Nugnes, 2010). En este último estadio, la larva se alimenta durante 20-30 días, para transformarse finalmente en pupa (Bosio y Vettorazzo, 2005). Dependiendo de la altitud, exposición o genotipo del hospedante, la pupación se produce desde mediados de mayo hasta mediados de julio (Bosio y Vettorazzo, 2005). Los adultos emergen desde mediados de junio a finales de julio.





D. kuriphilus induce la formación de agallas de color verde o rosadas de unos 5 - 20 mm de diámetro que se desarrollan cuando las nuevas yemas de invierno del árbol comienzan a brotar (Bosio y Vettorazzo, 2005). Los daños son directos sobre brotes y hojas, lo que provoca una reducción del área foliar, generando indirectamente, una reducción de la biomasa (Kato y Hijii, 1997). Estos daños evolucionan con el tiempo hacia una alteración progresiva y significativa de la arquitectura de la rama (Gehring *et al.*, 2018). La fotosíntesis se ve afectada por una reducción en la asimilación de CO₂ y en la conductancia estomática, que puede influir en el comportamiento de la especie hospedante ante episodios de cambio climático como el estrés hídrico (Ugolini *et al.*, 2014). Además, los daños generados sobre los brotes apicales provocan un aborto de las flores femeninas, es decir, de las flores que se transformarían en fruto tras la polinización por los amentos masculinos (Kato y Hijii, 1997). Estos daños conllevan a una reducción en la producción de fruto de entre un 50-80% en *C. sativa* (Battisti *et al.*, 2014) y de un 50-70% en otras especies como *C. mollissima*, *C. crenata* y *C. dentata* (Dixon *et al.*, 1986). Sin embargo, la infestación raramente causa la muerte de la planta, únicamente se da en casos de daños severos en brinzales o plantas debilitadas (Kato y Hijii, 1997; Cooper y Rieske, 2007; Gehring *et al.*, 2018).

Una de las cuestiones más preocupantes es la interacción positiva que pueda tener *D. kuriphilus* con otros patógenos asociados a las especies de *Castanea*. En este sentido, Meyer *et al.* (2015), demostraron la existencia de una interacción indirecta entre *D. kuriphilus* y el chancro del castaño, *Cryphonectria parasitica*, ya que las agallas abandonadas por la avispa son colonizadas por el chancro del castaño, lo que sugiere que las agallas muertas, o casi muertas son un adecuado sustrato de crecimiento para el hongo. Esta interacción ya fue observada por Turchetti *et al.* (2010), solo que en este caso, sería el debilitamiento generado en el árbol debido a los ataques intensos de la avispa del castaño, el que podría favorecer el establecimiento de *C. parasitica*. Además, la existencia de una correlación positiva entre el año de la agalla y la incidencia del chancro (Meyer *et al.*, 2015), podría llevar a los castañares a una espiral de decaimiento generalizado, debido en parte a la reducción de la capacidad fotosintética, y por otra, a la incidencia de los patógenos habituales de la especie que aprovecharían ese debilitamiento para su establecimiento (Turchetti *et al.*, 2010).

El control de la avispa del castaño en vivero y plantaciones jóvenes se puede atajar fácilmente mediante la corta y destrucción de las ramas afectadas, justo en el momento de detección de las primeras agallas, y antes de que los adultos de *D. kuriphilus* emerjan (JCyL, 2007). Por su parte, el control químico de la plaga no es un





método eficaz mientras el insecto se encuentre dentro de la agalla, ya que ésta lo protege (Moriya *et al.*, 1989; Cooper y Rieske, 2007). Solamente hay un estudio de Griffo *et al.* (2010) que demuestra la eficacia de piretroides usados contra los adultos del insecto, sin embargo, es difícil detectar con precisión el momento exacto de emergencia de los mismos (Germinara *et al.*, 2011). Adicionalmente, el control selvícola mediante podas ha de efectuarse como herramienta de contención mientras que otro método más efectivo, como el control biológico clásico, se torne efectivo. El tratamiento de poda más eficaz para reducir las poblaciones de *D. kuriphilus* en los castaños ha sido el de “poda en verde”. Con este método se obtuvieron brotes completamente sanos cuando la poda se realizó durante el pico del periodo de puesta de huevos de las hembras de *D. kuriphilus*, pues los brotes del árbol que aún no se han desarrollado completamente durante ese periodo, son menos susceptibles de ser atacados (Maltoni *et al.*, 2012).

Por lo que se refiere a los métodos de control biológico cabe mencionar que los agentes biológicos responsables de regular el número de otros organismos incluyen enemigos naturales (depredadores, parásitos y patógenos), así como también, competidores por los recursos alimenticios, de espacio u otros. El control biológico, por tanto, emplea activamente uno o varios de éstos factores para disminuir las densidades de organismos plaga en situaciones donde la regulación de la población natural es inadecuada (Hokkanen, 2001). Existen varios métodos de control biológico como por ejemplo, el uso de hongos entomopatógenos (Vega *et al.*, 2012) o el control biológico por conservación (Hokkanen, 2001). En este sentido, una de las herramientas biológicas ampliamente empleada en el control de la plaga ha sido la búsqueda de genotipos hospedantes resistentes. Se inició en Japón en 1947, y finalizó con la selección de cuatro variedades resistentes. Pero un biotipo de avispa más agresivo logró infestar estas variedades (Moriya *et al.*, 2003). EEUU en 1995 (Anagnostakis *et al.*, 2009) e Italia en 2004, 2008 y en 2015 (Panzavolta *et al.*, 2012; Sartor *et al.*, 2009, 2015; Nugnes *et al.*, 2018) iniciaron también, programas de búsqueda de resistencia. Dini *et al.* (2012), detectaron una reacción hipersensible en el híbrido “Bouche de Bétizac” (*C. sativa* cv. “Bouche Rouge” x *C. crenata*) que mataba las larvas de *D. kuriphilus* en los primeros estadios. En España, Pérez-Otero *et al.* (2017) y Cuenca *et al.* (2017), están estudiando la sensibilidad ante *D. kuriphilus* de cultivares, portainjertos híbridos e híbridos de producción directa.

Sin embargo, actualmente, el método de control biológico que se ha demostrado más eficaz en el control de la plaga manteniéndola bajo unos límites tolerables de infestación cercanos al 30% (Gyoutoku y Uemura, 1985) ha sido el uso del parasitoides





específico *Torymus sinensis* Kamijo. Este torímido, originario de China, fue importado por investigadores de Japón (en la década de los 70), de EEUU (1977) e Italia (2004), logrando en todos los casos, controlar la plaga y mantenerla por debajo de unos límites tolerables (Moriya *et al.*, 1989; Cooper y Rieske, 2007; Quacchia *et al.*, 2014), si bien, dichos procesos han llevado un periodo largo de años (Moriya *et al.*, 1989). En España, se han realizado liberaciones experimentales controladas de *T. sinensis* en el año 2016, en el Valle del Genal, Sierra de las Nieves y Sierra Blanca (Andalucía), así como, en Lugo y Ourense (Galicia), dentro del programa de acción englobado en el Plan de Lucha Biológica contra la Avispa del Castaño, y más recientemente, en 2018, en el Bierzo (León, Castilla y León). Además de los años necesarios para lograr la eficacia, la aplicación de este método de control conlleva una serie de potenciales riesgos para el medio ambiente como son aquellos relacionados con cambios en la distribución y abundancia de la biodiversidad nativa (van Lenteren *et al.*, 2006), como las hibridaciones con parasitoides naturales, desplazamientos e hiperparasitaciones. Relacionado con esto, en Japón, se han detectado hibridaciones entre *Torymus beneficus* y *Torymus sinensis* (Toda *et al.*, 2000; Yara *et al.*, 2000; Yara, 2014), e incluso, desplazamientos de *T. beneficus* debido al efecto de *T. sinensis*. En EEUU, Cooper y Rieske (2011), además, observaron casos de hiperparasitismo de *Ormyrus labotus* a *T. sinensis*, incluso, sobre agallas de *D. kuriphilus* de años anteriores en las que *T. sinensis* estaba hibernando. Esto, supondría una supresión de las poblaciones del parasitoide introducido, y por tanto, un resultado nulo como organismo de control biológico de la avispa del castaño. En Europa, Ferracini *et al.* (2015) advierten del riesgo de hibridación entre *T. sinensis*, con al menos, cuatro especies de *Torymus* con los que comparte los ciclos de vuelo. Además, se advierte del riesgo de que *T. sinensis* pueda realizar un cambio de hospedante (a *quercíneas*, por ejemplo) ante la falta de disponibilidad de alimento en los castañares (Ferracini *et al.*, 2015), algo que llevaría a *T. sinensis* a ampliar su nuevo rango de distribución de manera descontrolada.

Teniendo en cuenta los efectos negativos del empleo de *T. sinensis*, es interesante destacar la posibilidad de la utilización del control biológico por conservación, que hace uso de los enemigos naturales ya presentes en el ecosistema, determinando los factores que limitan su eficacia, y utilizando, posteriormente, el manejo del hábitat u otros medios para cambiar el equilibrio plaga-enemigo natural con el fin de adquirir un control más completo (Hokkanen, 2001). En este sentido, los enemigos naturales presentes en el ecosistema serían los parasitoides de otros cinípidos, como por ejemplo, los asociados a las *quercíneas*, que por su solapamiento de hábitat con el





castaño, también podrían parasitar a *D. kuriphilus*. De hecho, son numerosos los estudios sobre los parasitoides autóctonos asociados a la avispa del castaño en países como China, Japón, Corea, EEUU, Eslovenia, Croacia, Italia y Portugal (Aebi *et al.*, 2006; Cooper y Rieske, 2007; Matošević y Melika, 2013; Kos *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2017; Panzavolta *et al.*, 2018). En España, Pérez-Otero *et al.* (2017), detectan al menos nueve especies de parasitoides nativos asociados a la avispa en Galicia mientras que otros autores hablan de 12 especies de parasitoides en toda España (Nieves-Aldrey y Gil Tapetado, 2015). Todas estas especies pertenecen a la superfamilia Chalcidoidea, y, principalmente a los géneros *Torymus*, *Megastigmus*, *Eurytoma*, *Sycophila*, *Ormyrus* y *Eupelmus*. En Italia, las tasas de parasitación son muy variables según zonas: desde 0,5% (Colombari y Battisti, 2016) hasta 31,75% (Santi y Maini, 2011). En EEUU, en función de regiones, las tasas oscilaron entre el 1% hasta el 100%, (Cooper y Rieske, 2011) y en Portugal han detectado valores entre el 18% y el 55% (Santos *et al.*, 2017).

