



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Máster en Ingeniería de Montes

**Control biológico del vector del nematodo de la
madera del pino *Monochamus galloprovincialis*
Olivier mediante autoinfección con el hongo
entomopatógeno *Beauveria pseudobassiana* S.A.
Rehner & Humber.**

Alumno/a: Alberto Sacristán Velasco

Tutor/a: Juan A. Pajares Alonso

Junio de 2017

Índice

RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 El Nematodo de la Madera del Pino	2
Taxonomía, morfología y biología	2
Patogenicidad	4
Distribución y daños	4
Control del Nematodo y de la Enfermedad del Marchitamiento del Pino	7
1.2 Los vectores del Nematodo de la Madera del Pino	7
Biología de <i>Monochamus galloprovincialis</i>	9
Control de los vectores del Nematodo de la Madera del Pino	10
2 OBJETIVOS	12
3 MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
3.1 Sitios experimentales	13
3.2 Dispositivo de autoliberación y autoinfección	13
3.3 Experimentos	14
Experimento 1. Efectividad del dispositivo de autoliberación y reducción del impacto sobre especies no objetivo.	14
Experimento 2. Aumento de la selectividad de la trampa frente a especies no objetivo.	16
Experimento 3. Auto-infección en campo con polvo fluorescente	17
Experimento 4. Infección de <i>Monochamus galloprovincialis</i> con <i>Beauveria pseudobassiana</i> en laboratorio a través de los dispositivos de autoinfección	19
3.4 Análisis estadístico	21
4 RESULTADOS.....	22
Experimento 1. Efectividad del dispositivo de autoliberación y reducción del impacto sobre especies no objetivo.	22
Experimento 2. Aumento de la selectividad de la trampa frente a especies no objetivo.	24
Experimento 3. Auto-infección en campo con polvo entomológico	27
Experimento 4. Infección de <i>Monochamus galloprovincialis</i> con <i>Beauveria pseudobassiana</i> en laboratorio a través de los dispositivos de autoinfección	28
5 DISCUSIÓN	31
6 CONCLUSIONES	33

Control biológico del vector del nematodo de la madera del pino *Monochamus galloprovincialis* Olivier mediante autoinfección con el hongo entomopatógeno *Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber.

Agradecimientos	35
Referencias bibliográficas	36

Control biológico del vector del nematodo de la madera del pino *Monochamus galloprovincialis* Olivier mediante autoinfección con el hongo entomopatógeno *Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber.

RESUMEN

Bursaphelenchus xylophilus, cuyo vector es *Monochamus galloprovincialis*, provoca la enfermedad del marchitamiento del pino. Las estrategias de control se centran en el manejo del vector.

Se desarrolla un método de autodiseminación de *Beuaveria pseudobassiana*, hongo entomopatógeno con elevada mortalidad, que permita la infección sobre el vector, consistente en un sistema de autoliberación, adaptado para autoinfección, de los insectos vectores capturados en el bote colector de las trampas multiembudos. Se intenta reducir las capturas de especies de xilófagos no objetivo mediante modificaciones en el sistema. Se determina la dosis del hongo entomopatógeno que autoinfecte y pueda transmitir inóculo, mediante distintos dispositivos.

El sistema de autoliberación-infección, tubo enroscado externamente al bote colector de las trampas y el de escape de insectos no objetivo, mediante mallas de 6,0 mm de luz han resultado exitosos. Se han determinado las características del dispositivo de infección y la concentración del hongo entomopatógeno que pueden resultar adecuadas.

Palabras clave:

Dispositivo de autoinfección, Enfermedad del Marchitamiento del Pino, Atracción e infección, Diseminación, *Bursaphelenchus xylophilus*.

1 INTRODUCCIÓN

El perforador *Monochamus galloprovincialis* Olivier (Coleoptera: Cerambycidae) es una especie considerada como plaga secundaria en los pinares de España y Europa, al igual que otras especies del género en Norteamérica y Asia (Linsley, 1959; Hanks, 1999). Sin embargo, tras comprobar su función como vector del Nematodo de la Madera del Pino en Portugal (Mota et al., 1999; Sousa et al., 2001), causante de la Enfermedad del Marchitamiento del Pino (EMP), se ha convertido en un insecto de relevante importancia fitosanitaria y por ello se ha incrementado el estudio de su biología, ecología y control (Alvarez et al., 2016).

1.1 El Nematodo de la Madera del Pino

Taxonomía, morfología y biología

El Nematodo de la Madera del Pino (NMP), (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner) Nickle (Nematoda: Aphelenchoididae)), pertenece al grupo formado por *Bursaphelenchus mucronatus* Mamiya & Enda, *Bursaphelenchus fraudulentus* Rühm, y *B. xylophilus* (Braasch, 2001), que se distingue del resto de grupos del género *Bursaphelenchus* Fuchs por presentar forma única de espículas, posición característica de las papilas caudales, bolsa bulbar y cuatro líneas laterales (Mamiya y Kiyohara, 1972; Nickle et al., 1981) (Figura 1). Ryss et al. (2005) ampliaron el grupo *xylophilus* con *Bursaphelenchus abruptus* Giblin-Davis, Mundo-Ocampo, Baldwin, Norden&Batras, *Bursaphelenchus baujardi* Walla Kum Kum, *Bursaphelenchus conicaudatus* Kanzaki et al., *Bursaphelenchus eroshenkii* Kolossova, *Bursaphelenchus kolymensis* Korenchenko y *Bursaphelenchus luxuriosae* Kanzaki&Futai.



Figura 1. Características principales de *B. xylophilus*. Detalle de espícula de ♂ y condilum (izq.), detalle de estilete y bulbo medio (centro) y detalle de bolsa bulbar (der.). Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos.

El NMP puede diferenciarse morfológicamente de los otros grupos mediante microscopía óptica (Braasch y Schönfeld, 2015), aunque esta metodología no permite distinguirlo fácilmente de *B. mucronatus*, especie no patógena, para lo cual debe recurrirse a análisis moleculares (Li, 2008). Existe controversia en las relaciones

taxonómicas entre ambas especies (CABI, 2004), aunque estudios químicos llevados a cabo por Abad et al. (1991) han determinado las diferencias entre ambos, resultando *B. xylophilus* de origen americano y *B. mucronatus* perteneciente a la región Paleártica.

El NMP presenta un ciclo biológico complejo, con cuatro estadios larvarios, en el cual se diferencian dos tipos de larvas, propagativas y dispersivas. Los dos primeros estadios son únicamente propagativos, pero tras la muda al tercer estadio pueden aparecer las formas dispersivas. Existe una nomenclatura definida para cada tipo: en la forma propagativa se emplea la letra L seguida de números arábigos: L₁, L₂, L₃ y L₄ y en la dispersiva o de resistencia (larvas Dauer) la J con números romanos: J_{III} y J_{IV} (Ohta et al., 1994) (Figura 2).

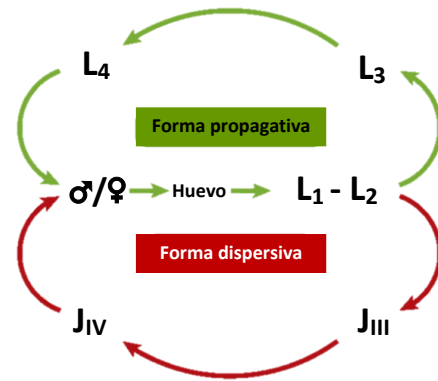


Figura 2. Ciclo biológico de NMP. Fuente: modificado de Futai (2013).

Varios autores (Mamiya y Kiyohara, 1972; Ishebashi y Kondo, 1977; Warren y Linit, 1993) sugirieron que los mecanismos que definen el desarrollo de los estados propagativo o dispersivo del NMP están relacionados con las condiciones en el interior de la madera, siendo independientes de la presencia del insecto vector (individuos del género *Monochamus* Dejean). Si las condiciones en la madera continúan siendo favorables, las poblaciones de NMP persisten en un ciclo de propagación en el que se suceden los cuatro estadios larvarios, para concluir mudando a adultos. A medida que aumenta la temperatura ambiente y disminuye la humedad de la madera, las larvas propagativas (L₂) mudan a larvas dispersivas o dauer (J_{III}) adaptadas a condiciones adversas (Tomminen et al., 1991). La mayor parte de la población de nematodos persiste en esta forma desde el invierno hasta la primavera, momento en que las larvas dauer J_{III} se agregan dentro de las cámaras de pupación del escarabajo vector (Mamiya, 1983; Tomminen et al., 1991; Aikawa y Togashi, 1997) y mudan allí a estadio dispersivo J_{IV} (Ishebashi y Kondo, 1977; Warren y Linit, 1993; Maehara y Futai, 1996). En este estadio son capaces de introducirse en las invaginaciones y, fundamentalmente, en las tráqueas del sistema respiratorio del insecto vector (Linit, 1988).

Tomminen et al. (1991) determinaron que el NMP puede completar un ciclo reproductivo en 3 días si la temperatura es de 30°C, que se prolongan a 12 días si la temperatura es la mitad (15°C). Temperaturas por encima de 40°C son limitantes para el desarrollo del NMP, así como las inferiores a 3°C que implican un cese en la actividad reproductiva e inducen a las larvas propagativas a mudar a larvas dispersivas.

Patogenicidad

El NMP es un organismo de cuarentena en la Unión Europea incluido en la Lista A2 (EPPO, 2016), causante de la Enfermedad del Marchitamiento del Pino (EMP). Mamiya y Kiyohara (1972) determinaron por primera vez que el agente causante de la EMP ("Pine Wilt Disease") era *B. lignicolus* (= *B. xylophilus* (Nickle et al., 1981)). Esta es ocasionada en las especies de coníferas susceptibles a los nematodos, que se alojan en los canales resiníferos y se alimentan de las células epiteliales y parenquimáticas. La acción de los nematodos desencadena una respuesta del hospedante que conduce a la perturbación del transporte hídrico y finalmente a su muerte por cavitación (Fukuda, 1988; Hara et al., 2006). La muerte de los árboles sucede de forma rápida, los pinos infectados a comienzo de verano, aparentemente sanos, mueren al final de éste, manteniendo las acículas secas y rojizas en los ramillos (Mamiya y Kiyohara, 1972; Mamiya, 1983) (Figura 3).



Figura 3. Rodal de *Pinus pinaster* afectado por la Enfermedad del Marchitamiento del Pino en Portugal. J. Pajares.

Distribución y daños

La primera referencia al NMP fuera de su área nativa (América del Norte) ocurrió en Japón en 1905 (Mamiya, 1983) (Figura 4), y aunque no se consiguió identificar a *B. xylophilus* como el causante de la muerte de los árboles, sí se describieron sus síntomas. En este país se ha convertido en la principal plaga forestal, causando pérdidas anuales entre uno y dos millones de metros cúbicos en pinos autóctonos como *Pinus densiflora* Siebold & Zucc, *Pinus thunbergii* Parl y *Pinus luchuensis* Mayr (Firmino et al., 2017; CABI,

2016; Aikawa y Togashi, 1997). En los años ochenta del siglo pasado se extendió a China, Corea y Taiwán (Firmino et al., 2017; Nunes da Silva et al., 2015). En Norteamérica, donde los pinos nativos no son susceptibles, se ha manifestado la enfermedad sobre especies introducidas como *Pinus nigra* J.F. Arnold y *Pinus sylvestris* L. (Dropkin et al., 1981), y en Méjico sobre *Pinus estevezii* (Martínez) J. P. Perry (Dwinell, 1993). En 1999, Mota et al. (1999) detectaron su presencia sobre *Pinus pinaster* Aiton en la bahía de Setúbal en Portugal, desde donde ha acabado por extenderse por todo el territorio portugués y Madeira. El primer foco detectado en España ocurrió en 2008 en Villanueva de la Sierra (Cáceres) (Consejería de Agricultura y Desarrollo Rural, 2008). Se han declarado posteriormente otros cuatro focos más en nuestro país: en 2010 en As Neves (Pontevedra) (Conselleria del Medio Rural, 2010), en 2012 en Valverde del Fresno (Cáceres) (Consejería de Agricultura y Desarrollo Rural, 2012), en 2013 en Sancti-Spiritus (Salamanca) (Consejería de Fomento y Medio Ambiente, 2013), y finalmente en 2016 en Salvaterra do Miño (Conselleria del Medio Rural, 2016) (Pontevedra), este último a menos de dos kilómetros del foco de As Neves.



Figura 4. Expansión del NMP desde 1905 hasta 2010. Recuadros verdes: distribución natural. Recuadros rojos: introducciones. Fuente: modificado de Zhao et al. (2014).

En todos los focos españoles se están aplicando las medidas de control y erradicación establecidas por el “*Plan Nacional de contingencia frente a NMP*” (Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, 2014). Hasta la fecha han sido declarados erradicados dos de estos focos, Villanueva de la Sierra (Consejería de Agricultura y Desarrollo Rural, 2013) y Valverde del Fresno (Dirección General de Agricultura y Ganadería de la Junta de Extremadura, 2017).

Da Silva et al. (2015) demostraron la alta susceptibilidad de *P. pinaster* al NMP, así como una susceptibilidad media de *P. sylvestris* y *P. nigra*. Un caso remarcable es el de *Pinus radiata* D. Don, una especie nativa de Norteamérica y considerada no susceptible que ha aparecido infectada en Sancti Spiritus (Salamanca), donde se desarrollaba bajo unas condiciones de estación inadecuadas (Zamora et al., 2015). Por otro lado, *Pinus pinea* L. y *Pinus halepensis* Mill. presentan cierta resistencia ofrecida por defensas autoinducidas

(Pimentel et al., 2016; Da Silva et al., 2015), y ninguna de ellas ha mostrado síntomas de infección en Portugal hasta la fecha.

La aparición de la enfermedad en Portugal y España unido a la alta susceptibilidad de los principales pinos europeos ha originado una gran alarma en Europa. Para que la enfermedad exprese los síntomas es necesario que se produzcan ciertas condiciones de temperatura. En Japón, Rutherford y Webster (1987) determinaron que la sintomatología solo aparecía si la temperatura media del mes más cálido era superior a 20°C. Gruffudd et al. (2016) han presentado recientemente un modelo para predecir las áreas donde la EMP se manifestaría en Europa (Figura 5). Las zonas con potencial aparición de síntomas serían aquellas cuya temperatura media del verano es superior a 20,0°C, aunque podría aparecer en algunos escenarios con temperatura media entre 19,3 - 20,0°C, mientras que por debajo de este valor no se produciría manifestación de síntomas, aunque los pies pudieran albergar NMP. El área de manifestación potencial de la EMP abarca la zona Circunmediterránea y los Balcanes, no llegando a ser susceptibles la mayoría de las masas europeas de *P. sylvestris* centroeuropeo debido al limitante de temperatura media del verano inferior a 19,3°C. No obstante, en el escenario de cambio climático actual, esta área potencial podría extenderse hacia el norte debido al aumento de las temperaturas (Seneviratne et al., 2006).

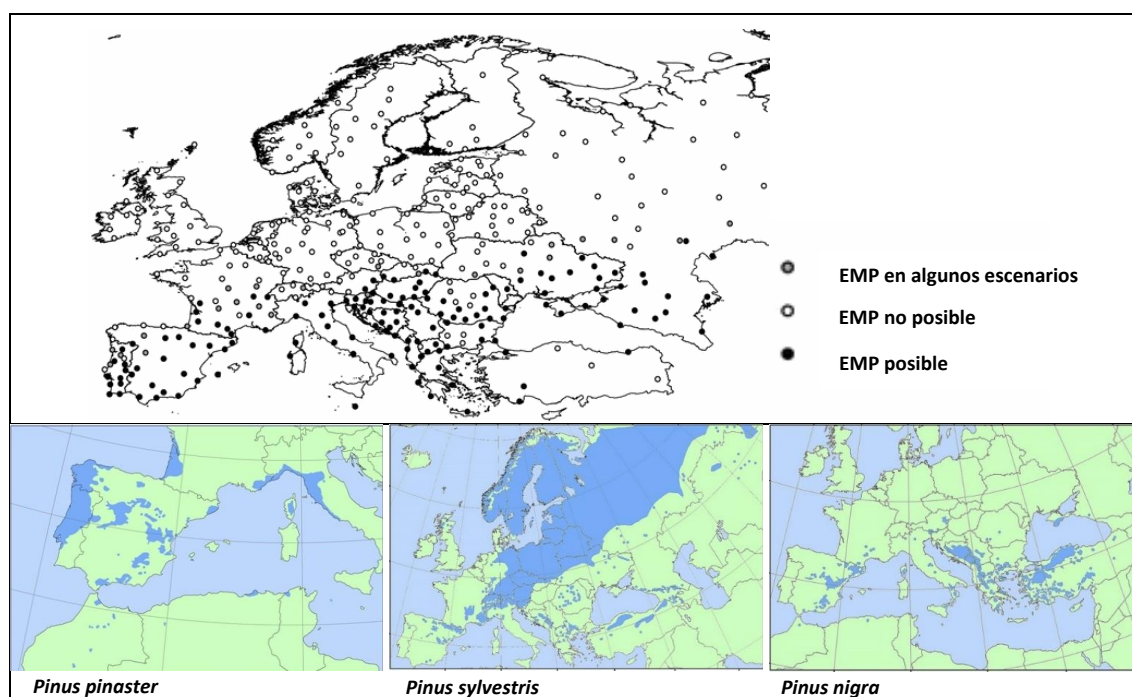


Figura 5. Área susceptible en Europa de ser atacada por la Enfermedad del Marchitamiento del Pino, según zonas con rango de Tª y distribución de hospedantes. Zonas susceptibles de ser infectadas con *B. xylophilus* en Europa, según el modelo de evapotranspiración (Gruffudd et al., 2016) (Arriba). Distribución de especies del género *Pinus* sp. susceptibles de ser atacadas por NMP en Europa (modificado EUFORGEN 2017) (Abajo).

Control del Nematodo y de la Enfermedad del Marchitamiento del Pino

Un método efectivo para el control de la EMP consiste en la identificación y eliminación de los pies que han contraído la enfermedad, mediante las medidas definidas por el Plan de Contingencia (Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, 2014). Para ello, es fundamental la detección temprana de los focos a través de las redes de seguimiento.

El control del NMP es complejo debido a las características biológicas del nematodo, como su ciclo reproductivo corto, alternancia entre fases fitófagas y micófagas y resistencia de las larvas dauer (Mas i Gisbert, 2015), así como su ubicación en el interior de la madera.

La aplicación de nematicidas, aunque es factible en pies aislados de gran valor y existen algunos compuestos naturales a base de aceites esenciales (Shin et al., 2005) es inviable a escala forestal. Por tanto, el control de la enfermedad se ha enfocado al manejo de su insecto vector.

1.2 Los vectores del Nematodo de la Madera del Pino

La dispersión del NMP está necesariamente ligada a un insecto vector. Aunque se han citado más de una veintena de especies de coleópteros (Cerambycidae, Curculionidae y Buprestidae) como portadores de *B. xylophilus* (Linit, 1988), se ha demostrado que únicamente, las especies del género *Monochamus* Dejean han resultado transmisores de la enfermedad (Wingfield 1983; Kobakashi et al., 1984).

El género *Monochamus* pertenece al orden Coleoptera, familia Cerambycidae, subfamilia Laminae y tribu Monochamini (Dillon y Dillon, 1941). Comprende unas ciento cincuenta especies en todo el mundo, la mayoría hospedándose sobre coníferas. Nueve de ellas se han identificado como transmisores del NMP, principalmente: *Monochamus alternatus* Hope y *Monochamus saltuarius* Gebler (principales vectores en Asia), *Monochamus carolinensis* Olivier, *Monochamus scutellatus* Say y *Monochamus mutator* LeConte (Norte América) y *M. galloprovincialis* (Europa) (Mota et al., 1999; Linit, 1988; Akbulut y Stamps, 2012; Zhao et al., 2014). Otras especies menos eficientes en la transmisión son: *Monochamus nitens* Bates (Japón); *Monochamus marmorator* Kirby, *Monochamus obtusus* Casey y *Monochamus titillator* Fabricius (Norte América) (CABI, 2016). En Europa también podrían actuar como vectores *Monochamus sutor* L., *Monochamus sartor* Fabricius y *Monochamus urussovi* Fischer (Evans et al., 1996).

Todos los *Monochamus* son fitófagos secundarios sobre tejidos de plantas leñosas. Los adultos se alimentan en el floema de los ramillos de árboles sanos (Linsley, 1959), y tras

alcanzar la madurez sexual, entre 12 y 12,8 días para machos y hembras, respectivamente (Sanchez-Husillos et al., 2016), realizan las puestas en heridas realizadas con las mandíbulas sobre la corteza de árboles, o partes de ellos, moribundos, estresados o talados recientemente (Akbulut y Stamps, 2012). Tras la eclosión, las larvas penetran en el floema, donde se alimentan, profundizando hacia el xilema según avanza su desarrollo, para concluir realizando una galería en el interior de la albura que finaliza en una cámara de pupación. Tras la pupación, los adultos preemergentes realizan un orificio de salida ayudándose de sus mandíbulas (Pershing y Linit, 1986) y se dirigen a las copas donde se alimentarán para su maduración sexual y mantenimiento durante toda su vida (Sanchez-Husillos et al., 2016).

El proceso del NMP para introducirse en el vector se lleva a cabo en las cámaras de pupación del insecto. Según Aikawa y Togashi (1997) y Tomminen et al. (1991) las larvas J_{III} se concentran en torno a las cámaras de pupación del vector y mudan allí a estadio dispersivo J_{IV} (Warren y Linit, 1993; Ohta et al., 1994), y a continuación se introducen en el sistema respiratorio del adulto preemergente, principalmente en las tráqueas y en el meso- y meta-tórax (Naves et al., 2006). Tras la emergencia del adulto, los nematodos son transportados hacia las ramillas de pinos sanos a los que se dirigen los insectos para alimentarse (Wingfield, 1983). Los nematodos descienden de su vector y son capaces de introducirse en un hospedante susceptible a través de las mordeduras de alimentación (Mamiya et al., 1988; Linit, 1990). Las larvas Dauer J_{IV} invaden los canales resiníferos y los tejidos del floema y xilema alimentándose de células en hospedantes vivos, donde mudan a adultos (Mamiya, 1983), (transmisión primaria).

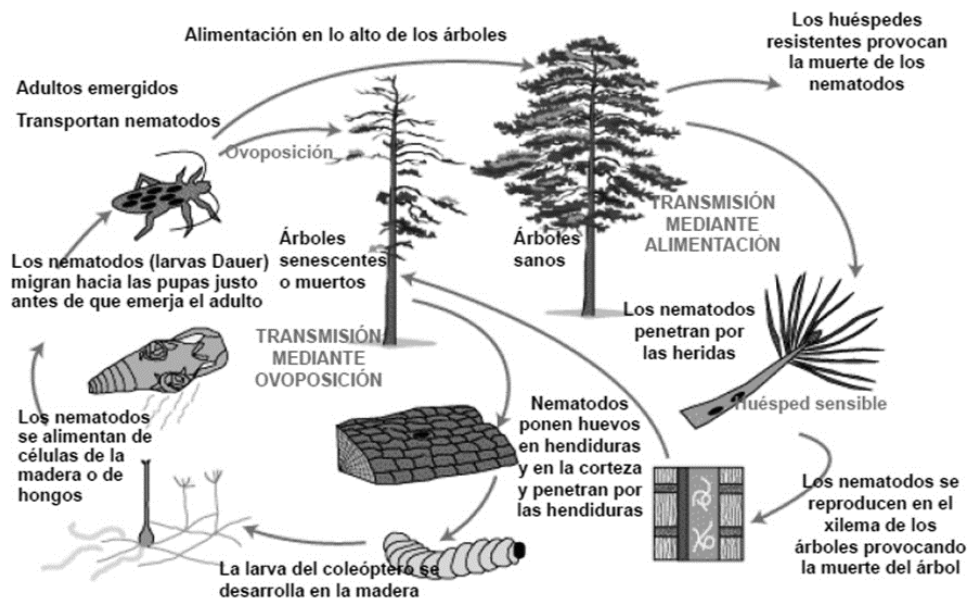


Figura 6. Relación entre NMP y ciclo de *Monochamus* sp. Fuente: modificado de Evans et al. (1996).

Los nematodos que no han abandonado el cuerpo del vector durante la alimentación en los ramillos tienen oportunidad de colonizar los árboles estresados y poco vigorosos o recién muertos, donde el vector realizará la puesta. Este tipo de transmisión secundaria permite el cierre del ciclo conjunto puesto que los nematodos dispondrán de nuevos vectores, cuando la generación de este complete su desarrollo (Linit, 1988; Futai, 2013) (Figura 6).

Biología de *Monochamus galloprovincialis*

M. galloprovincialis es un insecto considerado como plaga secundaria que coloniza pinos o partes de ellos, recién muertos o moribundos. En el área mediterránea presenta una sola generación anual (ciclo univoltino) (Naves et al, 2008); mientras que en Finlandia requiere dos años para completar una generación (ciclo semivoltino) (Akbulut y Stamps, 2012). Las emergencias de los adultos se producen desde principios de mayo hasta finales de septiembre en el área mediterránea, presentando un máximo en junio y otro, algo menor, en septiembre. Los adultos mueren a finales de octubre o principios de noviembre (Naves et al., 2008; Koutroumpa et al., 2008).

La longevidad media de los imagos es de 61 a 64 días, para machos y hembras respectivamente, de los cuales los primeros 12 días son inmaduros sexualmente (Sanchez-Husillos et al, 2016) (Figura 7). Se alimentan en ramillos de árboles sanos durante toda su vida, para su maduración sexual y posterior mantenimiento. Tras alcanzar la madurez, los machos emiten una feromona agregativa que atrae a ambos sexos (Pajares et al., 2016). El reconocimiento de la pareja es realizado por los machos mediante feromonas de contacto presentes en la cutícula de las hembras, que son fecundadas una vez reconocidas por el macho a través de hidrocarburos cuticulares (Ibeas et al., 2009). Las hembras ponen entre 37 y 87 huevos en el floema (Mas i Gisbert, 2015) y el desarrollo larvario, cuya duración depende de la temperatura (Koutroumpa et al., 2008), se produce durante el verano y se extiende hasta la primavera siguiente, época en la que se produce la pupación.



Figura 7. Hembra de *M. galloprovincialis* sobre *Pinus sylvestris*. (arriba). Detalle de macho de *M. galloprovincialis* alimentándose en un ramillo (abajo). G. Álvarez.

Control de los vectores del Nematodo de la Madera del Pino

El control de los *Monochamus* vectores es una estrategia fundamental para frenar la expansión de la enfermedad del marchitamiento del pino. Dentro de este contexto el saneamiento intensivo en las zonas demarcadas y de alto riesgo es llevado a cabo regularmente en España (España Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, 2014). Investigaciones llevadas a cabo durante la última década han logrado el desarrollo de un atrayente cairo-feromonal altamente eficiente para la captura de *M. galloprovincialis* y *M. sutor* (Pajares et al., 2010 y 2013; Alvarez et al. 2016) disponible comercialmente (Galloprotect 2D®, SEDQ, Barcelona). Al mismo tiempo, la mejora de las trampas para la captura y supervivencia de los individuos capturados (necesaria para el examen de los nematodos transportados) (Alvarez et al., 2015), han permitido actualmente un eficiente monitoreo de las poblaciones de ambas especies de *Monochamus* y avanzar en el estudio de aspectos fundamentales de su ecología, como su capacidad de dispersión (técnicas de captura, marcado y recaptura) (Etxebeste et al., 2016). Investigaciones recientes han mostrado además que este sistema de trampeo es capaz de reducir fuertemente los niveles poblacionales del vector de forma operativa en zonas de alto riesgo mediante el método de captura masiva (Sanchez-Husillos et al., 2015).

La parte cairomonal del atrayente consta de dos compuestos semioquímicos que son componentes de las feromonas agregativas de los perforadores escolítidos: ipsenol y metil-butenol (Pajares et al., 2004; Ibeas et al., 2007). Estas sustancias son atractivas también a diversos coleópteros que forman parte del hábitat subcortical de los pinos (Martín et al., 2013), incluyendo depredadores naturales como *Temnochila caerulea* Olivier (Col.: Trogossitidae) o *Thanasimus formicarius* L. (Col.: Cleridae) y saproxílicos como: *Spondylis buprestoides* L. (Col.: Cerambycidae), *Chalcophora mariana* L., *Buprestis novemmaculata* L. (Col.: Buprestidae), entre las más comunes. La captura de estas especies no objetivo es un efecto indeseado del cebo cairo-feromonal.