Otro método comprometido con el medio ambiente, los seres humanos y los organismos no objetivo, y que además, confiere una alternativa más segura en el manejo integrado de plagas frente a los insecticidas químicos, es el control biológico mediante el uso de hongos entomopatógenos (Shah y Pell, 2003). En 2009, se detectaron en Italia una serie de agallas necrosadas en cuyo interior se encontraban cadáveres de *D. kuriphilus*; tras su aislamiento y prueba de patogenicidad, Magro *et al.*, (2010) demostraron que el hongo causante de la muerte del insecto pertenecía al género *Gnomoniopsis*. Posteriormente, Addario y Turchetti (2011) detectaron la presencia de varios hongos entomopatógenos, en concreto, dos cepas pertenecientes al complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti*, con las que obtuvieron unos porcentajes de mortalidad de adultos de *D. kuriphilus* de entre el 60 y el 70%, y podrían tener posibilidad como organismos de control biológico del insecto. Otro estudio sobre la micoflora asociada a las agallas de *D. kuriphilus* en Italia, demostró el potencial de *Fusarium proliferatum* como agente de control de la avispa (Tosi *et al.*, 2015). Además, Gaffuri *et al.* (2015), encontró un endófito del castaño, *Colletotrichum acutatum*, asociado con la muerte de los insectos en las agallas. En España, en Cantabria, Fernández *et al.* (2018) han identificado siete especies de hongos asociadas a agallas necróticas algunos de ellas con un marcado carácter entomopatógeno, especies que coinciden con las detectadas por autores como Magro *et al.* (2010), Addario y Turchetti (2011), y Tosi *et al.* (2015), lo que supone una nueva y posible vía a desarrollar para llevar a cabo el control biológico de *D. kuriphilus*.





4. Objetivos

El objetivo general de este Trabajo ha sido identificar posibles técnicas alternativas a los métodos de control biológico tradicionales de *D. kuriphilus* con el fin de conocer sus posibilidades para el control efectivo de la plaga con el menor impacto ecológico. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar las especies de parasitoides nativos asociados a la avispa del castaño en la provincia de Cantabria y tasa de parasitación.
2. Determinar la microbiota asociada a las agallas necróticas de *D. kuriphilus*.
3. Testar la entomopatogenicidad de determinados hongos potenciales.

5. Material y Métodos

5.1. Área de estudio

Se han seleccionado dos castaños (C4 y C5) infestados por *D. kuriphilus* en el municipio de Santiurde de Toranzo (Cantabria, Norte de España; C4 (UTM 30N, 427452.68; 4782878.13) y C5 (UTM 30N, 426561.46; 4783951.72). El castaño C4 se sitúa en la ladera sur del valle (400 m.s.n.m.) que forma a su paso el arroyo Corral Mayor, y está rodeado por quercíneas, principalmente ejemplares de *Quercus robur* y sauces (*Salix* spp.). El castaño C5 se sitúa en una ladera de gran pendiente (500 m.s.n.m.), a la orilla de una pista forestal rodeado por una repoblación de pino de Monterrey (*Pinus radiata*) (Figura 1).



Figura 1. Castaños seleccionados para el estudio. a) Castaño 4 (C4). b) Castaño 5 (C5).

5.2. Recogida del material vegetal

Un total de 125 agallas verdes del año en curso por árbol fueron recogidas de mayo a julio de 2017 (31/05; 14/06; 03/07; 13/07; 25/07) para su disección.

Adicionalmente, en las cuatro primeras fechas se recogieron agallas para llevar a cabo la emergencia en laboratorio de los posibles parasitoides (83 agallas del C4: 25, 32, 7, 19 agallas en orden temporal y 156 agallas del C5: 25, 53, 7, 71 respectivamente).



En cada salida, se cortó el material vegetal de cada árbol con una tijera de poda de altura y se seleccionaron teniendo en cuenta cierta uniformidad en el grosor de las agallas. Tras cada corte de rama, la herramienta de corte se esterilizó con alcohol al 70%. Finalizada la recogida, las agallas se metieron en cajas de almacenaje hasta llegar al laboratorio donde se almacenó en nevera a 4 °C hasta su procesado.

5.3. Disección de agallas

La disección de las agallas se realizó bajo una lupa binocular (Modelo SMZ– 168) con un zoom de rango 6.7:1. Con la que se tomaron fotografías de los distintos estadios de desarrollo de la avispa como de los parasitoides (cámara MOTICAM 580 5.0 MP acoplada a la lupa binocular) (Figura 2). Se anotó el estado de desarrollo y, posteriormente fueron conservadas en alcohol (70%) en tubos Eppendorf de 1.5 ml. De cada fecha de muestreo, se tomaron, además, otra serie de datos como: número total de cámaras por agalla, número total de cámaras y porcentaje de cámaras vacías por fecha (n° cámaras vacías \times 100 / n° de cámaras totales). Así mismo, se extrajeron los parasitoides encontrados en las agallas y se estimó la tasa de parasitación (n° cámaras parasitadas \times 100 / n° de cámaras totales) según Panzavolta *et al.* (2013).



Figura 2. Disección de una de las agallas. Se puede observar la cámara de pupación y un ejemplar de *D. kuriphilus* en fase de pupa I.

5.4. Emergencia e identificación de parasitoides adultos.

La emergencia de los adultos se llevó a cabo en cajas oscuras de cartón en las que se dispusieron conectados dos viales de 5 cm de diámetro para recogida de los emergentes (Figura 3). Las cajas fueron revisadas diariamente y los adultos emergentes fueron fotografiados y dispuestos en tubos Eppendorf de 1.5 ml con alcohol al 70% para posterior identificación. La identificación de los adultos recogidos, procedentes tanto de la disección de las agallas como de las cajas de emergencia, fue llevada a cabo por el Dr. Juli Pujade i Villar, del departamento de Biología Evolutiva, Ecología y Ciencias Ambientales de la Universidad de Barcelona (UB).



Figura 3. Cajas de emergencia de adultos de *D. kuriphilus* y de sus parasitoides nativos.



5.5. Aislamiento de cepas fúngicas

En la fecha de recolección del 14 de junio, se detectaron 13 agallas necrosadas (siete del C4 y seis del C5) entre el material destinado a la disección de las agallas. Éstas, fueron esterilizadas superficialmente durante 1´ en 100 ml de agua, 1´ en 100 ml de etanol 70 %, 1´ en 100 ml de hipoclorito sódico 2 % y 1´ en 100 ml de agua destilada estéril (Fernández *et al.*, 2018) y diseccionadas bajo lupa binocular. El aislamiento, a partir de hifas procedentes de cadáveres de insectos del interior de las cámaras y fragmentos de agallas de aproximadamente 0.5 cm de longitud, se realizó en placas Petri que contenían PDA enmendado con estreptomycin (0.6 g/l). Las placas fueron incubadas durante siete días a temperatura ambiente. Fragmentos de hifas del exterior de las colonias fúngicas desarrolladas a partir de los diversos tejidos vegetales y cuerpos de insectos fueron sub-cultivadas en nuevas placas con PDA. Los aislados resultantes se identificaron visualmente en función de sus características morfológicas (esporas y cuerpos de fructificación), y además, fueron comparados visualmente con morfotipos caracterizados molecularmente por la región ITS en recogidas de años anteriores (Fernández *et al.*, 2018). Finalmente, fueron seleccionados tres aislados para las pruebas de patogenicidad: *Fusarium proliferatum* (AG107), *Gnomoniopsis* sp. (H357) y *Colletotrichum acutatum* (C217).

5.6. Pruebas de patogenicidad

En este ensayo se utilizaron 80 agallas procedentes del árbol C4. Las agallas fueron seleccionadas procurando que no tuviesen agujeros de emergencia y que el tamaño de las mismas fuese uniforme, se esterilizaron superficialmente según lo descrito en el apartado anterior, y se les realizaron incisiones circulares de 2 mm de diámetro con un sacabocados esterilizado.

Para llevar a cabo la inoculación se utilizaron dos procedimientos, en función de las habilidades de esporulación de los aislamientos: (a) mediante suspensión esporal para *F. proliferatum* (Fp) y *C. acutatum* (Ca) y (b) mediante micelio, utilizando discos de 2 mm de diámetro del medio de cultivo del hongo para *Gnomoniopsis* sp.(G). Para el procedimiento de suspensión esporal, dos concentraciones esporales fueron empleadas, 10^3 y 10^6 esporas/ml, con diez agallas por concentración y hongo. Para la inoculación con micelio, diez agallas fueron infectadas con micelio. Las esporas para las diluciones fueron recogidas de PDB (*F. proliferatum*), y directamente de la placa de medio de cultivo del hongo con agua esterilizada (*C. acutatum*). A cada incisión de agalla de los tratamientos de *F. proliferatum* y *C. acutatum* se le añadió un volumen de 5 µl de



la dilución esporal. Se realizaron tres controles: absoluto (sin incisión) (Cab → n = 10), con incisión y añadiéndole 5 µl de agua esterilizada (CH₂O → n = 10), e incisión más un disco de PDA de 2 mm (Cagr → n = 10). Las agallas una vez esterilizadas e inoculadas, fueron introducidas en tubos de ensayo de cristal de 30 x 200 mm esterilizados que contenían en su interior una columna de tres centímetros de Medio de Cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) preparado con los macronutrientes: NH₄NO₃, K₂SO₄, MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄; y sellados con tapón de plástico y *parafilm*®. Seguidamente, los tubos de ensayo con las agallas inoculadas, fueron emplazados en una cámara de cultivo con temperatura controlada a 24 °C y un fotoperiodo de 18 horas de luz diarias durante un periodo de 14 días.