Varios estudios han tratado de identificar y evaluar los agentes de control biológico que afectan a las poblaciones de las especies de *Monochamus* en Asia y Europa. Ente los insectos parasitoides se han citado ichneumónidos como *Dolichomitus* sp. Smicht (parásitos de larvas y pupas), bracónidos como *Atanycolus initiator* Fabricius (parasitoide de larvas) o *Spathius radzayanus* Ratzeburg (de huevos) (Shimazu, 2008). En Portugal se han detectado tres himenópteros bracónidos, *Cynopterus flavator* Fabricius, *Iphiaulax impostor* Scopoli, y *Coeloides sordidator* Ratzeburg, con escasa capacidad de control biológico efectivo (Naves et al., 2005).

Los organismos entomopatógenos parecen ofrecer una mayor posibilidad de control sobre las poblaciones de estos vectores. Así, en Portugal Naves et al., (2008) encontraron que el hongo *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. era el causante de la mayor mortalidad en *M. galloprovincialis* entre los agentes biológicos. La aplicación de cepas de este hongo ha sido estudiada para el control de otras plagas como el picudo rojo (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (1790)) (Dembilio et al., 2010; Francardi et al., 2013), *Cylas formicarius* Fabricius (1798) (Yasuda, 1999) o de *Popillia japonica* Newman (1838) (Klein y Lacey, 1999). Shimazu (2004) y Maehara et al. (2007) han realizado ensayos sobre *M. alternatus* con este hongo. Alvarez-Baz et al. (2015) han demostrado recientemente el alto potencial de la cepa EABpb del hongo *Beauveria pseudobassiana* (S.A. Rehner & Humber) (Hypocreales: Cordycipitaceae) para el control biológico de *M. galloprovincialis* en España (Figura 8). Esta cepa se obtuvo en 2010 a partir de individuos pre-emergentes de *M. galloprovincialis* presentes en cámaras de pupación de trozas de *P. pinaster* colonizadas tras un incendio en la localidad de Cuevas del Valle (Ávila).



Figura 8. *M. galloprovincialis* atacado por *B. pseudobassiana*.

Los ensayos realizados en laboratorio mostraron que esta cepa tuvo una buena capacidad de transmisión horizontal entre individuos de distinto sexo durante el apareamiento, y vertical al producirse una reducción del número de puestas en las hembras infectadas (Alvarez-Baz et al., 2015). Pese a su alta virulencia, la capacidad de infección de este tipo de hongos entomopatógenos presentes en las galerías y cámaras en la madera, se encuentra limitada por su reducida posibilidad de dispersión en las masas forestales, su hidrofobia y dispersión pasiva a partir de cadáveres infectados (Shah y Pell, 2003). Análogamente, el uso operativo de estos agentes en monte se encuentra condicionado por la posibilidad de su aplicación práctica.

Algunos estudios han empleado textiles no tejidos (como el fieltro) con éxito para aplicar tratamientos con *B. bassiana* formulada en talco contra *M. alternatus* (Okitsu et al., 2000; Shimazu et al., 1995; Shimazu y Sato, 2003). Este tipo de tejidos permite retener el formulado e ir dispensándolo cuando el insecto se desplaza o entra en contacto con ellos. Otros estudios han utilizado pellets de trigo (Shimazu, 1993) o insectos escolítidos *Cryphalus fulvus* (Shimazu et al., 1992) como diseminadores del inóculo frente a *M. alternatus* en Japón.

Las técnicas de autodiseminación constituyen una posibilidad de gran potencial para la aplicación de estos agentes. Entre ellas, las conocidas como “atrae&infecta” pretenden

la atracción de los propios insectos a estaciones (trampas) donde son autoinfectados con el agente disruptor (hongo entomopatógeno) y posteriormente autoliberados, de forma que antes de su muerte son capaces de dispersar el inóculo entre los miembros de su población a través de mecanismos de transmisión horizontal y/o vertical. La disponibilidad de un cebo altamente atractivo y de un agente biológico fuertemente virulento ofrece una clara oportunidad de aplicar esta técnica para el control de las poblaciones de *M. galloprovincialis* en áreas de especial interés.

En este trabajo se presentan los resultados de estudios para avanzar en el desarrollo de un sistema que permita la aplicación operativa de la cepa EABpb de *B. pseudobassiana* mediante la técnica de autodiseminación empleando el método atrae&infecta en trampas multiembudos modificadas (Econex Multifunnel-12®) cebadas con Galloprotect 2D® (SEDQ S.L.), procurando minimizar el impacto sobre los insectos “no objetivo” que puedan ser capturados.

2 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar un sistema de autoinfección para *M. galloprovincialis*, con el hongo entomopatógeno *B. pseudobassiana* que pueda ser finalmente aplicado de forma operativa para el manejo de la Enfermedad del Marchitamiento del Pino en zonas donde sea una estrategia fundamental disminuir la densidad del vector, como en zonas demarcadas o de alto riesgo.

Para ello se perseguirán los siguientes objetivos particulares:

- Desarrollar un sistema de autoliberación de los adultos *M. galloprovincialis* capturados desde el bote colector de las trampas.
- Desarrollar un sistema de autoinfección con *B. pseudobassiana* de los adultos del vector capturados en las trampas, compatible con el método de autoliberación
- Aumentar la selectividad del método mediante modificaciones en el sistema de captura que permitan minimizar el potencial impacto sobre otras especies no objetivo presentes en la masa forestal
- Determinar la dosis adecuada del hongo entomopatógeno que permita la autoinfección del insecto y la consiguiente transmisión del inóculo, según los distintos dispositivos desarrollados.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

Para la consecución de estos objetivos se realizaron cuatro experimentos, tres en campo y uno en laboratorio.

3.1 Sitios experimentales

Dos experimentos de campo (1 y 2) se llevaron a cabo en una masa natural de *P. pinaster* en resinación en estado de fustal, ubicada en el término municipal de Vallelado en los montes MUP 54 “Arroyuelo de Valdepino” y MUP 224 “Pinar de la Obra Pía del Comendador Gómez Velázquez” (30N X: 381.200, Y: 4.581.200, altitud: 760 m.s.n.m.); el experimento 3 de atracción, infección y recaptura se llevó a cabo en un latizal alto de *P. pinaster* repoblado de 3 ha en Cervatos de La Cueva (Palencia) (30N X: 354.600, Y: 4.685.000, altitud: 865 m.s.n.m.) (Figura 9).

En todos los experimentos de campo se utilizaron trampas multiembudos de 12 unidades (Econex Multifunnel®; Murcia) cebadas con Galloprotect 2D® (SEDQ SL., Barcelona), colgadas de postes o de cuerdas entre árboles, a 2,0 metros de altura.

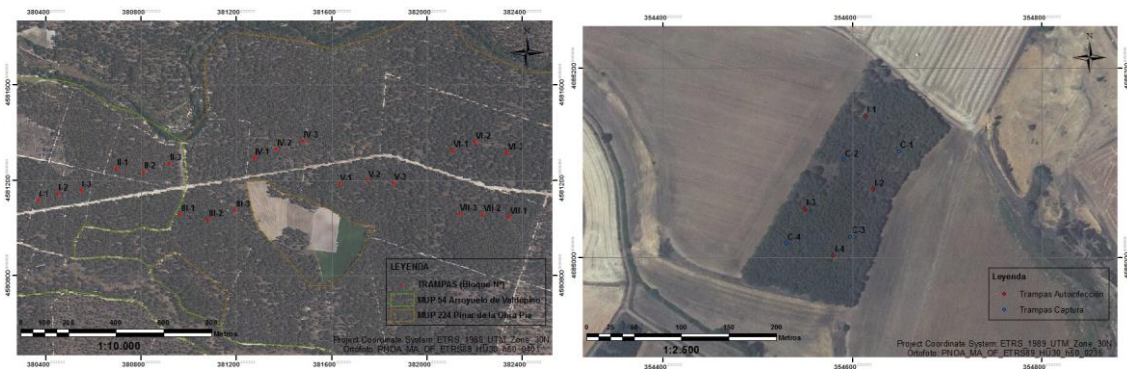


Figura 9. Ubicación y distribución de las trampas en los montes 54 y 224 en Vallelado (Segovia) y Cervatos de la Cueva (Palencia)

3.2 Dispositivo de autoliberación y autoinfección

Se diseñó un sistema sencillo que sirviese para la autoliberación de los insectos desde el bote colector y simultáneamente para su autoinfección al escaparse de él, a partir del bote colector “extended” teflonado (diámetro 10 cm, profundidad 23 cm) de la trampa multiembudos (Econex Multifunnel®; Econex; Murcia).

El dispositivo consistió en un tubo de plástico transparente (65 mm de longitud y 30 mm de diámetro externo), enroscado a una tapa en uno de sus extremos. Este bote se conectó externamente al bote colector, perforando un orificio de 27 mm en su pared exterior, a la altura del fondo del bote. En la tapa del tubo se realizó un orificio similar al realizado en la pared del bote, y se acopló a este a este mediante adhesivo

termofusible (Figura 10). De esta forma el tubo, abierto en sus dos extremos, se podía conectar al bote de la trampa simplemente enroscándolo a la tapa pegada en la pared externa del bote, quedando una vía de escape para los insectos desde el interior del bote colector.



Figura 10. Prototipo original (alzado y perfil) y detalle de la unión entre bote y dispositivo.

El sistema de autoliberación descrito puede incorporar fácilmente la función de autoinfección, añadiendo un recubrimiento a la pared interna del tubo de un textil no tejido (fieltro) (Shimazu et al., 1995) a modo de forro interno. En este fieltro se aplica la formulación de conidios del hongo en talco, de modo que al escapar por el tubo el insecto camina y roza contra el talco y contamina su cuerpo con los conidios (Figura 11).



Fig. 11. Disp. de infección

En los experimentos de campo se utilizaron trampas multiembudos provistas de bote colector “extended” teflonado (Econex Multifunnel®12; Murcia) suspendidas a 2,0 metros de altura y cebadas con Galloprotect 2D (SEDQ SL., Barcelona).

3.3 Experimentos

Experimento 1. Efectividad del dispositivo de autoliberación y reducción del impacto sobre especies no objetivo.

Se evaluó la efectividad del dispositivo de autoliberación para *Monochamus* descrito anteriormente. Para conocer los individuos capturados (*M. galloprovincialis* y otras especies) que utilizaban el tubo de autoliberación para abandonar la trampa se acopló un bote accesorio (diámetro 10 cm, altura 15 cm) a la salida del tubo, de forma que los insectos autoliberados a través de éste eran recogidos en el bote accesorio. El fondo del

bote accesorio estaba cerrado por una malla tupida y su parte superior por una tapa de plástico con pequeños orificios para permitir la aireación (Figura 12)

Como se ha dicho el cebo utilizado resulta atractivo para diversas especies de coleópteros depredadores y xilófagos que son capturadas y podrían resultar inoculadas con el hongo entomopatógeno. Para evitar este potencial impacto se desarrolló un experimento con el objetivo de minimizar las capturas de estas especies aumentando así la selectividad del sistema. Para ello, la estrecha malla que cubre del fondo del bote colector fue sustituida por una malla de mayor luz, de forma que los insectos más pequeños que los adultos *M. galloprovincialis* (4,5 - 9 mm de anchura máxima de los élitros) pudiesen escapar a



Figura 12. Bote auxiliar unido a prototipo (izq.). Detalle de unión con el prototipo (la tapa azul se emplea de unión entre ambos botes), detalle de dispositivo de autoliberación y detalle de malla tupida en fondo y capturas (Der. arriba). Detalle de tapa perforada en bote auxiliar para permitir la aireación (Der. abajo).

través de ella, mientras que fuesen retenidas las capturas del vector. Se testaron dos mallas de alambre galvanizado electrosoldado: una con 4,8 mm de luz (Malla Estrecha; ME) y otra con 6,0 mm de luz (Malla Ancha; MA) (Figura 13).

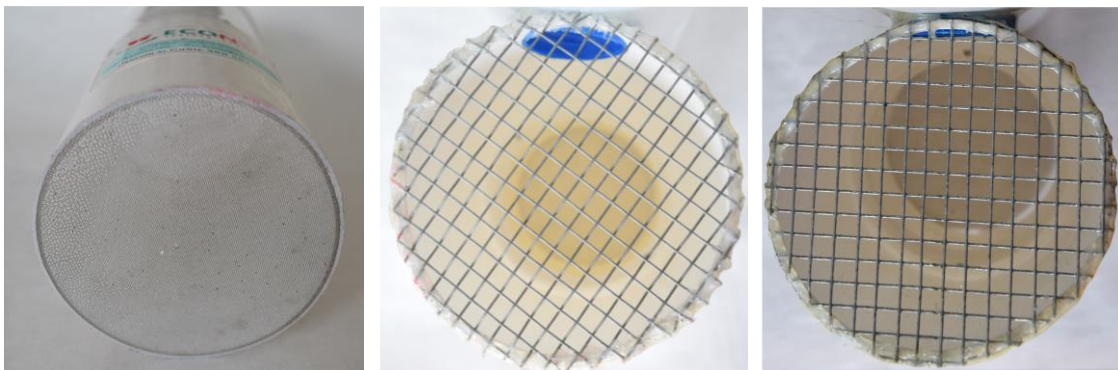


Figura 13. Detalle de las mallas que definen los tratamientos del experimento 1. Control (C): malla estándar del bote colector Econex (izq.), Malla Estrecha (ME): malla de luz 4,8 mm (cen.) y Malla Ancha (MA): malla de luz 6,0 mm (der.).

Se ensayaron por tanto los siguientes 3 tratamientos:

- Malla Estrecha (ME): fondo del bote colector Econex extended teflonado cerrado con malla de 4,8 mm de luz. Dispositivo de autoliberación conectado a ras del fondo, con bote auxiliar.

- Malla Ancha (MA): fondo del bote colector Econex extended teflonado cerrado con malla de 6 mm de luz. Dispositivo de autoliberación conectado a ras del fondo, con bote auxiliar.
- Control (C): bote colector "Econex extended" teflonado estándar. Sin dispositivo de autoliberación, ni bote auxiliar.

El diseño experimental consistió en siete bloques completos al azar, sin realeatorización (Figura 9). La separación entre trampas fue de al menos 80 m, y entre bloques al menos 300 m. Las trampas fueron muestreadas semanalmente. El desarrollo del experimento se extendió entre el 5 y el 25 de julio de 2016.

Experimento 2. Aumento de la selectividad de la trampa frente a especies no objetivo.

A partir de los resultados obtenidos en el Experimento 1, se trató de continuar testando el dispositivo de autoliberación y mejorando la selectividad del sistema para reducir el impacto sobre las especies no objetivo. Para ello se trató de evaluar si elevando la conexión del tubo de autoliberación 1,0 cm por encima del fondo del bote colector podría evitarse que algunas especies no objetivo poco ágiles, como los grandes bupréstidos imposibilitados de escapar a través de la malla del fondo, utilizaran el tubo de autoliberación para salir de la trampa. (Figura 14). En este caso, y teniendo en cuenta los resultados del experimento anterior, se utilizó la malla de 6 mm (Filtro Ancho) en el fondo del bote colector para facilitar el escape de los insectos no objetivo.



Figura 14. Diferentes alturas del dispositivo de autoliberación. Izq. a ras del fondo (Tubo Bajo). Der. elevado 1,0 cm del fondo (Tubo Alto).

Se ensayaron los siguientes 3 tratamientos:

- Control (C): bote colector "Econex extended" teflonado estándar. Sin dispositivo de autoliberación, ni bote auxiliar.
- Tubo Bajo (TB): dispositivo de autoliberación conectado a ras del fondo, con bote auxiliar.
- Tubo Alto (TA): dispositivo de autoliberación conectado 1 cm por encima del fondo, con bote auxiliar.

El diseño experimental y la disposición y muestreo de las trampas fue similar al Experimento 1. El experimento se llevó a cabo entre el 25 de julio y el 10 de octubre.

Experimento 3. Auto-infección en campo con polvo fluorescente

A partir de los resultados positivos de autoliberación obtenidos en los experimentos anteriores, en un tercer ensayo se trató de evaluar preliminarmente en campo el dispositivo de autoinfección, descrito anteriormente.

Pruebas preliminares en laboratorio permitieron seleccionar dos grosores distintos del fieltro, fino de 1,5 mm de espesor y grueso de 3 mm, aplicados al interior de la pared de dos tubos de liberación: estrecho (65 mm longitud y 30 mm diámetro; empleado en Experimentos 1 y 2) y ancho (65 mm longitud y 40 mm de diámetro). El fieltro fino se aplicó al tubo estrecho, y el fieltro

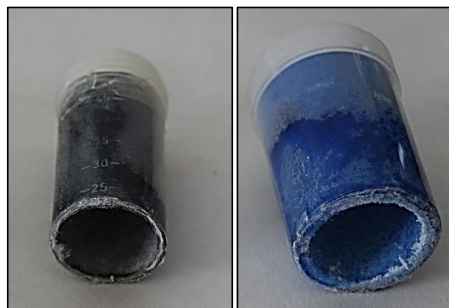


Figura 15. Dispositivo estrecho (a) y ancho (b).

grueso se aplicó al tubo ancho (Figura 15). El dispositivo para ser eficiente debería tener la suficiente luz para permitir el paso de los individuos de *M. galloprovincialis* a la vez que ser suficientemente estrecho como para estos individuos se impregnaran del inóculo al rozar con la pared interna de fieltro.

Los resultados de estos ensayos llevaron a testar el sistema de autoinfección de fieltro grueso aplicado al tubo ancho, insertado a dos alturas, a ras o a 1 cm por encima de la base el bote colector. Como inóculo se utilizó polvo fluorescente (amarillo o fucsia; Entomopraxis, Barcelona), que previamente había demostrado en laboratorio no resultar tóxico para los insectos.

Para determinar si los individuos de *M. galloprovincialis* eran capaces de autoinfectarse con el polvo fluorescente y dispersarse tras ser contaminados por él (simulando un inóculo de *B. pseudobassiana* en talco), se trató de recapturar los adultos en trampas multiembudos estándar. El experimento se llevó a cabo en un pequeño rodal de *P. pinaster*, aislado en un área agrícola. Para reforzar la seguramente escasa población de *M. galloprovincialis* en el rodal se realizaron 9 sueltas periódicas de individuos. En total se liberaron 181 ejemplares, 50 procedentes de emergencia controlada desde trozas en laboratorio y 131 procedentes de capturas en trampas en otros experimentos o en la parcela la semana anterior, que fueron marcados individualmente (Tabla 1 y Figura 16).



Figura 16. *M.g.* ♀ marcada

Se ensayaron dos tratamientos, con dos repeticiones cada uno:

Control biológico del vector del nematodo de la madera del pino *Monochamus galloprovincialis* Olivier mediante autoinfección con el hongo entomopatógeno *Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber.

- I.a: dispositivo de infección bajo, insertado a ras del bote colector “Econex extended” teflonado, con fondo de malla de 6 mm (polvo amarillo) (Figura 17 a y b)
- I.b: dispositivo de infección alto, insertado a 1 cm por encima del bote “Econex extended” teflonado, con fondo de malla de 6 mm (polvo fucsia) (Figura 17 c y d)

Para la recaptura de los insectos “autoinfectados” se utilizaron dos trampas multiembudos estándar (Econex Multifunnel 12®).

El ensayo se instaló el 26 de julio de 2016 y fue muestreado semanalmente hasta el 29 de septiembre.



Figura 17. Dispositivo de infección alto (a y b) y detalle de dispositivo de autoliberación un (1,0 cm) centímetro por encima de la malla de fondo. Dispositivo de infección bajo (c y d) y detalle de dispositivo de autoliberación e infección enrasado con la malla inferior del bote colector Econex extended.

Tabla 1. Relación de *M. galloprovincialis* liberados en la parcela de Cervatos de la Cueva. Los ejemplares procedentes del “Exp. 3. Cervatos” se capturaron la semana anterior a la fecha de liberación.

Fecha de suelta	Procedencia	Número	Sexo
26/07/2016	Colonia laboratorio	50	♀
	Trampas en Vallelado	16	♀
		5	♂
05/08/2016	Trampas en Vallelado	7	♀
		13	♂
09/08/2016	Trampas en Vallelado	19	♀
		9	♂
19/08/2016	Trampas en Vallelado	9	♀
		13	♂
26/08/2016	Trampas en Vallelado	6	♀
		8	♂
02/09/2016	Trampas en Vallelado	4	♀
		3	♂
16/09/2016	Trampas en Vallelado	3	♀
		2	♂
23/09/2016	Trampas en Vallelado	2	♀
		2	♂
29/09/2016	Trampas en Vallelado	5	♀
		3	♂

Experimento 4. Infección de *Monochamus galloprovincialis* con *Beauveria pseudobassiana* en laboratorio a través de los dispositivos de autoinfección

Un último ensayo trató de evaluar la efectividad de los dispositivos de autoinfección estimando la duración de la supervivencia de los individuos autoinfectados en laboratorio con una formulación de la cepa EABpb de *B. pseudobassiana* en talco.

Se testaron dos dispositivos, tubo estrecho con filtro fino (EF), y tubo ancho con fieltro grueso (AG). En esta ocasión la longitud de los tubos fue aumentada a 100 mm (en lugar de los 65 mm en los ensayos de campo) (Figura 18).

En el mismo ensayo se testaron dos dosis de inóculo, $1 \cdot 10^9$ y $1 \cdot 10^{10}$ conidios \cdot gramo^{-1} formulados en talco, además de un control sólo con talco y otro control sin talco. El inóculo infectivo fue preparado en la Universidad de Córdoba por el equipo del Dr. E. Quesada Moraga de la siguiente manera: se cultivaron conidios en placas Petri 90 mm con medio extracto de malta - agar durante 15 días. Se extrajeron y se suspendieron en una solución de Tween 80 al 0,1 %, se agitó, sónico y filtro para eliminar el micelio. Por último, se determinó la concentración (conidios \cdot g^{-1}) con una cámara Malassez y se prepararon los formulados con talco.

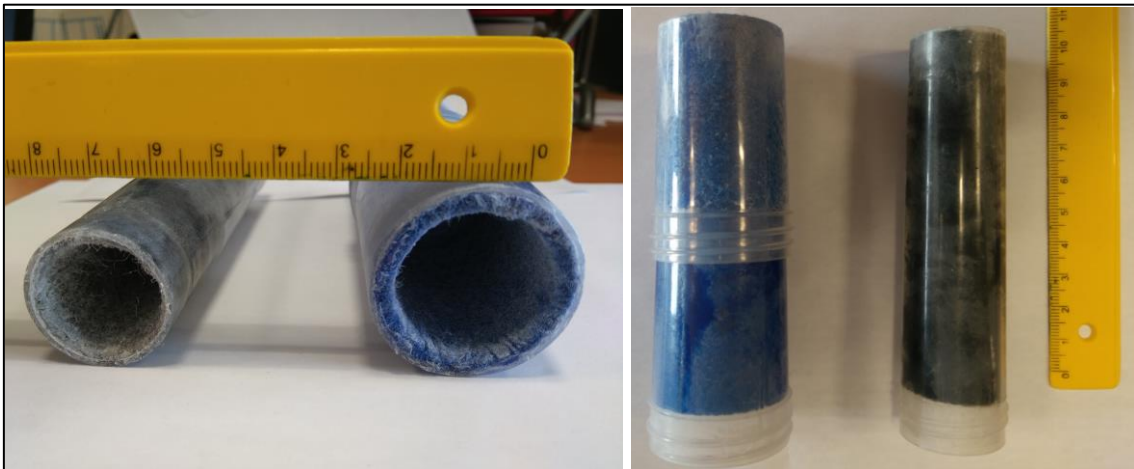


Figura 18. Detalle de dispositivos de autoliberación-infección. Estrecho con fieltro fino (EF) y ancho con fieltro grueso (AG)

Los insectos ensayados procedieron de trampas en Vallelado (Segovia) (Experimento 2) y Tabuyo del Monte (León) durante septiembre de 2016. Los adultos aptos se clasificaron según su peso en: pequeños (<200 mg), medianos (200-400 mg) y grandes (>400 mg). Los individuos se asignaron a los tratamientos de forma que no hubiese sesgo en el tamaño (Tabla 2). En total se utilizaron 200 adultos de *M. galloprovincialis*.

Control biológico del vector del nematodo de la madera del pino *Monochamus galloprovincialis* Olivier mediante autoinfección con el hongo entomopatógeno *Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber.

Tabla 2. Distribución por tamaño de los ejemplares de *M. galloprovincialis* empleados en el Experimento 4. Pequeños (<200 mg), Medianos (200-400 mg) y Grandes (>400 mg).

TRATAMIENTO	CLASIFICACIÓN			TOTAL
	Pequeños	Medianos	Grandes	
AGC	3	12	5	20
EFC	3	13	4	20
AGT	6	12	2	20
EFT	6	12	2	20
AGB9	3	12	5	20
EFB9	3	13	4	20
IB9	3	12	5	20
AGB10	3	13	4	20
EFB10	3	12	5	20
IB10	3	13	4	20

En total se testaron 8 tratamientos en un diseño factorial (2 dispositivos x 4 dosis):

- Control AGC: dispositivo de autoinfección AG sin talco ni inóculo.
- Control EFC: dispositivo de autoinfección EF sin talco ni inóculo.
- Talco AGT: dispositivo de autoinfección AG con talco sin inóculo
- Talco EFT: dispositivo de autoinfección AG con talco sin inóculo.
- Inoculación *B. pseudobassiana* 10⁹ con dispositivo AG (AGB9): dispositivo de autoinfección AG con inóculo de 1·10⁹ conidios · gramo⁻¹ de *B. pseudobassiana*.
- Inoculación *B. pseudobassiana* 10⁹ con dispositivo EF (EFB9): dispositivo de autoinfección EF con inóculo de 1·10⁹ conidios · gramo⁻¹ de *B. pseudobassiana*.
- Inoculación *B. pseudobassiana* 10¹⁰ con dispositivo AG (AGB10): dispositivo de autoinfección AG con inóculo de 1·10¹⁰ conidios · gramo⁻¹ de *B. pseudobassiana*
- Inoculación *B. pseudobassiana* 10¹⁰ con dispositivo EF (EFB10): dispositivo de autoinfección EF con inóculo de 1·10¹⁰ conidios · gramo⁻¹ de *B. pseudobassiana*.

Para comprobar que la cepa EABpb de *B. pseudobassiana* no había perdido virulencia desde los ensayos realizados por Alvarez-Baz et al., (2015), se llevaron a cabo otros dos tratamientos, fuera del diseño factorial, utilizando el mismo sistema de inoculación que estos autores:

- Inmersión *B. pseudobassiana* 10⁹ (IB9): inoculación de los individuos por inmersión en una formulación de *B. pseudobassiana* 1·10⁹ en talco.
- Inmersión *B. pseudobassiana* 10¹⁰ (IB10): inoculación de los individuos por inmersión en una formulación de *B. pseudobassiana* de 1·10¹⁰ conidios · gramo⁻¹.

Los tratamientos por autoinoculación se aplicaron haciendo pasar a cada individuo de *M. galloprovincialis* a través del dispositivo de autoinfección. Los individuos fueron pesados antes y después del tratamiento para cuantificar la cantidad de inóculo adquirido durante el tratamiento. Por cada tratamiento se utilizaron 20 repeticiones (insectos). Todo el protocolo de inoculación se realizó en la cámara de flujo laminar, que fue desinfectada con alcohol tras cada tratamiento. Una vez tratados, los insectos fueron mantenidos individualmente en botes de vidrio de 1 litro junto con ramillas frescas de pino silvestre hasta el final del ensayo. Los insectos se inspeccionaron diariamente durante 21 días. En cada inspección se determinó si los insectos estaban vivos y vitales, vivos, pero sin vitalidad (parcial o totalmente inmovilizados, incapaces de desplazamiento efectivo) y muertos.