A los cuatro, siete y 14 días post-inoculación de las agallas, se evaluó el grado de infección de la agalla mediante una escala de cinco grados, que incluía el porcentaje de necrosis, asignando a cada una, dentro de una de las siguientes categorías: No necrosis, <50%, ≈50%, >50%, 100%.

A los 14 días de la inoculación, ocho agallas de cada tratamiento fueron diseccionadas para su evaluación. Se anotó el contenido de las cámaras, el estadio del insecto, la mortalidad y si había evidencias de micelio en el interior de la cámara acompañando al insecto.

5.7. Re-aislamiento de cepas fúngicas

Tras finalizar el ensayo, con el objetivo de satisfacer los postulados de Koch, se re-aislaron dos agallas de cada tratamiento en placas Petri que contenían PDA enmendado con estreptomina (0.6 g/l) y los morfotipos fueron comparados con los originales.

5.8. Análisis estadístico

Para detectar diferencias en el número medio de cámaras por agalla entre los árboles empleados se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon (Función *wilcox.test* del software estadístico R), debido a que los datos no seguían una distribución normal. Por otro lado, para detectar diferencias en cuanto a la variable porcentaje medio de parasitación se empleó la prueba estadística “t” de Student, mediante la función *t.test* de R. En cuanto a las gráficas de desarrollo de los estadios de *D. kuriphilus* fueron suavizados mediante regresión ponderada (*loess*) del software estadístico R.



Tomando los valores del porcentaje de necrosis de las agallas se construyó la variable “área bajo la curva del progreso de la enfermedad” (AUDPC) cuyo gráfico tiene en el eje de ordenadas, el porcentaje de infección de la agalla, y en el eje de abscisas, el tiempo en días. Para el análisis de la variable AUDPC, se realizó un modelo lineal generalizado mixto (PROC MIXED del programa estadístico SAS®) y se le sometió a test individuales para cada pareja de medias lo que permitió detectar las diferencias entre los distintos tratamientos aplicados a las agallas.

Para poder evaluar las diferencias en cuanto a la variable presencia de micelio en las cámaras que contenían a un insecto, se realizó un modelo logístico mediante el programa PROC LOGISTIC de SAS®. De forma que la variable dependiente fue una variable de código binario (0-1). En la cual, “0” nos indicaba ausencia de micelio en la cámara que contiene al insecto, y “1” nos indicaba la presencia del micelio del hongo acompañando al insecto. Por su parte, la variable independiente fue una variable factor cuyos niveles eran los tratamientos. La probabilidad modelada fue “presencia de micelio”. Para poder comparar los tratamientos se empleó el test de diferencias de medias de mínimos cuadrados.

6. Resultados

6.1. Disección de agallas.

De las 250 agallas diseccionadas se contabilizaron un total de 599 cámaras. El número medio de cámaras por agalla fue de 2.2 ± 0.1 con máximos de siete para el árbol C4 y de 2.5 ± 0.2 con máximos de diez para el C5. Estos valores no difirieron entre sí de forma significativa ($p = 0.4592$).

Se registraron un total de 298 ejemplares de *D. kuriphilus*, de los cuales, un 46.3% fueron larvas, un 21.5% pupas I, un 8.7% pupas II, y un 23.5% fueron adultos.

La fenología de *D. kuriphilus* se representa en la figura 4. La duración del periodo de desarrollo así como la fecha de la emergencia de los adultos fue similar en ambos castaños. El desarrollo de la pupa I o pupa blanca se mantuvo hasta mediados de julio en el castaño 4, mientras que en el C5 se observó más pronto, entre finales de mayo y principios de julio. En cambio, las primeras pupas II o pupas negras se detectaron a principios-mediados de junio en C5, con el máximo a principios de julio, mientras que en C4, no se detectaron hasta finales de junio, pero se mantuvieron hasta finales de julio.



El estadio adulto apareció, en ambos castaños, a mediados de junio, y se observaron hasta finales de julio.

De forma general, podemos comentar que la fenología de la avispa en la zona de estudio es la siguiente: las larvas se observan hasta finales de junio; las pupas, desde finales de mayo-principios de junio hasta finales de julio; y los adultos, aparecen desde mediados de junio hasta mediados-finales de julio (Figura 5). Los primeros orificios de emergencia de los adultos se detectaron a principios de julio.

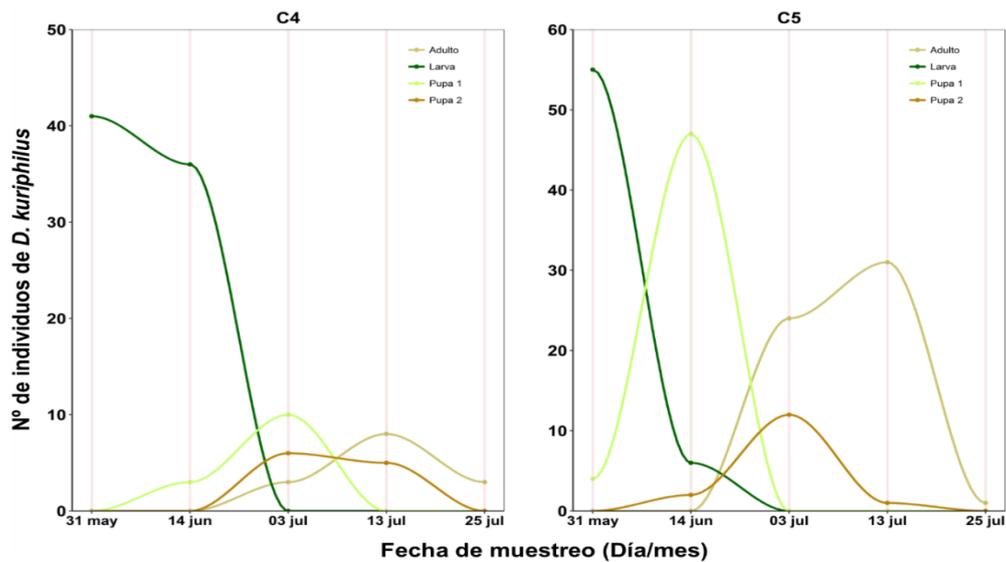


Figura 4. Fenología de *D. kuriphilus* para C4 y C5 en Cantabria. Las curvas representan una regresión “Loess” de R con un suavizado “smooth”.

En la tabla 1, se expresan los porcentajes de cada estadio de desarrollo para las distintas fechas de muestreo, así como, los porcentajes de cámaras vacías. Éste porcentaje, se incrementó exponencialmente a partir de julio, cuando se empezaron a observar los primeros orificios de emergencia en las agallas.

Tabla 1. Porcentajes de cada estadio de desarrollo de *D. kuriphilus* y de cámaras vacías presentes en las agallas para cada fecha de muestreo.

Fechas del muestreo	Larva	Pupa I	Pupa II	Adulto	Cámaras vacías
31/05	96.0	4.0	0.0	0.0	6.1
14/06	44.7	53.2	2.1	0.0	4.4
03/07	0.0	18.2	32.7	49.1	25.9
13/07	0.0	0.0	13.3	86.7	42.0
25/07	0.0	0.0	0.0	100.0	65.5

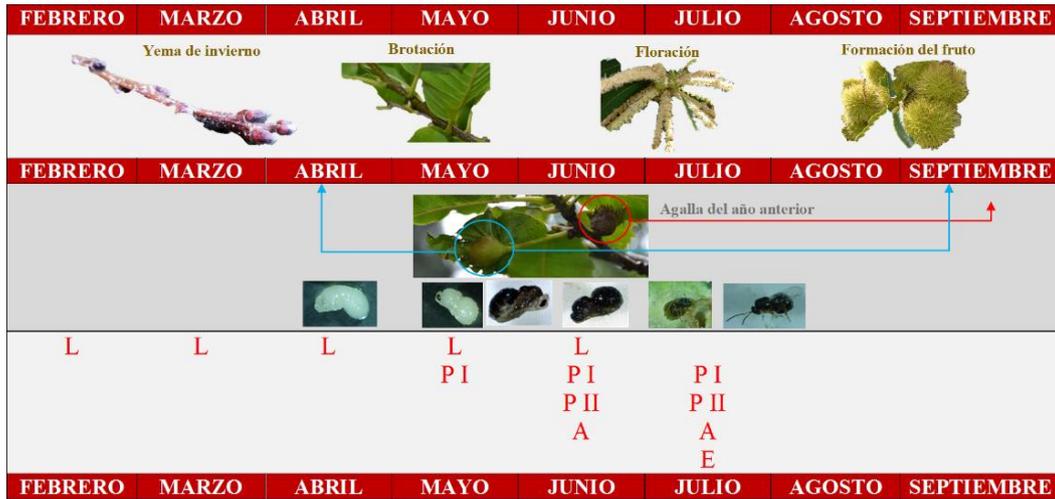


Figura 5. Ciclo de vida de la avispa del castaño (*D. kuriphilus*) y su relación con la fenología del castaño en Cantabria. L: Larvas; P I: Pupa I; P II: Pupa II; A: Adultos; E: Emergencia y oviposición. (Esquema adaptado de Bernardo *et al.* 2013)

El promedio de la tasa de parasitación a lo largo del periodo de muestreo difirió significativamente entre los dos árboles ($t = 6.3901$, $df = 7.5508$, $p < 0.001$). Estos valores, se tomaron con los datos de larvas, pupas y adultos de parasitoides, a pesar de que tanto las larvas como las pupas, no pudieron ser identificadas taxonómicamente. El valor medio de parasitación para el C4 fue de $39.2 \pm 2.1\%$, mientras que para el C5 fue de $16.4 \pm 2.8\%$ ($p < 0.001$) (Figura 6). Los porcentajes, a lo largo de los muestreos oscilaron en valores en torno a la media para el C4, mientras que en el C5, los porcentajes fueron disminuyendo hasta el último día de muestreo, momento en el que se observó un valor ligeramente más alto (Figura 6).