3.4 Análisis estadístico

Las variables respuesta medidas en los experimentos 1 y 2 son el número de individuos de las distintas especies capturadas (*M. galloprovincialis*, *T. formicarius*, *T. caerulea*, *S. buprestoides*, *B. novemmaculata*, *B. rustica* y *C. mariana*) en los botes principal y auxiliar. Estas se analizaron mediante un Análisis de la Varianza (Anova) usando un Modelo Lineal Generalizado para un diseño de bloques al azar. Las capturas medias se compararon mediante el test de Tukey, a un nivel de confianza del 95 %. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete R 3.3.3 (R Core Team, 2017), auxiliada con el software R-studio.

No se realizó análisis estadístico del experimento 3 debido a la existencia de solo 2 repeticiones.

En el experimento 4, las variables evaluadas fueron el tiempo transcurrido hasta la pérdida de vitalidad y hasta la muerte. Los datos de mortalidad se analizaron aplicando un modelo lineal generalizado (distribución = binomial; link = logit). Las comparaciones entre tratamientos se realizaron con el test χ^2 ($P < 0,05$) (JMP 8.0, 2008 SAS Institute Inc.). Se utilizó el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para comparar el tiempo promedio de supervivencia (TPS) y el tiempo promedio de vitalidad (TPV) (Kaplan y Meier, 1958), con el software BIM® SPSS® Statistics, v.24.

4 RESULTADOS

Experimento 1. Efectividad del dispositivo de autoliberación y reducción del impacto sobre especies no objetivo.

Los resultados obtenidos en el Experimento 1, donde se evaluó la efectividad del sistema de autoliberación y de escape de insectos no objetivo mediante mallas de dos luces diferentes, se recogen en la Tabla 4 y en las Figuras 19, 20 y 21.

En la Figura 19 se comparan las capturas medias por trampa de *M. galloprovincialis* obtenidas en cada uno de los 3 tratamientos. No se observaron diferencias significativas entre ellos, lo que indica que no se produjeron escapes de *M. galloprovincialis* a través de las mallas más abiertas del fondo del bote colector. En la Figura 20 puede observarse que prácticamente todos individuos capturados del longicornio abandonaron la trampa a través del dispositivo de autoliberación, y apenas unos pocos quedaron retenidos y no se autoliberaron ($0,21 \pm 0,19$ y $0,14 \pm 0,14$ capturas/trampa, en Malla Ancha y Malla Estrecha respectivamente) lo que indica que *M. galloprovincialis* es capaz de utilizar dicho dispositivo sin problema.

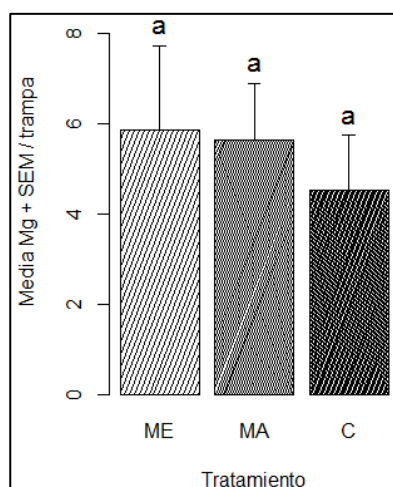


Figura 19. Media *M. galloprovincialis* capturados por trampa en el Experimento 1. ME: Malla de luz 4,8 mm (malla estrecha), MA: Malla de luz 6,0 mm (Malla Ancha), C: Control (bote colector con malla estándar). Medias seguidas de la misma letra no son diferentes significativamente, $p < 0.05$

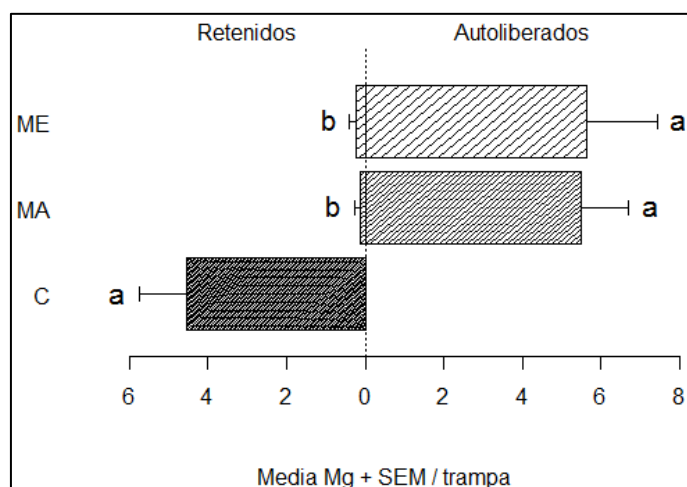


Figura 20. Media *M. galloprovincialis* capturados por trampa en el Experimento 1. Retenidos: individuos que permanecen en el bote colector. Autoliberados: individuos que escapan a través del dispositivo de autoliberación. ME: Malla de luz 4,8 mm (Malla Estrecha), MA: Malla de luz 6,0 mm (Malla Ancha), C: Control (malla estándar). No existen individuos autoliberados en el tratamiento Control. Medias seguidas de la misma letra no son diferentes significativamente, $p < 0.05$.

Se capturaron un total de 12 especies de coleópteros saproxílicos, de los gremios de depredadores (2), xilófagos (5) y saproxilófagos (5) (Bouget et al., 2005), pertenecientes a las familias Trogossitidae, Cleridae, Elateridae, Cerambycidae y Buprestidae, en cada

Control biológico del vector del nematodo de la madera del pino *Monochamus galloprovincialis* Olivier mediante autoinfección con el hongo entomopatógeno *Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber.

uno de los experimentos 1 y 2 (Tabla 3). De ellas, únicamente se analizaron aquellas que presentaron un número total de capturas superior a 20 en cualquiera de ambos ensayos.

Tabla 3. Capturas de coleópteros saproxílicos no objetivo en los experimentos 1 y 2. D (depredador), X (xilófagos), XF (xilofungívoros) y SX (saproxilófagos). Anchura máx.: se mide en la parte más ancha de los élitros. (Bouget et al , 2005; Etxebeste et al, 2013).

Familia	Género y especie Autor	Tipo ¹	Anchura máx. (mm)	Captura Exp.1 (05 jul-25 jul)	Captura Exp.2 (25 jul-10 oct)
Trogossitidae	<i>Temnochila caerulea</i> Olivier	D	3,0/5,0	318	208
Cleridae	<i>Thanasimus formicarius</i> L.	D	1,5/3,0	164	16
Elateridae	<i>Lacon punctatus</i> Herbst	SX	3,0/5,5	4	2
	<i>Stenagostus rufus</i> De Geer	SX	4,0/5,5	2	2
Cerambycidae	<i>Spondylus buprestoides</i> G.	SX	4,0/8,0	105	224
	<i>Acanthocinus aedilis</i> L.	SX	1,5/3,0	3	4
	<i>Arhopalus fesus</i> Mulsant	X	2,0/4,0	0	12
	<i>Hylotrupes bajulus</i> L.	SX	4,0/6,0	7	1
	<i>Xylotrechus arvicola</i> Olivier	X	3,0/4,0	1	0
Buprestidae	<i>Buprestis novemmaculata</i> L.	X	5,0/9,0	93	68
	<i>Buprestis rustica</i> L.	X	5,0/9,0	24	41
	<i>Chalcophora mariana</i> L.	X	9,0/11,0	64	42

En la Tabla 4 se pueden observar las capturas de los principales insectos no objetivo ocurridas en el experimento 1. Las trampas del tratamiento control retuvieron en su bote colector un apreciable número de insectos no objetivo ($17,90 \pm 4,65$ capturas/trampa), mientras que ningún insecto fue encontrado en los botes colectores de las trampas con fondo de malla más abierta. Aunque no fue registrado, gran número de estos insectos debieron escapar a través del fondo de malla, si bien algunos lo hicieron a través del dispositivo preparado para la autoliberación de *M. galloprovincialis* ($5,11 \pm 1,29$ y $5,04 \pm 1,32$ capturas/trampa, Malla Ancha y Malla Estrecha respectivamente) (Figura 22). Comparando con las capturas de los controles, se puede estimar que aproximadamente el 72 % de los insectos no objetivo se escaparon a través de las mallas preparadas a tal efecto, pero un 28 % se autoliberaron a través del dispositivo para *Monochamus*, de forma que serían infectados con el hongo entomopatógeno.

No se encontraron diferencias significativas entre ambos tipos de tratamientos, Malla Ancha de 6,0 mm de luz y Malla Estrecha de 4,8 mm, lo que muestra que cualquiera de ellas funciona adecuadamente como sistema de escape de insectos no objetivo de menor tamaño que *M. galloprovincialis*. Si se realiza un análisis por especie entre las principales capturas no objetivo, resulta destacable (Tabla 4) la reducción significativa de capturas de *S. buprestoides* y especialmente de los depredadores *T. caerulea*

(reducción del 96 % en el número de capturas de los tratamientos respecto al control) y *T. formicarius* (reducción del 67 %). Esta reducción indica que el sistema de escape es eficiente para las dos principales especies de depredadores del hábitat subcortical capturados. El resto de las especies no objetivo no mostraron diferencias significativas entre los 3 tratamientos, siendo el número de capturas por trampa bajo (entre $0,32 \pm 0,25$ y $1,39 \pm 0,59$).

Tabla 4. Media de individuos por trampa de cada una de las especies no objetivo capturadas en el tratamiento control, o que utilizaron el dispositivo de autoliberación para escapar en los tratamientos ME (Malla Estrecha) y MA (Malla Ancha) del experimento 1. Medias para cada especie seguidas de la misma letra no son diferentes significativamente, $p < 0,05$

Género y especie (Autor)	Control	Escapados a través de dispositivo (ME)	Escapados a través de dispositivo (MA)
<i>Buprestis novemmaculata</i> (L.)	0,82±0,55 a	1,39±0,69 a	1,11±0,69 a
<i>Buprestis rustica</i> (L.)	0,32±0,25 a	0,18±0,21 a	0,36±0,26 a
<i>Chalcophora mariana</i> (L.)	0,82±0,36 a	1,00±0,45 a	0,46±0,28 a
<i>Spondylus buprestoides</i> (Gressitt)	1,39±0,59 a	0,68±0,45 b	1,68±0,71 a
<i>Thanasimus formicarius</i> (L.)	3,43±1,42 a	1,14±0,53 b	1,29±0,49 b
<i>Temnochila caerulea</i> (Olivier)	10,8±4,04 a	0,43±0,24 b	0,14±0,17 b

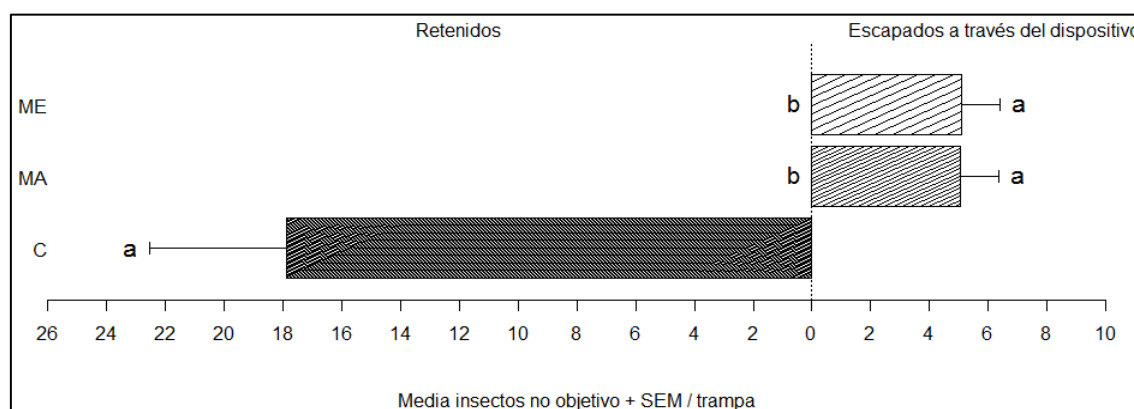


Figura 21. Media de individuos por trampa de todas las especies no objetivo capturadas en el tratamiento control, o que utilizaron el dispositivo de autoliberación para escapar en los tratamientos ME (Malla Estrecha) y MA (Malla Ancha) del experimento 1. Medias seguidas de la misma letra no son diferentes significativamente, $p < 0,05$.

Experimento 2. Aumento de la selectividad de la trampa frente a especies no objetivo.

Los resultados obtenidos en el Experimento 1, condujeron a tratar de mejorar la selectividad de la trampa, evitando que los individuos no objetivo que no podían escapar a través de la malla del fondo del bote colector no lo hiciesen a través del dispositivo de autoliberación de *M. galloprovincialis*. Para ello en el experimento 2 se testó la elevación de dicho dispositivo 1,0 cm por encima del fondo del bote colector, provisto de Malla Ancha (6,0 mm de luz).

En las Figuras 22 y 23 se recogen las capturas de *M. galloprovincialis* obtenidas en los tratamientos Control, Tubo Alto (TA, dispositivo 1 cm por encima del fondo) y Tubo Bajo (TB, dispositivo a ras del fondo). Nuevamente, no se encontraron diferencias significativas en las capturas de *M. galloprovincialis* entre los tratamientos (Figura 22). Como en el experimento anterior, puede deducirse que ninguno de los individuos del longicornio escapó a través de la malla de 6,0 mm de luz del fondo, y todos lo hicieron a través del dispositivo preparado para ello, sin diferencias entre el que estaba conectado al bote a ras de fondo (TB) o 1 cm por encima de él (TA) (Figura 23).

Por tanto, la malla empleada como selección mecánica que retiene a los individuos de *M. galloprovincialis* mientras permite escapar a insectos no objetivo es compatible con la captura de esta especie, que es también capaz de autoliberarse a través del dispositivo elevado ligeramente sobre el fondo del bote colector.

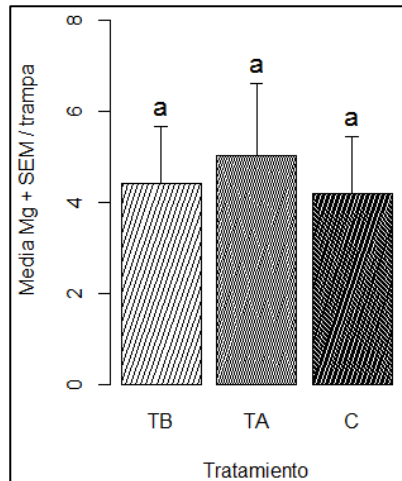


Figura 22. Media de *M. galloprovincialis* capturados por trampa en el Experimento 2. TA: Tubo Alto (conectado 1,0 cm por encima del fondo); TB: Tubo Bajo (conectado enrasado con el fondo); C: Control (bote colector estándar). Medias seguidas de la misma letra no son diferentes significativamente, $p < 0.05$

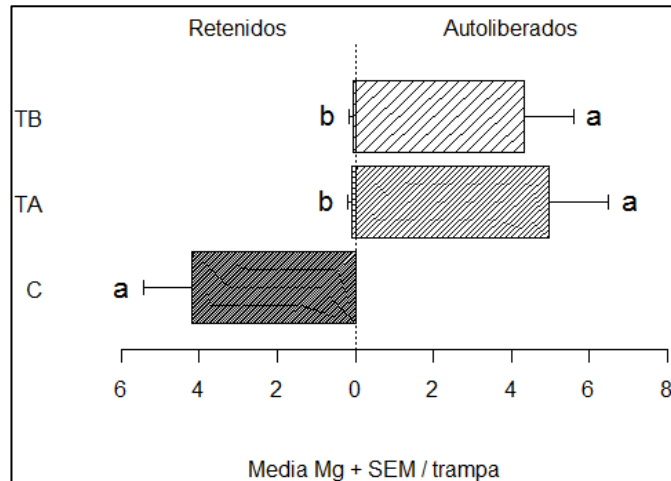


Figura 23. Media de *M. galloprovincialis* capturados por trampa en el Experimento 2. Retenidos: individuos que permanecen en el bote colector. Autoliberados: individuos que escapan a través del dispositivo de autoliberación. Tubo Alto (conectado 1,0 cm por encima del fondo); TB: Tubo Bajo (conectado enrasado con el fondo); C: Control (bote colector estándar). No existen individuos autoliberados en el tratamiento Control. Medias seguidas de la misma letra no son diferentes significativamente, $p < 0.05$.

Se observa que hubo una disminución del número total de individuos no objetivo capturados en todos los tratamientos (Tabla 3), comparado con el experimento 1 (785 frente a 620), excepto en dos especies. En la Figura 24 se observa que no se encontró ningún individuo retenido en los tratamientos con fondo de Malla Ancha, mientras que se observó una ligera reducción no significativa en el número de insectos que escaparon a través del dispositivo elevado (TA) comparado con el dispositivo bajo ($1,62 \pm 0,65$ en

TA frente a $2,12 \pm 0,84$ en TB de capturas medias/trampa). Esto indica que la elevación del dispositivo de autoliberación para *M. galloprovincialis* podría suponer una mejora en la selectividad del sistema la trampa evitando que otras especies escapasen a través de él, si bien los resultados no son concluyentes.

Si se analizan los resultados por cada una de las principales especies no objetivo (Tabla 5), se puede ver que hubo un menor número de capturas en cada una de ellas comparados con el experimento 1, pese a la mayor duración del experimento 2, excepto del cerambícido *S. buprestoides* que aumentó notablemente su número. Es destacable la reducción general en las capturas de los depredadores *T. formicarius* y *T. caerulea*. En cualquier caso, la elevación del dispositivo sólo supuso ligeras mejoras, no significativas, en las especies *B. novemmaculata* y *S. buprestoides*.

Tabla 5. Media de individuos por trampa de cada una de las especies no objetivo capturadas en el tratamiento control, o que utilizaron el dispositivo de autoliberación para escapar en los tratamientos TA: Tubo Alto (1,0 cm por encima del fondo) o TB: Tubo Bajo (enrasado con el fondo del experimento 2. Medias para cada especie seguidas de la misma letra no son diferentes significativamente, $p < 0,05$)

Género y especie (Autor)	Control	Escapados a través de dispositivo (TB)	Escapados a través de dispositivo (TA)
<i>Buprestis novemmaculata</i> (L.)	0,30±0,37 a	0,34±0,30 a	0,25±0,25 a
<i>Buprestis rustica</i> (L.)	0,14±0,16 a	0,23±0,26 a	0,14±0,13 a
<i>Chalcophora mariana</i> (L.)	0,21±0,19 a	0,21±0,21 a	0,13±0,13 a
<i>Spondylus buprestoides</i> (Gressitt)	0,82±0,38 a	1,26±0,54 a	0,83±0,37 a
<i>Thanasimus formicarius</i> (L.)	0,16±0,20 a	0,00±0,00 b	0,05±0,08 ab
<i>Temnochila caerulea</i> (Olivier)	2,60±2,25 a	0,05±0,08 b	0,05±0,08 b

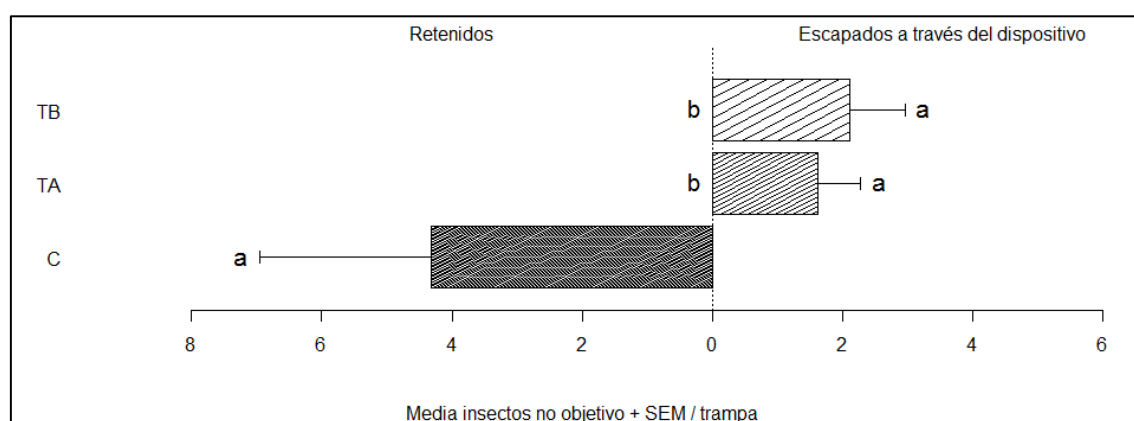


Figura 24. Media de individuos por trampa de todas las especies no objetivo capturadas en el tratamiento control, o que utilizaron el dispositivo de autoliberación TA: Tubo, TB: Tubo Bajo. Tratamientos con la misma letra no son diferentes, $p < 0,05$)

Experimento 3. Auto-infección en campo con polvo entomológico

En el experimento 3 se capturaron 86 individuos nativos de *M. galloprovincialis* en las dos trampas multiembudos estándar de la parcela, de los cuales 8 aparecieron “infectados” con polvo fluorescente (5 a través de dispositivo de autoinfección alto y 3 a través del dispositivo bajo), mientras que 78 aparecieron “no infectados” (Figura 25). De los 181 adultos liberados en la parcela, únicamente se capturaron 25 en las trampas estándar, 4 “infectados” (3 a través del Tubo alto y 1 a través del bajo) y 21 “no infectados”.

En ambos tipos de insectos caso los porcentajes de infección no fueron muy altos (9 % y 16 % respectivamente sobre los no infectados), pero hay que tener en cuenta que el registro de los infectados requería la doble captura de los individuos: primero para autoinfectarse al autoliberarse, y la segunda vez para ser registrados en las trampas control. Así, muchos adultos pudieron autoinfectarse pero luego no ser recapturados para ser contabilizados.

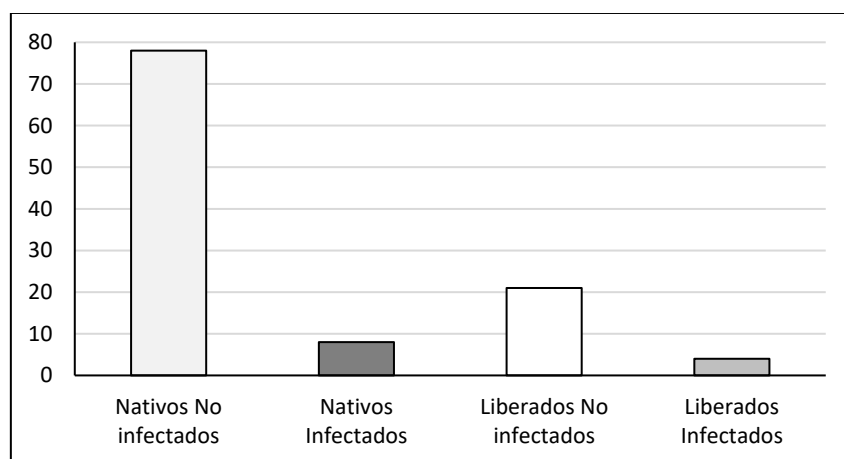


Figura 25. Número total de capturas de *Monochamus galloprovincialis* en el Experimento 3.

Este experimento se considera preliminar, ya que el pequeño tamaño del rodal no permitió su adecuada replicación (solo dos repeticiones) por lo que no se realizaron análisis estadísticos. Los resultados, sin embargo, apuntan a que el sistema de autoliberación/autoinfección utilizado (tubo ancho con fieltro de 3 mm) puede ser suficientemente eficaz para su uso operativo con la cepa de *B. pseudobassiana*.

Experimento 4. Infección de *Monochamus galloprovincialis* con *Beauveria pseudobassiana* en laboratorio a través de los dispositivos de autoinfección

Los individuos que transitaron por los dispositivos de autoinfección ensayados recogieron dosis de inóculo (o talco en los controles) que fueron significativamente diferentes (Tabla 6). Se observa que el dispositivo ancho (AG) fue el que menor cantidad de inóculo aportó (1,58-1,85 mg/insecto, 0,59-0,62 % del peso), comparado con el Estrecho (EF) (2,02-2,70 mg/insecto, 0,88-0,93 %). El tratamiento por inmersión (IB) aportó lógicamente la mayor cantidad de inóculo.

Tabla 6. Dosis de inóculo recogidas por los individuos de *M. galloprovincialis* al recorrer el dispositivo de autoinfección. Ver Material y Métodos para una descripción de los tratamientos. Medias seguidas de la misma letra no son diferentes significativamente, $p < 0.05$).

Tratamiento	Dosis media (mg/insecto)	Dosis/peso (%)
AGT	1,58 a	0,59
AGB9	1,85 a	0,62
AGB10	1,61 a	0,55
EFT	2,02 b	0,88
EFB9	2,69 b	0,93
EFB10	2,70 b	0,81
IB9	5,94	1,95
IB10	6,30	2,46

Los tratamientos por inmersión (*B. pseudobassiana* a $1 \cdot 10^9$ y a $1 \cdot 10^{10}$ conidios·g⁻¹) confirmaron la virulencia de la cepa, con un tiempo de supervivencia promedio de $6,75 \pm 0,41$ y $4,65 \pm 0,39$ días, respectivamente, similares al obtenido por Alvarez-Baz et al. (2015) con una concentración de $4,25 \cdot 10^9$ conidios·g⁻¹ (4,8 días).

Todos los tratamientos con *B. pseudobassiana* causaron la mortalidad completa de los insectos tratados, mientras que la mortalidad de los controles fue sólo la mitad y su tiempo de supervivencia fue significativamente mayor (Tabla 7). Hubo diferencias significativas en el tiempo medio de supervivencia de los individuos entre los tratamientos. Los insectos que se autoinfectaron con la dosis de *B. pseudobassiana* de $1 \cdot 10^{10}$ conidios·g⁻¹ sobrevivieron significativamente menos tiempo que los infectados con la dosis de $1 \cdot 10^9$ conidios·g⁻¹ y no hubo diferencias entre el dispositivo ancho (AG) o estrecho (EF) en esta dosis. Los insectos infectados por la dosis baja de *Beauveria* a través del dispositivo estrecho sobrevivieron significadamente menos tiempo que los infectados por esta dosis en el dispositivo ancho.

Control biológico del vector del nematodo de la madera del pino *Monochamus galloprovincialis* Olivier mediante autoinfección con el hongo entomopatógeno *Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber.

Tabla 7. Mortalidad y Tiempo Promedio de Supervivencia (TPS) para cada tratamiento de autoinfección con *B. pseudobassiana*. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí, ($P < 0,05$).

Tratamiento	Mortalidad (%)	Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier		
		TPS (media \pm SE)	Intervalo de confianza (95%)	
			Inferior	Superior
AGC	50 a	15,80 \pm 1,719 a	12,432	19,168
AGT	60 a	16,55 \pm 1,301 a	13,999	19,101
AGB9	100 b	12,15 \pm 0,871 b	10,442	13,858
AGB10	100 b	6,65 \pm 0,412 c	5,842	7,458
EFC	50 a	16,35 \pm 1,469 a	13,471	19,229
EFT	45 a	17,50 \pm 1,048 a	15,447	19,553
EFB9	100 b	8,85 \pm 0,689 d	7,499	10,201
EFB10	100 b	5,75 \pm 0,347 c	5,070	6,430

En la Figura 26 se recogen las funciones de supervivencia para cada uno de los tratamientos del ensayo. En la parte derecha del gráfico se observa un progresivo declinar de la supervivencia de los tratamientos control mientras que en los tratamientos con el hongo entomopatógeno a dosis mayor se produce un súbito descenso durante la primera semana postratamiento (izq. del gráfico) y en los de dosis menor ocurre de forma intermedia (parte central).