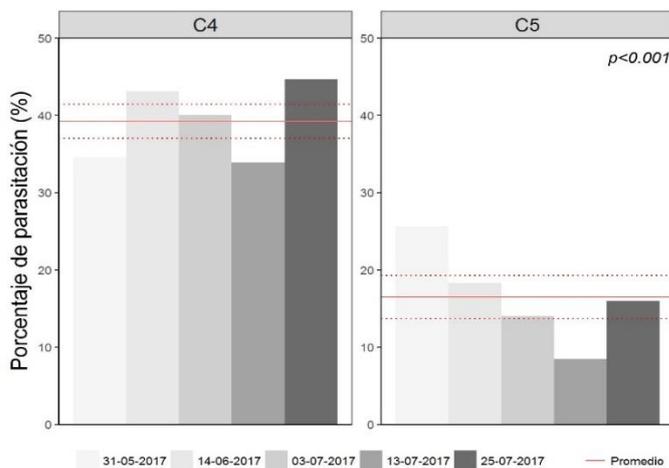


Figura 6. Porcentaje de las tasas de parasitación de C4 y C5 en cada una de las fechas de recolección. La línea continua de color rojo indica el valor medio de la tasa de parasitación de cada árbol y las líneas rojas discontinuas, los errores estándar de cada media. El p valor se refiere al contraste de hipótesis que comparó las medias de la tasa de parasitación de cada uno de los árboles muestra [$p < 0.001$] a un nivel de significación de $\alpha = 0.05$.



6.2. Identificación de parasitoides nativos

Un total de 26 parasitoides adultos fueron recogidos tanto de la disección de las agallas, como directamente de las cajas de emergencia. La identificación taxonómica reveló siete especies pertenecientes a cinco familias de calcidoideos (SpFam. Chalcidoidea): *Eurytomidae*, *Torymidae*, *Eupelmidae*, *Pteromalidae* y *Ormyridae*. Quince ejemplares se obtuvieron de la disección de las agallas (D), y el resto (11 individuos) emergieron de las cajas (E). Las siete especies fueron: *Mesopolobus tibialis* (Westwood, 1833), *Eupelmus urozonus* (Dalman, 1820), *Bootanomyia dorsalis* (Fabricius, 1798), *Ormyrus pomaceus* (Geoffroy, 1785), *Sycophila biguttata* (Swederus, 1795), *Sycophila variegata* (Curtis, 1831) y *Torymus auratus* (Müller, 1764) (Tabla 2).

Tabla 2. Número total de especies y sexo de los parasitoides nativos asociados a la avispa del castaño en Cantabria.

Especie	Familia	03/06	14/06	17/06	03/07	06/07	13/07	16/07	25/07	28/07
<i>Torymus auratus</i>	Torymidae		En C5: 3♂ D, 1♀D	En C5: 1♂E, 1♀E			En C5: 1♀D			
<i>Sycophila variegata</i>	Eurytomidae	En C4: 3♀E, 1♂E			En C4: 1♀D, 1♂D				En C4: 1♀D	
<i>Sycophila biguttata</i>	Eurytomidae				En C5: 1♀D		En C4: 1♀D En C5: 1♀D		En C5: 1♀D	
<i>Ormyrus pomaceus</i>	Ormyridae					En C5: 1♂E		En C5: 1♂E		
<i>Bootanomyia dorsalis</i>	Torymidae	En C4: 1♂E						En C4: 1♂E		
<i>Mesopolobus tibialis</i>	Pteromalidae		En C4: 1♂D							
<i>Eupelmus urozonus</i>	Eupelmidae								En C4: 1♀D	En C4: 1♂E



Se encontraron diferencias entre los dos árboles muestreados. Así, algunas especies como *Bootanomyia dorsalis* (Figura 9), *M. tibialis* o *E. urozonus*, solo se encontraron en el castaño 4. Por su parte, *T. auratus* y *O. pomaceus*, solo estuvieron presentes en el castaño 5 (Tabla 2).

Prácticamente todas las especies se recogieron entre los meses de junio y julio, salvo *O. pomaceus* y *E. urozonus*, que se recogieron a principios y a finales del mes de julio, respectivamente (Tabla 2).

Las especies más abundantes fueron *T. auratus*, *S. variegata* y *S. biguttata*, representando un 69.2% del total de los adultos identificados. En cuanto al sex-ratio, todos los ejemplares de *S. biguttata* recolectados fueron hembras. *T. auratus*, por su parte, presentó un sex-ratio de 4:3, mientras que el de *S. variegata*, fue de 1:3. Las demás especies estuvieron muy poco representadas, solamente con 1 o 2 especímenes (Tabla 2).

6.3. Hongos asociados a agallas necrosadas de *D. kuriphilus*

El estudio de la comunidad de parasitoides nativos ha permitido obtener además, tres aislados de *Fusarium proliferatum* (AG107), *Gnomoniopsis* sp. (H357) y *Colletotrichum acutatum* (C217) a partir de 13 agallas necrosadas con cadáveres de *D. kuriphilus* en su interior. Las pruebas de inoculación llevadas a cabo han permitido conocer su entomopatogenicidad (Tabla 3).



Figura 7. Prueba de patogenicidad. a) Aislado de *Colletotrichum acutatum*. b) Tubos de ensayo en cámara de cultivo con temperatura controlada a 24 °C y un fotoperiodo de 18 horas de luz diarias durante un periodo de 14 días. c) Crecimiento del micelio de *C. acutatum* en agalla. d) Insecto tapizado en el interior de una de las cámaras de la agalla anterior.



Gnomoniopsis sp. fue el tratamiento que obtuvo valores más elevados de AUDPC. Este tratamiento fue significativamente diferente del resto, exceptuando el tratamiento de *F. proliferatum* de concentración esporal de 10^3 esporas/ml. Éste último generó, junto con *Gnomoniopsis* spp., una necrosis más temprana sobre las agallas. Además, difirió significativamente de los tratamientos de *C. acutatum* (10^3 , $p < 0.01$; 10^6 , $p < 0.05$). Sin embargo, las diferencias con el control absoluto no fueron significativas ($p = 0.0549$). Además, no se encontraron diferencias significativas entre las dos concentraciones de *F. proliferatum* empleadas (10^6 y 10^3 ; $p = 0.0614$) (Tabla 3).

Tabla 3. Pr > |t| valores de las diferencias de medias de mínimos cuadrados

	Ca(10^3)	Ca(10^6)	Cab	Cagr	CH ₂ O	Fp(10^3)	Fp(10^6)	G
Ca(10^3)								
Ca(10^6)	0.5256							
Cab	0.7050	0.8875						
Cagr	0.8628	0.6720	0.8298					
CH ₂ O	0.0397*	0.0785	0.1653	0.0705				
Fp(10^3)	0.0085**	0.0130*	0.0549	0.0173	0.3797			
Fp(10^6)	0.1680	0.3724	0.4410	0.2554	0.3096	0.0614		
G	0.0004***	0.0002***	0.0073**	0.0012**	0.0291*	0.2298	0.0011**	

Niveles de significación: * Pr [0.05-0.01]; ** Pr [0.01-0.001]; *** Pr [< 0.001].

Código de colores: Verde (Crece más la AUDPC en el tratamiento fila frente al columna); Rojo (situación contraria al verde).

Ca(10^3): *C. acutatum*, concentración esporal 10^3 esporas/ml; Ca(10^6): *C. acutatum*, concentración esporal 10^6 esporas/ml; Cab: Control absoluto; Cagr: Control con agar; CH₂O: Control con agua destilada y esterilizada; Fp(10^3): *F. proliferatum*, concentración esporal 10^3 esporas/ml; Fp(10^6): *F. proliferatum*, concentración esporal 10^6 esporas/ml; G: *Gnomoniopsis* sp..

La práctica totalidad de las agallas (85.93%) estaban necrosadas a los 14 días de la inoculación. Las agallas que no llegaron a necrosarse en ese periodo pertenecían a los tratamientos de *C. acutatum* (dos agallas por cada tratamiento), *F. proliferatum* 10^3 (una agalla) y los controles de agua destilada-autoclavada y de agar (dos agallas de cada control). Asimismo, en la misma fecha, se procedió a la disección y evaluación de ocho de las diez agallas por tratamiento. Se evaluaron un total de 64 agallas con 125 cámaras ($\bar{X} = 1.95$ cámaras/agalla, $SE_{\bar{X}} = 0.14$, máximo = 5 cámaras/agalla). Un 28% de las cámaras se encontraron vacías y un 45.7% presentaron micelio. De ellas, sólo el 29.6% presentaron insectos muertos en su interior (32.5 % avispias y 67.65% parasitoides).



Para el análisis de la presencia de micelio en los insectos se decidió no incluir a *Gnomoniopsis* sp. debido a que éste hongo no mata a *D. kuriphilus* por colonización del micelio sino por producción de compuestos fitotóxicos y pudrición de la agalla. De ésta forma, la probabilidad modelada fue la presencia de micelio acompañando al insecto y, para poder enfrentar los tratamientos, se empleó el test de diferencias de medias de mínimos cuadrados (Tabla 4).

El hongo que tuvo un mejor comportamiento entomopatógeno fue *C. acutatum* (10^3) que consiguió matar al insecto en casi un 80% de los casos (Figuras 7 y 8). Además, se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control inoculado con agua destilada-autoclavada y con *F. proliferatum* (10^3) ($p = 0.0127$) (Tabla 4).



Figura 8. Insectos colonizados por micelio. a) Individuo de *D. kuriphilus* tapizado por micelio de *C. acutatum* (10^3). b) Adulto de parasitoides completamente colonizado por *F. proliferatum* (10^6). c) Adulto de parasitoides colonizado por *C. acutatum* (10^3).

Por su parte, *Fusarium proliferatum* (10^6), tuvo también un buen comportamiento a la hora de extender su micelio en el interior de las cámaras y conseguir la muerte del insecto, aunque no se encontraron diferencias con respecto al tratamiento control con agua destilada-autoclavada ($p = 0.0573$; Figura 8; Tabla 4).

Tabla 4. Pr > |z| valores de las diferencias de medias de mínimos cuadrados.