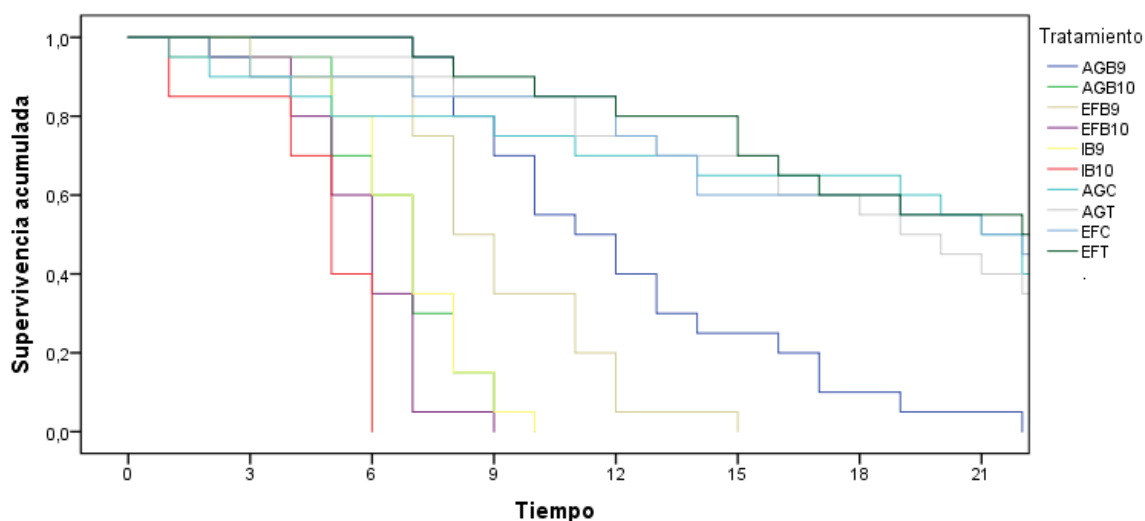


Figura 26. Funciones de supervivencia para cada tratamiento. Ver Material y métodos para una descripción de los tratamientos.

Las tácticas de autodiseminación se fundamentan en la transmisión horizontal y/o vertical de los individuos autoinfectados. Para ello se requiere no sólo que los individuos sobrevivan durante unos días, sino que también deben estar lo suficientemente vitales para desplazarse, aparearse y realizar la puesta en el caso de las hembras. Por tanto, se analizó el tiempo en el que los individuos tratados se encontraron lo suficientemente vitales como para realizar estos comportamientos (Tabla 8). Los resultados ofrecieron

las mismas diferencias que el análisis de supervivencia, si bien los tiempos medios de vitalidad fueron inferiores. Los individuos tratados con la dosis mayor de *B. pseudobassiana* estuvieron 2,7 (EF) o 3,1 (EG) días vitales, un tiempo que podría considerarse insuficiente para la autodiseminación. Por otro lado, los tratamientos con la dosis menor lograron TPV de 4,8 (EF) o 6,8 (AG) días, más acorde con los objetivos.

Tabla 8. Tiempo medio en el que los individuos tratados se muestran vitales (realizan movimientos con todos los artejos). ¹ TPV: Tiempo Promedio de Vitalidad limitado a 21 días. Los datos en misma columna con misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Tratamiento	Análisis de vitalidad (modificado de TPS Kaplan-Meier)			
	TPV (media \pm SE)	Intervalo de confianza (95%)		
		Inferior	Superior	
AGC	15,05 \pm 1,776	a	11,569	18,531
AGT	15,30 \pm 1,338	a	12,677	17,923
AGB9	6,80 \pm 0,462	b	5,894	7,706
AGB10	3,15 \pm 0,233	c	2,694	3,606
EFC	15,50 \pm 1,538	a	12,136	18,164
EFT	17,05 \pm 1,233	a	14,634	19,466
EFB9	4,85 \pm 0,350	d	4,164	5,536
EFB10	2,70 \pm 0,231	c	2,248	3,152

En la Figura 27 se relaciona la dosis de conidios por unidad de peso recibida por los individuos con el tiempo que permanecieron vitales, con capacidad de realizar un comportamiento normal, que permitiese la autodiseminación del entomopatógeno. Se observa una disminución exponencial del número de días vitales al aumentar la dosis recibida, hasta valores de cincuenta mil conidios/mg de peso de los individuos. Aumentos posteriores de esta dosis no supusieron reducciones apreciables del tiempo medio de vitalidad.

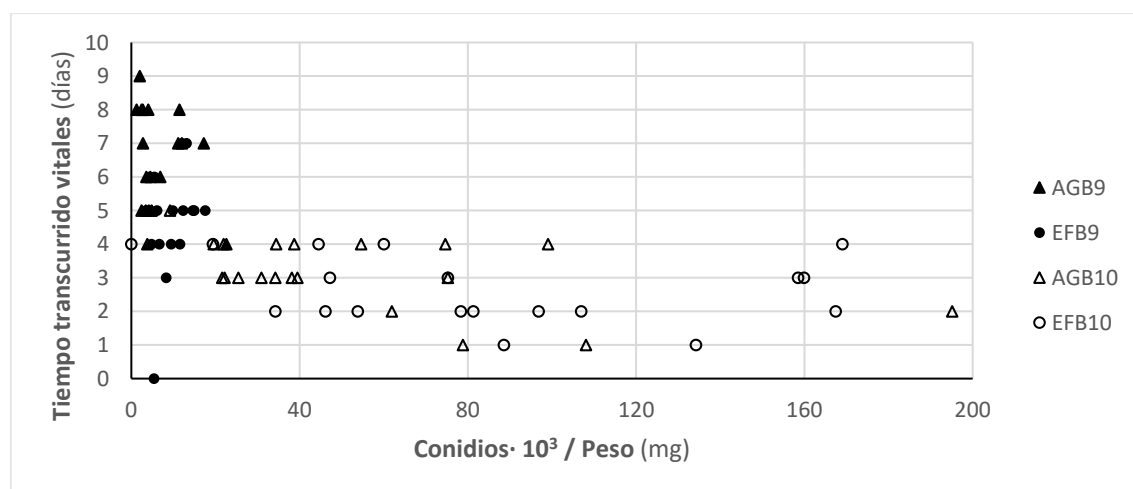


Figura 27. Relación entre tiempo en el que los individuos de *M. galloprovincialis* permanecen vitales y la dosis de conidios recibida por unidad de peso (mg).

5 DISCUSIÓN

Los resultados de los experimentos 1 y 2 demostraron el adecuado funcionamiento del sistema de autoliberación de *M. galloprovincialis*. Todos los adultos del longicornio fueron capaces de encontrar el acceso al dispositivo de autoliberación y hacer uso de él para salir del bote colector. Este dispositivo, formado por un tubo que se conecta enroscado a la pared externa del bote colector, es sencillo y fácil de aplicar una vez provisto el bote colector con el tapón roscado externo. Además, permite su rápida sustitución cuando sea necesaria la renovación del inóculo, ya que el dispositivo de autoliberación servirá también para la autoinfección.

La no selectividad de los componentes cairomonales del cebo atrayente causa la captura de insectos no objetivo que pueden resultar afectados por el método de “atrae e infecta”. Numerosos coleópteros saproxílicos de los gremios de xilófagos, saproxilófagos, xilofungívoros y depredadores (Bouget et al., 2005) responden a señales semioquímicas (las cairomonas del cebo atrayente) emitidas por los perforadores escolítidos, que en ocasiones actúan como fundadores del hábitat subcortical (Etxebeste et al., 2013). Estas especies no sólo resultan capturadas por las trampas y eliminadas de la masa forestal, problema que se está produciendo en la actualidad, sino que también podrían verse autoinfectadas por el hongo entomopatógeno que sería diseminado entre sus poblaciones.

Los experimentos 1 y 2 evaluaron también la efectividad del escape de estas especies no objetivo, a través de mallas de suficiente luz en el fondo del bote colector que les permitiese su paso a través pero que retuviesen a los *M. galloprovincialis* capturados. Este mecanismo se basa en el “filtrado” de aquellas especies que tienen menor tamaño que el longicornio. Ambas mallas ensayadas (4,8 mm y 6,0 mm de luz) resultaron bastante efectivas para el escape de insectos no objetivo, cuyas capturas se vieron reducidas a la cuarta parte en el experimento 1. Esta reducción se debió principalmente al escape de dos importantes especies como los depredadores *T. caerulea* y *T. formicarius* que han sido citados como importantes reguladores de poblaciones de plagas de escolítidos como *Ips sexdentatus* Boern (Pajares et al., 2008). Estos depredadores, claramente más pequeños, pudieron abandonar mayoritariamente la trampa por el fondo del bote. Ross y Daterman, (1998) y Martín et al., (2013) han mostrado también la efectividad de este tipo de mallas en la exclusión de depredadores de escolítidos en trampas multiembudos. Otras especies saproxílicas de tamaños mayores como los xilófagos *B. novemmaculata*, *B. rustica* y *C. mariana* y el xilofungívoro *S. buprestoides* no pudieron escapar a través de las mallas y abandonaron el bote a

través del dispositivo de autoliberación para *Monochamus*, lo que no resulta deseable. El intento de dificultar esta vía de escape, sin afectar a la autoliberación de la especie objetivo, mediante la elevación del dispositivo 1 cm sobre el fondo no obtuvo resultados concluyentes, ya que no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos tratamientos (TB frente a TA), si bien el número de capturas no objetivo fue ligeramente inferior en el tubo alto. No se encontraron diferencias apreciables entre ambas mallas, por lo que la malla de 6,0 mm de luz sería preferible ya que resultará probablemente más favorable al escape de las especies no objetivo. En cualquier caso, deberán proseguirse los estudios para aumentar la selectividad de la táctica, así como para conocer la virulencia de la cepa utilizada sobre las principales especies no objetivo.

El experimento 3 permitió comprobar que los dispositivos de autoinfección anchos con el fieltro ancho de 3 mm e inoculados con polvo entomológico, pueden resultar aptos como sistema de autoinfección. Ningún *Monochamus* se encontró retenido en los botes de las trampas de autoinfección, lo que indica que todos los insectos capturados en dichas trampas consiguieron autoliberarse a través de dicho dispositivo. Esto indica que los insectos no se verán frenados a atravesar el dispositivo de autoinfección por la presencia del inóculo formulado en polvo talco.

La cepa EABps de *B. pseudobassiana* mostró nuevamente su elevada virulencia sobre *M. galloprovincialis*. Si bien los adultos ensayados se encontraban ya próximos al final de su periodo vital, como lo indica la relativa alta mortalidad ocurrida en los controles, ambas dosis del entomopatógeno aplicadas mediante cualquiera de los dos dispositivos de autoinfección redujeron drásticamente y significativamente el tiempo de supervivencia de los individuos tratados.

En el experimento 4 se determinó que un dispositivo de autoinfección de menor diámetro interno aporta una cantidad de inóculo significativamente mayor por insecto, que un dispositivo de mayor diámetro. Esto se debe sin duda a que, al atravesar el dispositivo, el individuo contacta en mayor medida con la superficie inoculada, tanto en la zona ventral y extremidades, como en los élitros y antenas.

Entre los tres dispositivos testados, el EFB10 sería descartable, puesto que el número de días vitales de los individuos autoinfectados fue demasiado breve (2,7 días, Tabla 8) para permitir una transmisión horizontal en campo eficiente. El dispositivo AGB9 obtuvo un TPV quizá aceptable (6,8 días), pero aportó una cantidad de inóculo (1,85 mg/adulto, Tabla 6) que podría no ser suficiente para ser transmitido con eficacia a otros individuos. El dispositivo AGB10 obtuvo un TPV bastante breve (3,2 días) y la cantidad de inóculo recolectado fue también relativamente baja (1,6 mg/individuo). Finalmente, el

dispositivo de infección EFB9 estrecho con fieltro fino, inoculado con *B. pseudobassiana* a $1 \cdot 10^9$ conidios \cdot gramo⁻¹ obtuvo unos valores de tiempo de vitalidad (4,9 días), y cantidad de inóculo transmisible (2,7 mg/insecto) que le convierten en el candidato más idóneo para la continuación de los estudios.

Las tácticas de “atrae e infecta” resultan muy adecuadas para la aplicación de organismos entomopatógenos en áreas forestales (Klein y Lacey, 1999; Yasuda, 1999; Francardi et al., 2013). La disponibilidad de un sistema de trapeo (atrayente y trampa) altamente eficiente y un agente de control biológico muy virulento para *M. galloprovincialis* abre la oportunidad de desarrollar esta táctica de autodiseminación para el control de las poblaciones de este vector, que pueden ser inoculadas atrayendo a los adultos a trampas específicamente preparadas para ello. Los resultados de este estudio permiten avanzar notablemente en el desarrollo de esta táctica para que pueda constituir finalmente una herramienta operativa para el manejo la enfermedad del marchitamiento del pino en zonas de alto riesgo.

6 CONCLUSIONES

Se ha avanzado notablemente en el desarrollado un sistema efectivo para la autodiseminación del hongo entomopatógeno *B. pseudobassiana* sobre las poblaciones del vector del Nematodo del Pino *M. galloprovincialis*.

- El sistema de autoliberación de *M. galloprovincialis* a través de un tubo enroscado externamente al bote colector de las trampas multiembudos ha resultado exitoso. Este dispositivo supone un sistema sencillo, barato y fácil de recambiar, y adaptable a otro tipo de trampas recomendadas para la captura de *M. galloprovincialis*.
- El escape de los insectos no objetivo capturados a través de mallas de 6,0 mm en el fondo del bote colector ha resultado exitoso para las especies depredadoras *T. caerulea* y *T. formicarius*, mientras que debe mejorarse para otras especies de xilófagos de mayor tamaño.
- El dispositivo de autoliberación se ha transformado en un sistema efectivo de autoinfección mediante la aplicación en el interior del tubo de un fieltro inoculado con la formulación en talco del hongo entomopatógeno.
- Un dispositivo de autoinfección formado por un tubo de 2,7 cm de diámetro interior y 10 cm de longitud, con un forro de fieltro de 1,5 mm en el que se ha aplicado una formulación de *B. pseudobassiana* $1 \cdot 10^9$ conidios \cdot g⁻¹ en talco, permite la adecuada

Control biológico del vector del nematodo de la madera del pino *Monochamus galloprovincialis* Olivier mediante autoinfección con el hongo entomopatógeno *Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber.

supervivencia con vitalidad de los individuos de forma que podrían realizar una transmisión de inóculo entre los individuos de su especie.

Se deben continuar los estudios para determinar las condiciones de la transmisión horizontal y vertical y mejorar la selectividad del sistema.

Agradecimientos

Agradezco al laboratorio de Sanidad Vegetal perteneciente al Departamento de Producción Vegetal Sostenible de la Universidad de Valladolid todos los medios facilitados para llevar a cabo este trabajo, a Ana Ponce y Laura Ponce por su ayuda en los trabajos de campo y en el mantenimiento de los ejemplares de *Monochamus galloprovincialis*. A Sergio Galicia por sus aportes.