	Ca(10^3)	Ca(10^6)	Cab	CH ₂ O	Fp(10^3)	Fp(10^6)
Ca(10^3)						
Ca(10^6)	0.1051					
Cab	0.1051	1.0000				
CH ₂ O	0.0048**	0.1047	0.1047			
Fp(10^3)	0.0127*	0.4235	0.4235	0.2763		
Fp(10^6)	0.2583	0.6719	0.6719	0.0573	0.2288	

Niveles de significación: * Pr [0.05-0.01]; ** Pr [0.01-0.001]; *** Pr [<0.001].

Código de colores: Verde (Hay mayor probabilidad de contener micelio en la cámara acompañando al insecto en el tratamiento fila frente al columna); Rojo (situación viceversa al verde).

Ca(10^3): *C. acutatum*, concentración esporal 10^3 esporas/ml; Ca(10^6): *C. acutatum*, concentración esporal 10^6 esporas/ml; Cab: Control absoluto; CH₂O: Control con agua destilada y esterilizada; Fp(10^3): *F. proliferatum*, concentración esporal 10^3 esporas/ml; Fp(10^6): *F. proliferatum*, concentración esporal 10^6 esporas/ml.



Dos agallas de cada tratamiento fueron re-aisladas para comprobar los postulados de Koch. Todos los re-aislados excepto uno (*Gnomoniopsis* sp.), cumplieron con dichos postulados. Por su parte, los controles, presentaron valores de AUDPC y presencia de micelio en el interior de las cámaras acompañando al insecto equivalentes a algunos de los tratamientos de inoculación con los hongos entomopatógenos. El resultado de los re-aislados se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Morfotipos resultantes de los re-aislados de las dos agallas de cada control.

Tratamiento de control	Morfotipos
Control Agar 1	<i>Fusarium</i> spp.
Control Agar 2	<i>Fusarium</i> spp.
Control absoluto 1	<i>Gnomoniopsis</i> sp.
Control absoluto 2	<i>Fusarium</i> spp.
Control agua destilada y esterilizada 1	<i>Fusarium</i> spp.
Control agua destilada y esterilizada 2	<i>Indeterminado</i>

7. Discusión

7.1. Disección de agallas

Desde que en 2013 se detectara por primera vez *D. kuriphilus* en la comunidad autónoma de Cantabria, se han llevado a cabo estudios sobre la microbiota asociada a las agallas así como sobre el ciclo biológico de la avispa (Fernández *et al.*, 2018) pero no se han podido llevar a cabo estudios relacionados con la comunidad de parasitoides autóctonos asociados, ya que estos últimos, necesitan de un periodo mínimo de dos o tres años para adaptar su ciclo al de la avispa, y comenzar a funcionar como controladores biológicos (Aebi *et al.*, 2006; Matošević y Melika, 2013; Panzavolta *et al.*, 2013).

Este estudio ha permitido ampliar el conocimiento sobre el ciclo vital de la avispa en esta comunidad. Lo observado coincide con lo aportado por otros estudios en España e Italia (Bosio y Vettorazzo, 2005; Bernardo *et al.*, 2013; Pérez-Otero *et al.*, 2017; Fernández *et al.*, 2018) y con estudios previos llevados a cabo en la misma zona de estudio por Fernández *et al.* (2018) en 2014 (Figura 2; Tabla 1). Adicionalmente en Galicia, Pérez-Otero *et al.* (2017) informan de que el inicio de vuelo de los adultos se produce en los meses de junio, julio y agosto, coincidiendo así con nuestros resultados



dadas las similitudes bioclimáticas entre ambas regiones. A partir de estas fechas, se desarrolla el período de oviposición, que se extenderá seguramente hasta agosto, e incluso pudiéndose dar hasta septiembre en nuestra zona de estudio (Fernández *et al.*, 2018) y, dependiendo de las características climáticas del año.

7.2. Identificación de parasitoides nativos adultos

El estudio de la comunidad de parasitoides asociada a *D. kuriphilus* en Cantabria ha permitido identificar siete especies, todas ellas, ya mencionadas en estudios previos en Europa (Speranza *et al.*, 2009; Matošević y Melika, 2013; Panzavolta *et al.*, 2013; Quacchia *et al.*, 2013; Kos *et al.*, 2015; Colombari y Battisti, 2016), así como en España (Nieves-Aldrey y Gil-Tapetado, 2015; Pérez-Otero *et al.*, 2017). Todas estas especies son parasitoides nativas de robles.

Las especies más abundantes fueron *T. auratus*, *S. variegata* y *S. biguttata*. El primero (Figura 9), puede actuar como parasitoide e hiperparasitoide y presenta dos generaciones anuales: primavera y verano-otoño (Askew, 1965; Nieves-Aldrey, 1984), siendo el periodo de vuelo de la primera generación entre mediados de abril-mediados de julio (Askew, 1965). En nuestra zona de estudio se detectaron ejemplares adultos en junio-julio. El ciclo de esta especie sería similar al observado por Askew (1965) en Gran Bretaña y por Nieves-Aldrey (1984) en la zona centro-occidental de la Península Ibérica.

S. variegata y *S. biguttata* son parasitoides de cinípedos asociados a las quercíneas. *S. variegata* (Figura 9), se encuentra asociada predominantemente a *Q. ilex*, y en ocasiones, a otras especies del mismo género. *S. biguttata* por su parte, tiene un rango de quercíneas hospedantes más amplio. Parece presentar, al menos, dos generaciones anuales (Nieves-Aldrey, 1983a).

En cuanto a *M. tibialis*, sólo se recogió un espécimen adulto procedente de la disección de una agalla del C4 a mediados de junio. Resulta interesante el hecho de que solo se encontrase esta especie en el único castaño que tenía ejemplares de *Quercus robur* adyacentes ya que esta especie es conocida por parasitar a cinípedos como *Andricus curvator*, gallícola de *Q. robur* (Nieves-Aldrey, 1983b).

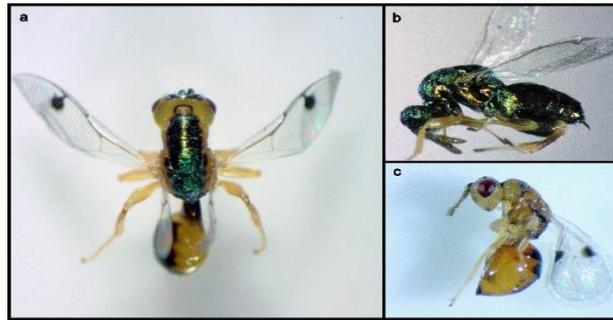


Figura 9. Imágenes de algunos parasitoides identificados. a) *Bootanomyia dorsalis*. b) *Torymus auratus*. c) *Sycophila variegata*.

Es importante señalar la presencia de especies hiperparasitoides como *T. auratus* y *E. urozonus*. Éste último es una especie polífaga que tiene un rango amplio de hospedantes, siendo los cinípedos, el grupo más numeroso (Gibson y Fusu, 2016). Según Nieves-Aldrey (1982), *E. urozonus* parasita a cinípedos gallícolas de robles y podría tener en España dos generaciones al año: primavera y verano, incluso podría darse una tercera generación en otoño. Esto puede indicar que los adultos encontrados pertenecen a la segunda generación. Cabe destacar que *E. urozonus* ha tenido un papel importante en la demora del éxito de parasitación de *T. sinensis* en Japón (Murakami y Gyoutoku, 1991, 1995). Estos autores hablan de que los estadios larvarios maduros de *T. sinensis* sufrieron una elevada mortalidad por la parasitación de especies de hiperparasitoides facultativos como *E. urozonus*, existiendo una correlación positiva y significativa entre el ratio de hiperparasitismo y la abundancia de *Torymus* spp. Algo similar ocurrió en EEUU con el parasitoide nativo *O. labotus*; en una de las áreas de estudio donde *O. labotus* estuvo ampliamente presente, *T. sinensis* no consiguió establecerse y, las hipótesis más plausibles de su ausencia fueron las de competencia y/o hiperparasitismo (Cooper y Rieske, 2007).

En resumen, el conocimiento de la comunidad de parasitoides asociada a *D. kuriphilus*, no sólo permite ver su posible eficacia en el control de la avispa, sino que además, puede ayudar a comprender el papel que juegan en el ecosistema. Detectar, por consiguiente, la presencia y abundancia de hiperparasitoides nativos también es fundamental para predecir la efectividad de introducciones de organismos de control biológico alóctonos, como *T. sinensis* (Murakami *et al.*, 1994; Panzavolta *et al.*, 2013) con los que se está actuando en la actualidad en distintas C.C.A.A. como Andalucía y Galicia desde el año 2016, y más recientemente en Castilla y León, donde se han comenzado las sueltas ésta primavera en el Bierzo (León). En Galicia, Pérez-Otero *et al.*



(2017), informaron de una elevada abundancia de *E. urozonus* y en Andalucía, han detectado la presencia de *T. auratus* (datos en prensa). En Castilla y León, aún no hay constancia de estudios de la comunidad de parasitoides autóctonos asociados a la avispa, a pesar de haberse llevado ya a cabo la autorización de la suelta del parasitoide *T. sinensis*. El desconocimiento de la diversidad y abundancia de hiperparasitoides en estas regiones podrían retrasar o anular la efectividad del uso de este torímido. Además, todavía no se ha estudiado en profundidad la especificidad o no de *T. sinensis* y el riesgo, que ello supondría, si el parasitoide cambia de hospedante, o se hibridase con otras especies del género *Torymus* (Gibbs *et al.*, 2011). En este sentido, la época de liberación de *T. sinensis* coincide con el periodo de desarrollo de agallas de algunos cinípidos autóctonos de España (*Biorhiza pallida*, *Neuroterus quercusbacarum*, *Andricus curvator*, etc.) que podrían ser objetivo potencial del parasitoide exótico, un impacto, que por ejemplo, podría estar produciéndose en Andalucía sobre las poblaciones de *Trigonaspis baetica*, especie endémica de Andalucía y que está incluida en la categoría de especie vulnerable en el Libro Rojo de los Invertebrados de Andalucía (2007) (Nieves-Aldrey y Gil Tapetado, 2015). Por lo que, ante los potenciales riesgos de *T. sinensis* sobre la entomofauna autóctona, es imprudente liberarlo en aquellas zonas en las que se desconocen sus posibles efectos (Gibbs *et al.*, 2011). Siguiendo en ésta línea, es conveniente confiar en que en un periodo más o menos corto, se pueda establecer una comunidad estable de parasitoides autóctonos que puedan mantener de forma natural los daños dentro de unos rangos asumibles (Nieves-Aldrey y Gil Tapetado, 2015).

Adicionalmente, para que se produzca una asociación estrecha entre *D. kuriphilus* y la comunidad de parasitoides nativos, dos factores son determinantes: el hábitat de la planta huésped y el volumen de la agalla. La diferencia en las tasas de parasitación en agallas infestadas por *D. kuriphilus* en función de la diversidad del hábitat ha sido ya estudiada (Bonsignore y Bernardo, 2018). Según estos autores, los hábitats con una mayor biodiversidad pueden albergar más cantidad de hospedadores alternativos de parasitoides autóctonos y proporcionar una variedad de micro-hábitats mejores en cuanto a las tasas de parasitación y oviposición. Por otro lado, dichos autores encuentran diferencias de parasitación entre poblaciones silvestres de castaño (más naturales y frecuentemente entremezcladas con otras especies) y plantaciones de fruto (completamente intervenidas), siendo más alta la tasa en las silvestres. Esta situación es semejante a la de partida en este estudio, así el castaño 4 se encontraba entremezclado con otras especies del género *Quercus*, principalmente *Quercus robur*,



en un hábitat en el que además, se podían encontrar diversas especies arbóreas, arbustivas y herbáceas. Por el contrario, el castaño 5, estaba rodeado por una plantación de *Pinus radiata* sin apenas diversidad de especies en sus alrededores. Desde otra perspectiva, la tasa de parasitación está correlacionada negativamente con el volumen de la agalla (Cooper y Rieske, 2011; Bernardo *et al.*, 2013) a pesar de que en este estudio no se ha podido obtener una medida directa del volumen de la agalla, sí se ha podido obtener el número medio de cámaras por agalla que ha sido de 2.2 ± 0.1 para el C4 y de 2.5 ± 0.1 para el C5. Según Bernardo *et al.* (2013), este valor medio de cámaras está correlacionado positivamente con el volumen. A pesar de esta correlación, no se han encontrado diferencias significativas entre los dos árboles en este sentido ($p = 0.4592$). Así, la tasa de parasitación podría estar influida en mayor medida por el hábitat del árbol hospedante en nuestro estudio, aunque ésta afirmación hay que tomarla con prudencia. El posible beneficio que podrían aportar las quercíneas como fuente de parasitoides autóctonos para el control de la avispa se ha observado ya en estudios previos en otras regiones de Europa (Panzavolta *et al.*, 2013) y de EEUU (Cooper y Rieske, 2007). Dado que todas las especies identificadas en nuestro estudio son parasitoides habituales de galícolas de robles, y algunas de ellas, se han registrado indistintamente sobre los dos árboles, el árbol rodeado de quercíneas (C4) albergó una mayor riqueza de parasitoides, que se tradujo en una mayor tasa de parasitación.

7.3. Hongos asociados a agallas necrosadas de *D. kuriphilus*

Tanto el control biológico clásico, mediante el uso del parasitoide introducido *T. sinensis*, como el control biológico por conservación, con los parasitoides autóctonos, requieren un periodo de establecimiento largo (entre cuatro y cinco años en el caso de *T. sinensis* según Moriya *et al.* 1989) y adaptación hasta que logran controlar la plaga y mantener el nivel de infestación por debajo de unos límites tolerables. Este periodo puede ser demasiado largo para las zonas rurales, cuyo principal sustento económico es la castañicultura; y para los mercados, que continúan demandando el fruto y que tendrán que buscarlo en otros países. Por ello, se hace necesario buscar nuevos agentes de control biológico para poder realizar un manejo integrado de la plaga. En este sentido, en el presente estudio, se ha testado el carácter entomopatógeno de diversos hongos presentes de forma natural en la zona asociados a las agallas necróticas de la avispa del castaño.

Así, con este trabajo se ha podido demostrar el carácter entomopatógeno de *C. acutatum*, no sólo para la avispa sino también para sus parasitoides (figura 4). Éste



hongo, de los tres testados, es el que promete una mayor eficacia, y ha sido ya propuesto por otros autores como un candidato a tener en cuenta para el control biológico (Graziosi y Rieske, 2015). Estos autores, en inoculaciones en campo y laboratorio, demostraron que el micelio de *C. acutatum* penetraba en el interior de las cámaras, envolviendo a los ejemplares de avispa ocasionándoles la muerte y además, hacen hincapié en que solo los ejemplares de *D. kuriphilus* se verían afectados por el micelio del hongo, sin ningún perjuicio sobre la planta.

F. proliferatum ya se ha aislado previamente de diferentes insectos (O'Donnell *et al.*, 2012; Devi Thangam *et al.*, 2014) y también junto a *D. kuriphilus*, donde causó un porcentaje de mortalidad de larvas de avispa de entre el 33% y el 97% en función del método de inoculación, no mostrándose patogénico para el castaño (Tosi *et al.*, 2015). Nuestros resultados van en consonancia con el comportamiento del aislado en ese estudio, pero al igual que ocurre con *C. acutatum*, *F. proliferatum* también mata los parasitoides.

Gnomoniopsis sp. también ha sido aislado de las agallas, al igual que en Italia (Magro *et al.*, 2010). El potencial del hongo a la hora de provocar una necrosis temprana de las agallas de *D. kuriphilus* ha sido demostrado en este estudio, obteniéndose diferencias significativas con casi todos los tratamientos. Los resultados indicarían un comportamiento endofítico del hongo infectando las agallas a partir de inóculo presente de forma natural en los castaños y causando altas tasas de mortalidad en ejemplares adultos de *D. kuriphilus* por la necrosis completa de las agallas, resultados acordes a lo encontrado por Vannini *et al.* (2014, 2017). Sin embargo, la alta virulencia del hongo a la hora de pudrir los frutos del castaño imposibilitaría su uso como agente de control biológico (Vannini *et al.*, 2017).

La necrosis de las agallas observada en los controles de este estudio se debe a la presencia de los hongos endófitos a pesar, de la meticulosa esterilización que se llevó a cabo previamente. En general, la mayoría de los endófitos están en el interior de la planta huésped y reanudan su crecimiento cuando se inicia la senescencia natural del tejido vegetal (Sieber, 2007). En esta línea, Vannini *et al.* (2017), obtuvieron una alta frecuencia de aislados de *Gnomoniopsis castanea* a partir de agallas completamente asintomáticas y esterilizadas y, sugerían que la colonización patogénica del hongo vendría dada por inóculo endofítico. Esto explicaría la necrosis sufrida en uno de los controles absolutos cuyo re-aislado, tras la finalización de la prueba de patogenicidad, dio lugar a un morfotipo tipo *Gnomoniopsis* spp. (Tabla 5). Otros muchos hongos



conocidos tradicionalmente por ser entomopatógenos como por ejemplo, *Beauveria bassiana*, han sido aislados como endófitos naturales a partir de tejidos vegetales asintomáticos (Bamisile *et al.*, 2018). De acuerdo con esto, el re-aislado de las agallas control con agua destilada y esterilizada y del control con agar dieron lugar a morfotipos tipo *Fusarium* spp. (Tabla 5) conocidos por su potencial entomopatógeno, como por ejemplo *F. proliferatum* (Tosi *et al.*, 2015) que también ha sido testado en este estudio.

De los tres hongos testados, *C. acutatum* y *F. proliferatum*, podrían tener un elevado potencial como agente de control biológico de *D. kuriphilus*. Ambas concentraciones esporales (10^3 y 10^6 esporas/ml) han logrado penetrar en el interior de la cámaras y matar al insecto por invasión del micelio. Sin embargo, harían falta más estudios para testar el impacto que una aplicación de los mismos podría tener sobre la comunidad de parasitoides nativos así como sobre la planta hospedante. Así mismo, la necrosis detectada en las agallas control, nos indicaría que para futuros ensayos con hongos entomopatógenos de *D. kuriphilus* sería conveniente el empleo de plántulas vivas.

Las altas tasas de parasitación encontradas, el apreciable número de especies de parasitoides nativos identificados, junto con el potencial entomopatógenos de los tres hongos testados abre una nueva vía a las alternativas del control biológico clásico, como por ejemplo, la introducción de parasitoides alóctonos como *T. sinensis*.

8. Conclusiones

1. Se han identificado un total de siete especies autóctonas de parasitoides asociadas a *D. kuriphilus* en Cantabria, siendo las más abundantes, *Sycophila variegata* y *Torymus auratus*.
2. El promedio de la tasa de parasitación difirió significativamente entre los dos árboles muestreados, siendo mayor en el C4, debido probablemente a una mayor diversidad existente en el bosque de quercíneas que serían un reservorio de parasitoides que favorecería un mayor control de la avispa.
3. *C. acutatum* y *F. proliferatum*, han demostrado tener potencial entomopatógeno frente a *D. kuriphilus* y podrían ser usados como controladores naturales alternativos.



9. Agradecimientos

Agradecer el apoyo recibido por parte de los directores de este trabajo, Mercedes y Julio, así como, al personal investigador (Jordán) y a los técnicos de laboratorio (Juan Carlos y María). Igualmente, agradecer a Milagros Vallejo (Gobierno de Cantabria) por la ayuda en la recolección de las agallas empleadas en este estudio, y al Dr. Juli Pujade i Villar por la identificación de los adultos de parasitoides que le fueron enviados.

10. Bibliografía

- Addario, E, Turchetti, T, 2011. Parasitic fungi on *Dryocosmus kuriphilus* in *Castanea sativa* necrotic galls. Bull. Insectology 64: 269-273.
- Aebi, A, Schönrogge, K, Melika, G, Alma, A, Bosio, G, Quacchia, A, Picciau, L, Abe, Y, Moriya, S, Yara, K, Stone, G, 2006. Parasitoid recruitment to the globally invasive chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*. Gall. Arthropods Their Assoc. 103-121. https://doi.org/10.1007/4-431-32185-3_9
- Anagnostakis, S, Clark, S, McNab, H, 2009. Preliminary report on the segregation of resistance in chestnuts to infestation by oriental chestnut gall wasp. Acta Hort. 815: 33-36. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.815.3>
- Askew, R R, 1965. The biology of the British species of the genus *Torymus* Dalman (Hymenoptera: Torymidae) associated with galls of Cynipidae (Hymenoptera) on oak, with special reference to alternation of forms. Trans. Soc. Br. Entomol. 16: 217-232.
- Bamisile, B S, Dash, C K, Akutse, K S, Keppanan, R, Wang, L, 2018. Fungal endophytes: Beyond herbivore management. Front. Microbiol. 9: 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00544>
- Battisti, A, Benvegnù, I, Colombari, F, Haack, R A, 2014. Invasion by the chestnut gall wasp in Italy causes significant yield loss in *Castanea sativa* nut production. Agric. For. Entomol. 16: 75-79. <https://doi.org/10.1111/afe.12036>
- Bernardo, U, Iodice, L, Sasso, R, Tutore, V A, Cascone, P, Guerrieri, E, 2013. Biology and monitoring of *Dryocosmus kuriphilus* on *Castanea sativa* in Southern Italy. Agric. For. Entomol. 15: 65-76. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2012.00588.x>
- BOCn161, 2013. Orden GAN/51/2013, de 12 de agosto, por la que se establecen las zonas delimitadas por la plaga *Dryocosmus Kuriphilus*.
- BOJA, 2015. Resolución de 6 de mayo de 2015, de la Delegación Territorial de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente en Málaga, por la que se autorizan los trabajos de corta y poda de castaños afectados por la plaga avispa del castaño (*Dryocosmus Kiriphilus*) y el uso . Boletín Of. la Junta Andalucía. Cons. Agric. pesca y Desarro. Rural. Junta Andalucía 88: 334.
- Bonsignore, C P, Bernardo, U, 2018. Effects of environmental parameters on the chestnut gall wasp and its complex of indigenous parasitoids. Sci. Nat. 105: 20. <https://doi.org/10.1007/s00114-018-1545-1>
- Bosio, G, Vettorazzo, M, 2005. *Dryocosmus kuriphilus*. EPPO Bull. 35: 422-424.
- Brussino, G, Bosio, G, Baudino, M, Giordano, R, Ramello, F, Melika, G, 2002. Pericoloso insetto esotico per il castagno europeo. L'Informatore Agrar. 37: 59-61.
- Cho, D Y, Lee, S O, 1963. Ecological studies on the chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus* and observations on the chestnut trees by its insect. Korean J. Appl. Entomol.
- Colombari, F, Battisti, A, 2016. Native and introduced parasitoids in the biocontrol of *Dryocosmus kuriphilus* in Veneto (Italy). EPPO Bull. 46: 275-285. <https://doi.org/10.1111/epp.12297>
- Cooper, W R, Rieske, L K, 2011. A native and an introduced parasitoid utilize an exotic gall-maker host. BioControl 56: 725-734. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9350-1>
- Cooper, W.R., Rieske, L.K., 2007. Community associates of an exotic gallmaker, *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae), in Eastern North America. Ann. Entomol. Soc. Am. 100, 236-244. [26](https://doi.org/10.1603/0013-</p></div><div data-bbox=)



- 8746(2007)100[236:CAOAE]2.0.CO;2
- Cuenca, B, Lario, F J, Luquero, L, Ocaña, L, 2017. El desarrollo de la sanidad forestal en el vivero de TRAGSA. Cuad. la Soc. Española Ciencias For. 43: 139-150.
- Devi Thangam, S, Selvakumar, G, Verghese, A, Kamala Jayanthi, P D, 2014. Natural mycosis of mango leafhoppers (*Cicadellidae: Hemiptera*) by *Fusarium* sp. *Biocontrol Sci. Technol.* 24: 229-232.
- Dini, F, Sartor, C, Botta, R, 2012. Detection of a hypersensitive reaction in the chestnut hybrid «Bouche de Bétizac» infested by *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu. *Plant Physiol. Biochem.* 60: 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.023>
- Dixon, W N, Burns, R E, Stange, L A, 1986. Oriental chestnut gall wasp. *Dryocosmus Kuriphilus*. *Entomol. Circ.* 287: 1-2.
- Fernández, M M, Bezos, D, Diez, J J, 2018. Fungi associated with necrotic galls of *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae) in northern Spain. *Silva Fenn.* 52: 1-12.
- Ferracini, C, Ferrari, E, Saladini, M A, Pontini, M, Corradetti, M, Alma, A, 2015. Non-target host risk assessment for the parasitoid *Torymus sinensis*. *BioControl* 60: 583-594. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9676-1>
- Gaffuri, F, Maresi, G, Pedrazzoli, F, Longa, C M O, Boriani, M, Molinari, M, Tantardini, A, 2015. *Colletotrichum acutatum* associated with *Dryocosmus kuriphilus* galls on *Castanea sativa*. *For. Pathol.* 45: 169-171. <https://doi.org/10.1111/efp.12178>
- Gehring, E, Bellosi, B, Quacchia, A, Conedera, M, 2018. Assessing the impact of *Dryocosmus kuriphilus* on the chestnut tree: branch architecture matters. *J. Pest Sci.* 91: 189-202. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0857-9>
- Germinara, G S, De Cristofaro, A, Rotundo, G, 2011. Chemical cues for host location by the chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus*. *J. Chem. Ecol.* 37: 49-56. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9893-0>
- Gibbs, M, Schönrogge, K, Alma, A, Melika, G, Quacchia, A, Stone, G N, Aebi, A, 2011. *Torymus sinensis*: a viable management option for the biological control of *Dryocosmus kuriphilus* in Europe? *BioControl* 56: 527-538. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9364-8>
- Gibson, G A P, Fusu, L, 2016. Revision of the palaearctic species of *Eupelmus* (*Eupelmus*) Dalman (Hymenoptera: Chalcidoidea: Eupelmidae). *Zootaxa* 4081: 331. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4081.1.1>
- Gobierno del Principado de Asturias, 2014. Ficha Técnica 27/2014, Avispa del castaño. Oviedo.
- Graziosi, I, Rieske, L K, 2015. A plant pathogen causes extensive mortality in an invasive insect herbivore. *Agric. For. Entomol.* 17: 366-374. <https://doi.org/10.1111/afe.12116>
- Griffo, R, Parillo, R, Verderame, M, 2010. Castagno, primi risultati della lotta chimica contro il cinipide galligeno. *Terra e Vita* 3: 24-25.
- Gyoutoku, Y, Uemura, M, 1985. Ecology and biological control of the chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hym. Cynipidae). *Proc. Assoc. Plant Prot. Kyushu* 31: 213-215.
- Hokkanen, H M T, 2001. Biological Control. *Encycl. Life Sci.* 1-7.
- JCyL, 2017. *Dryocosmus kuriphilus*. Cent. Sanid. For. Calabazanos. Junta Castilla y León 1-2.
- JCyL, 2007. Hoja-técnica-6-Avispa del castaño. *Dryocosmus kuriphilus*. Cent. Sanid. For. Calabazanos. Junta Castilla y León. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2005.00849.x>
- Kato, K, Hiji, N, 1997. Effects of gall formation by *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hym., Cynipidae) on the growth of chestnut trees. *J. Appl. Entomol.* 121: 9-15. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1997.tb01363.x>
- Kos, K, Kriston, E, Melika, G, 2015. Invasive chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae), its native parasitoid community and association with oak gall wasps in Slovenia. *Eur. J. Entomol.* 112: 698-704. <https://doi.org/10.14411/eje.2015.091>
- Magro, P, Speranza, S, Stacchiotti, M, Martignoni, D, Paparatti, B, 2010. *Gnomoniopsis* associated with necrosis of leaves and chestnut galls induced by *Dryocosmus kuriphilus*. *Plant Pathol.* 59: 1171. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02336.x>
- Maltoni, A, Mariotti, B, Jacobs, D F, Tani, A, 2012. Pruning methods to restore *Castanea sativa* stands attacked by *Dryocosmus kuriphilus*. *New For.* 43: 869-885. <https://doi.org/10.1007/s11056-012-9323-y>
- Matošević, D, Melika, G, 2013. Recruitment of native parasitoids to a new invasive host: First results of *Dryocosmus kuriphilus* parasitoid assemblage in Croatia. *Bull. Insectology* 66: 231-238.
- Meyer, J B, Gallien, L, Prospero, S, 2015. Interaction between two invasive organisms on the European chestnut: Does



- the chestnut blight fungus benefit from the presence of the gall wasp? FEMS Microbiol. Ecol. 91: 1-10. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv122>
- Moriya, S, Inoue, K, Ôtake, A, Shiga, M, Mabuchi, M, 1989. Decline of the chestnut gall wasp population, *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae) after the establishment of *Torymus sinensis* Kamijo (Hymenoptera: Torymidae). Appl. Entomol. Zool. 24: 231-233. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.3229>
- Moriya, S, Shiga, M, Adachi, I, 2003. Classical biological control of the chestnut gall wasp in Japan. 1st Int. Symp. Biol. Control Arthropods 407-415.
- Murakami, Y., Gyoutoku, Y., 1995. A delayed increase in the population of an imported parasitoid *Torymus* (*Syntomaspis*) *sinensis* (Hymenoptera: Torymidae) in Kumamoto, Southwestern Japan. Appl. Entomol. Zool. 30, 215-224. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.3229>
- Murakami, Y, Gyoutoku, Y, 1991. Colonization of the imported *Torymus* (*Syntomaspis*) *sinensis* Kamijo (Hymenoptera: Torymidae) parasitic on the chestnut gall wasp (Hymenoptera: Cynipidae). (5) Mortality of *Torymus* spp. by native facultative hyperparasitoids. Kyushu Plant Prot. Res. 37: 194-197.
- Murakami, Y, Hiramatsu, T, Maeda, M, 1994. Parasitoids complexes of the chestnut gall wasp (Hymenoptera: Cynipidae) in two localities before introduction of *Torymus* (*Syntomaspis*) *sinensis* (Hymenoptera: Torymidae), with special reference to prediction of results after release of the parasitoid. Japanese J. Appl. Entomol. Zool. 38: 29-41.
- Navarra, 2014. Mantenimiento y toma de datos de la red europea de seguimiento a gran escala de los bosques en España (red de nivel 1). Comunidad Foral de Navarra. 41.
- Nieves-Aldrey, J L, 1984. Observaciones sobre los torímidos (Hym., Chalcidoidea, Torymidae) asociados con agallas de cinípidos (Hym. Cynipidae) sobre *Quercus* spp. en la zona centro-occidental de España. Boletín la Asoc. Española Entomol. 8: 121-134.
- Nieves-Aldrey, J L, 1983a. Sobre las especies de *Sycophila* Walker (Hym., Eurytomidae) asociadas con agallas de cinípidos en la Península Ibérica con descripción de una nueva especie. Eos, Rev. Española Entomol. 59: 179-192.
- Nieves-Aldrey, J L, 1983b. Sobre las especies del género *Mesopolobus* (Hymenoptera, Pteromalidae) asociadas con agallas de cinípidos en *Quercus* spp. en Salamanca. Bol. la Asoc. Española Entomol. 7: 9-18.
- Nieves-Aldrey, J L, 1982. Eupélmidos (Hym. Eupelmidae) que parasitan a los pobladores de las agallas de cinípidos producidas en especies del género *Quercus* en la provincia de Salamanca. Bol. la Asoc. Española Entomol. 5: 143-150.
- Nieves-Aldrey, J L, Gil Tapetado, D, 2015. Evaluación de posible impacto ambiental del uso de *Torymus sinensis* como controlador biológico de la plaga de la avispa del castaño, *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu en España., en: BioCastanea. El bierzo. p. 37. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4131.9766>
- Nugnes, F, Gualtieri, L, Bonsignore, C P, Parillo, R, Annarumma, R, Griffò, R, Bernardo, U, 2018. Resistance of a local ecotype of *Castanea sativa* to *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae) in Southern Italy. Forests 9: 1-12. <https://doi.org/10.3390/f9020094>
- O'Donnell, K, Humber, R A, Geiser, D M, Kang, S, Park, B, Robert, V A R G, Crous, P W, Johnston, P R, Aoki, T, Rooney, A P, Rehner, S A, 2012. Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and Fusarium MLST. Mycologia 104: 427-445. <https://doi.org/10.3852/11-179>
- Oho, N, Umeya, K, 1975. Chestnut gall wasp is found in the People's Republic of China. Shokubutsu Boeki (Plant Prot.) 29: 463-464.
- Panzavolta, T, Bernardo, U, Bracalini, M, Cascone, P, Croci, F, Gebiola, M, Iodice, L, Tiberi, R, Guerrieri, E, 2013. Native parasitoids associated with *Dryocosmus kuriphilus* in Tuscany, Italy. Bull. Insectology 66: 195-201.
- Panzavolta, T, Bracalini, M, Croci, F, Campani, C, Bartoletti, T, Miniati, G, Benedettelli, S, Tiberi, R, 2012. Asian chestnut gall wasp in Tuscany: Gall characteristics, egg distribution and chestnut cultivar susceptibility. Agric. For. Entomol. 14: 139-145. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2011.00551.x>
- Panzavolta, T, Croci, F, Bracalini, M, Melika, G, Benedettelli, S, Tellini Florenzano, G, Tiberi, R, 2018. Population dynamics of native parasitoids associated with the asian chestnut gall wasp (*Dryocosmus kuriphilus*) in Italy. Psyche (Stuttg).13. <https://doi.org/10.1155/2018/8078049>



- Payne, J A, Menke, A S, Schroeder, P M, 1975. *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu, (Hymenoptera: Cynipidae), an oriental chestnut gall wasp in North America. United States Dep. Agric. Coop. Econ. Insect Rep. 25: 903-905.
- Pérez-Otero, R, Crespo, D, Mansilla, J P, 2017. *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu, 1951 (Hymenoptera: Cynipidae) in Galicia (NW Spain): pest dispersion, associated parasitoids and first biological control attempts. Arq. Entomolóxicos 17: 439-448.
- Pérez-Otero, R, Mansilla, J P, 2014. El cinípido del castaño *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu, 1951 llega a Galicia (NO de la Península Ibérica). Arq. Entomolóxicos 12: 33-36.
- Pujade-Villar, J, Torrell, A, Rojo, M, 2013. Primeres troballes a la península Ibèrica de *Dryocosmus kuriphilus* (Hym ., Cynipidae), una espècie de cinípid d ' origen asiàtic altament perillosa per al castanyer (*Fagaceae*). Orsis Org. i Sist. 27: 295-301.
- Quacchia, A, Ferracini, C, Nicholls, J A, Piazza, E, Saladini, M A, Tota, F, Melika, G, Alma, A, 2013. Chalcid parasitoid community associated with the invading pest *Dryocosmus kuriphilus* in north-western Italy. Insect Conserv. Divers. 6: 114-123. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4598.2012.00192.x>
- Quacchia, A, Moriya, S, Bosio, G, 2014. Effectiveness of *Torymus sinensis* in the biological control of *Dryocosmus kuriphilus* in Italy. Acta Hortic. 1043: 199-204.
- Santi, F, Maini, S, 2011. New association between *Dryocosmus kuriphilus* and *Torymus flavipes* in chestnut trees in the Bologna area (Italy): First results. Bull. Insectology 64: 275-278.
- Santos, A, Pereira, J, Santos, S, Quacchia, A, Bento, A, 2017. Biological control based on native parasitoids associated with *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu in invaded countries. Nat. Enemies Identification, Prot. Strateg. Ecol. Impacts. 177-203.
- Sartor, C, Botta, R, Mellano, M G, Beccaro, G L, Bounous, G, Torello Marinoni, D, Quacchia, A, Alma, A, 2009. Evaluation of susceptibility to *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae) in *Castanea sativa* miller and in hybrid cultivars. Acta Hortic. 815: 289-298. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.815.38>
- Sartor, C, Dini, F, Torello Marinoni, D, Mellano, M G, Beccaro, G L, Alma, A, Quacchia, A, Botta, R, 2015. Impact of the asian wasp *Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu) on cultivated chestnut: yield loss and cultivar susceptibility. Sci. Hortic. (Amsterdam). 197: 454-460. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.004>
- Shah, P A, Pell, J K, 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61: 413-423. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1240-8>
- Sieber, T N, 2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? Fungal Biol. Rev. 21: 75-89. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.004>
- Speranza, S, Stacchiotti, M, Paparatti, B, 2009. Endemic parasitoids of *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae) in Central Italy. Acta Hortic. 844: 421-424. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.844.58>
- Toda, S, Miyazaki, M, Osakabe, M, Komazaki, S, 2000. Occurrence and hybridization of two parasitoid wasps, *Torymus sinensis* Kamijo and *T. beneficus* Yasumatsu et Kamijo (Hymenoptera: Torymidae) in the Oki islands. Appl. Entomol. Zool. <https://doi.org/10.1303/aez.2000.151>
- Tosi, L, Beccari, G, Rondoni, G, Covarelli, L, Ricci, C, 2015. Natural occurrence of *Fusarium proliferatum* on chestnut in Italy and its potential entomopathogenicity against the Asian chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*. J. Pest Sci. (2004). 88: 369-381. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0624-0>
- Turchetti, T, Addario, E, Maresi, G, 2010. Interazioni tra cinipide galligeno e cancro della corteccia: una nuova criticità per il castagno. Forest@ 7: 252-258. <https://doi.org/10.3832/efor0642-007>
- Ugolini, F, Massetti, L, Pedrazzoli, F, Tognetti, R, Vecchione, A, Zulini, L, Maresi, G, 2014. Ecophysiological responses and vulnerability to other pathologies in European chestnut coppices, heavily infested by the Asian chestnut gall wasp. For. Ecol. Manage. 314: 38-49. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.11.031>
- van Lenteren, J C, Bale, J, Bigler, F, Hokkanen, H M T, Loomans, A J M, 2006. Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropod pests. Annu. Rev. Entomol. 51: 609-634. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151129>
- Vannini, A, Martignoni, D, Bruni, N, Tomassini, A, Aleandri, M P, Vettraino, A M, Caccia, R, Speranza, S, Paparatti, B, 2014. New notes on the biology of the chestnut fungus *Gnomoniopsis* sp. and its possible use as a biocontrol agent of oriental chestnut gall wasp. Acta Hortic. 1019: 235-238. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1019.35>



- Vannini, A, Vettraino, A M, Martignoni, D, Morales-Rodriguez, C, Contarini, M, Caccia, R, Paparatti, B, Speranza, S, 2017. Does *Gnomoniopsis castanea* contribute to the natural biological control of chestnut gall wasp? *Fungal Biol.* 121: 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.08.013>
- Vega, F E, Meyling, N V, Luangsa-Ard, J J, Blackwell, M, 2012. Fungal entomopathogens, en: Vega, F E, Kaya, H K (Eds.), *Insect Pathology*. Elsevier Inc.: pp. 171-220. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00006-3>
- Viggiani, G, Nugnes, F, 2010. Description of the larval stages of *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae), with notes on their phenology. *J. Entomol. Acarol. Res.* 42: 39-45.
- Yara, K, 2014. Interaction between *Torymus sinensis* (Hymenoptera: Torymidae) and *T. Beneficus*, introduced and indigenous parasitoids of the chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae). *Japan Agric. Res. Q.* 48: 35-40. <https://doi.org/10.6090/jarq.48.35>
- Yara, K, Yano, E, Sasawaki, T, Shiga, M, 2000. Detection of hybrids between introduced *Torymus sinensis* and native *T. beneficus* (Hymenoptera: Torymidae) in central Japan, using malic enzyme. *Appl. Entomol. Zool.* <https://doi.org/10.1303/aez.2000.201>