Mi gratitud a María Fernández Bravo y Enrique Quesada de la Universidad de Córdoba por la facilitación del inóculo infeccioso, al Servicio Territorial de Medio Ambiente de Segovia por las autorizaciones para el desarrollo de los ensayos de campo, al Centro de Sanidad Forestal de Calabazanos (Palencia) y a Gonzalo Álvarez por el apoyo logístico y la cesión de las fotos aportadas.

Agradezco en especial a mi tutor Juan Pajares por su dedicación.

Este trabajo ha sido financiado el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad a través del proyecto RTA2014-00042-C02-02. Durante el tiempo de realización del trabajo he estado financiado por el Plan de Contratación de personal para la promoción de empleo joven e implantación de la Garantía Juvenil I+D+i, del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

Referencias bibliográficas

- ABAD, P., TARES, S., BRUIGIER, N. y DEGUIRAN, G. 1991. Characterization of the relationships in the Pinewood Nematode Species complex (Pwnsc) (*Bursaphelenchus* Spp) using a Heterologous Unc-22 Dna Probe From *Caenorhabditis-Elegans*. *Parasitology*, vol. 102, pp. 303-308.
- AIKAWA, T. y TOGASHI, K., 1997. An effect of inoculum quantity of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) on the nematode load of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) in laboratory. *Japan. Jour. of Nematology*, vol. 27, pp. 14-21.
- AKBULUT, S. y STAMPS, W.T., 2012. Insect vectors of the pinewood nematode: A review of the biology and ecology of *Monochamus* species. *Forest Pathology*, vol. 42, no. 2, pp. 89-99.
- ALVAREZ-BAZ, G., FERNANDEZ-BRAVO, M., PAJARES, J. y QUESADA-MORAGA, E., 2015. Potential of native *Beauveria pseudobassiana* strain for biological control of Pine Wood Nematode vector *Monochamus galloprovincialis*. *J. of invertebrate pathology*, vol. 132, pp. 48-56.
- ALVAREZ, G., ETXEBESTE, I., GALLEGO, D., DAVID, G., BONIFACIO, L., JACTEL, H., SOUSA, E. y PAJARES, J.A., 2015. Optimization of traps for live trapping of Pine Wood Nematode vector *Monochamus galloprovincialis*. *Journal of Applied Entomology*, vol. 139, no. 8, pp. 618-626.
- ALVAREZ, G., GALLEGO, D., HALL, D.R., JACTEL, H. y PAJARES, J.A., 2016. Combining pheromone and kairomones for effective trapping of the pine sawyer beetle *Monochamus galloprovincialis*. *Journal of Applied Entomology*, vol. 140, no. 1-2, pp. 58-71.
- BOUGET, C., BRUSTEL, H. y NAGELEISEN, L.M., 2005. Nomenclature des groupes écologiques d'insectes liés au bois: Synthèse et mise au point sémantique. *Comptes Rendus - Biologies*, vol. 328, no. 10-11, pp. 936-948.
- BRAASCH, H., 2001. *Bursaphelenchus* species in conifers in Europe: distribution and morphological relationships. *EPPO Bulletin*, vol. 31, no. 1 982, pp. 127-142.
- BRAASCH, H. y SCHÖNFELD, U., 2015. Improved morphological key to the species of the *xylophilus* group of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937. *EPPO Bulletin*, vol. 45, no. 1, pp. 73-80.
- CABI (CENTRE FOR AGRICULTURE AND BIOSCIENCE INTERNATIONAL), 2004. *Bursaphelenchus xylophilus*. *EPPO Bulletin*, vol. 4, no. 1, pp. 61-69.
- CABI (CENTRE FOR AGRICULTURE AND BIOSCIENCE INTERNATIONAL), 2016. *Bursaphelenchus xylophilus* (pine wilt nematode). *Datasheet*.
- DEMBILIO, Ó., QUESADA-MORAGA, E., SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. y JACAS, J.A., 2010. Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 104, no. 3, pp. 214-221.
- DILLON, L.S. y DILLON, E.S., 1941. The tribe Monochamini in the western hemisphere (Coleoptera: Cerambycidae). *Reading Public Museum and Art Gallery*.

Control biológico del vector del nematodo de la madera del pino *Monochamus galloprovincialis* Olivier mediante autoinfección con el hongo entomopatógeno *Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber.

- DIRECCIÓN GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA DE LA JUNTA DE EXTREMADURA, 2017. RESOLUCIÓN de 5 de mayo de 2017, de la Dirección General de Agricultura y Ganadería, por la que se declara erradicado el foco del organismo nocivo *Bursaphelenchus xylophilus* (Steineret Buhner) Nickle et al. del término municipal de Valverde del Fresno y s. 2017.
- DROPKIN, V.H., FOUJIN, A., KONDO, E., LINIT, M., SMITH, M. y ROBBINS, K., 1981. Pinewood Nematode: A threat to U.S. Forests? *Plant Disease*, vol. 65, no. 12, pp. 1022.
- DWINELL, L.D., 1993. First report of Pinewood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) in Mexico. *Plant Disease*, vol. 77, no. 8.
- EPPO, 2016. EPPO A1 and A2 Lists of pest recommended for regulation as quarantine pests. Vol. 2, no. September.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE, 2014. Programa para la aplicación de la normativa fitosanitaria relativa al NMP (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Plan Nacional de Contingencia de Bursaphelenchus xylophilus*, pp. 1-38. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/Programa_para_la_aplicación_de_la_normativa_fitosanitaria_relativa_al_NMP_Jul_2014_tcm7-338939.pdf.
- ETXEBESTE, I., LENCINA, J.L. y PAJARES, J., 2013. Saproxylic community, guild and species responses to varying pheromone components of a pine bark beetle. *Bulletin of entomological research*, vol. 103, no. 5, pp. 497-510.
- ETXEBESTE, I., SANCHEZ-HUSILLOS, E., ÁLVAREZ, G., MAS I GISBERT, H. y PAJARES, J., 2016. Dispersal of *Monochamus galloprovincialis* (Col.: Cerambycidae) as recorded by mark–release–recapture using pheromone traps. *Journal of Applied Entomology*, vol. 140, no. 7, pp. 485-499.
- EUFORGEN, 2017. European Forest Genetic Resources Programme. Disponible en: <http://www.euforgen.org/>.
- EVANS, H.F., MCNAMARA, D.G., BRAASCH, H., CHADOEUF, J. y MAGNUSSON, C., 1996. Pest Risk Analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, vol. 26, pp. 199-249.
- FIRMINO, P.N., CALVÃO, T., AYRES, M.P. y PIMENTEL, C.S., 2017. *Monochamus galloprovincialis* and *Bursaphelenchus xylophilus* life history in an area severely affected by pine wilt disease: Implications for forest management. *Forest Ecology and Management*, vol. 389, pp. 105-115.
- FRANCARDI, V., BENVENUTI, C., BARZANTI, G. y ROVERSI, P., 2013. Autocontamination trap with entomopathogenic fungi: a possible strategy in the control of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier)(Coleoptera Curculionidae). *Redia*, vol. 96, no. October, pp. 57-67.
- FUKUDA, L., FUKUDA, K., HOGETSU, T. y SUZUKI, K., 1992. Cavitation and Cytological Changes in Xylem of Pine Seedlings Inoculated with Virulent and Avirulent Isolates of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*. *J. Jpn. For. Soc*, vol. 74, no. 4, pp. 289-299.

- FUTAI, K., 2013. Pine Wood Nematode. *An. Review of Phytopathology*, vol. 51, no. 1, pp. 61-83.
- GRUFFUDD, H.R., JENKINS, T.A.R. y EVANS, H.F., 2016. Using an evapo-transpiration model (ETpN) to predict the risk and expression of symptoms of pine wilt disease (PWD) across Europe. *Biological Invasions*, vol. 18, no. 10, pp. 2823-2840.
- HANKS, L.M., 1999. Influence of the larval host plant on reproductive strategies of cerambycid beetles. *Annual review of entomology*, vol. 44, pp. 483-505.
- HARA, N., TAKEUCHI, Y. y FUTAI, K., 2006. Cytological changes in ray parenchyma cells of seedlings of three pine species infected with the pine wilt disease. *Japanese Journal of Nematology*, vol. 36, no. 1, pp. 23-32.
- IBEAS, F., GALLEGO, D., DIEZ, J.J. y PAJARES, J.A., 2007. An operative kairomonal lure for managing pine sawyer beetle *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Applied Entomology*, vol. 131, no. 1, pp. 13-20.
- IBEAS, F., GEMENO, C., DÍEZ, J.J. y PAJARES, J.A., 2009. Female Recognition and Sexual Dimorphism of Cuticular Hydrocarbons in *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae). *An. of the Entomological Society of America*, vol. 102, no. 2, pp. 317-325.
- KAPLAN, E. L. y MEIER, P., 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, vol. 53, no. 282, pp. 457-481.
- KLEIN, M.G. y LACEY, L.A., 1999. An attractant trap for autodissemination of entomopathogenic fungi into populations of the japanese beetle *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biocontrol Science and Technology*, vol. 9, no. 2, pp. 151-158.
- KOBAKASHI, F., YAMANE, A. y IKEDA, T., 1984. The Japanese Pine Sawyer beetle as the vector of Pine Wilt Disease. *Annual review of entomology*, vol. 29, no. 29, pp. 115-135.
- KOUTROUMPA, F. a., VINCENT, B., ROUX-MORABITO, G., MARTIN, C. y LIEUTIER, F., 2008. Fecundity and larval development of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera Cerambycidae) in experimental breeding. *Annals of forest science*, vol. 65, no. 707, pp. 707p1-11.
- LI, H., 2008. *Identification and pathogenicity of Bursaphelenchus species (Nematode: Parasitaphelenchidae)*. Ghent University, Faculty of Bioscience Engineering.
- LINIT, M.J., 1988. Nematode-Vector relationships in the Pine Wilt Disease System. *Journal of nematology*, vol. 20, no. 2, pp. 227-235.
- LINIT, M.J., 1990. Transmission of pinewood nematode through feeding wounds of *Monochamus carolinensis* (Col.: Cerambycidae). *J. of nematology*, vol. 22, no. 2, pp. 231-6.
- LINSLEY, E.G., 1959. Ecology of Cerambycidae. *Annual review of entomology*, vol. 4, pp. 99-138.
- MAEHARA, N. y FUTAI, K., 1996. Factors affecting both the numbers of PWN carried by *Monochamus alternatus* an the nematode's life history. *Appl. Ent. Zool.*, vol. 3, pp. 443-452.

- MAEHARA, N., HE, X. y SHIMAZU, M., 2007. Maturation feeding and transmission of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) inoculated with *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J Econ Entomol*, vol. 100, no. 1, pp. 49-53.
- MAMIYA, Y., 1983. Pathology of the Pine Wilt Disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annual review of phytopathology*, vol. 21, pp. 201-20.
- MAMIYA, Y., ISHEBASHI, N., KONDO, E., KOBAKASHI, F., 1988. Current research on the major nematode problems in Japan. *Journal of nematology*, vol. 31, no. 1, pp. 184-190.
- MAMIYA, Y. y KIYOHARA, T., 1972. Description of *Bursaphelenchus lignicolus* N. Sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) from Pine Wood and histopathology of nematode-infested trees. *Nematologica*, vol. 18, pp. 120-124.
- MARTÍN, A., ETXEBESTE, I., PÉREZ, G., ÁLVAREZ, G., SÁNCHEZ, E. y PAJARES, J., 2013. Modified pheromone traps help reduce bycatch of bark-beetle natural enemies. *Agricultural and Forest Entomology*, vol. 15, no. 1, pp. 86-97.
- MAS I GISBERT, H., 2015. *Fenología y capacidad de dispersión de Monochamus galloprovincialis (Olivier 1795) en la península ibérica*. Tesis Doctoral, ETSI Montes, Universidad Politécnica.
- MOTA, M., BRAASCH, H., BRAVO, M.A., PENAS, A.C., BURGERMEISTER, W., METGE, K. y SOUSA, E., 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, vol. 1, no. December 2013, pp. 727-734.
- NAVES, P., CAMACHO, S., SOUSA, E. y QUARTAU, J., 2006. Entrance and Distribution of the Pinewood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus* on the body of its vector *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Entomol Gener*, vol. 29, no. 1, pp. 71-80.
- NAVES, P., KENIS, M. y SOUSA, E., 2005. Parasitoids associated with *Monochamus galloprovincialis* (Oliv.) (Coleoptera: Cerambycidae) within the pine wilt nematode-affected zone in Portugal. *Journal of Pest Science*, vol. 78, no. 2, pp. 57-62.
- NAVES, P.M., SOUSA, E. y RODRIGUES, J.M., 2008. Biology of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera, Cerambycidae) in the Pine Wilt Disease Affected Zone, Southern Portugal. *Silva Lusitana*, vol. 16, no. 2, pp. 133-148.
- NUNES DA SILVA, M., SOLLA, A., SAMPEDRO, L., ZAS, R. y VASCONCELOS, M.W., 2015. Susceptibility to the pinewood nematode (PWN) of four pine species involved in potential range expansion across Europe. *Tree Physiology*, vol. 35, no. 9, pp. 987-999.
- OHTA, S., HINATA, Y., YAMASHITA, M., KAWASAKI, I., SHOJI, T., YOSHIKAWA, H. y OBANA, Y., 1994. Synthetic approaches to 3-amino-1,4-naphthoquinone-2-carboxylic acid derivatives and photochemical synthesis of novel 1,4,5,10-tetrahydro-5,10-dioxo-2H-naphth[2,3-d][1,3]oxazine derivatives. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, vol. 42, no. 6, pp. 1185-90.
- PAJARES, J.A., ALVAREZ, G., HALL, D.R., IBARRA, N., HOCH, G., HALBIG, P., COCO, D., JOHANSSON, H. y SCHROEDER, M., 2016. Attractants for management of the pine sawyer beetle

Control biológico del vector del nematodo de la madera del pino *Monochamus galloprovincialis* Olivier mediante autoinfección con el hongo entomopatógeno *Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber.

Monochamus sutor, a potential vector of *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Applied Entomology*, vol. 149, pp. 118-127.

- PAJARES, J.A., ALVAREZ, G., HALL, D.R., DOUGLAS, P., CENTENO, F., IBARRA, N., SCHROEDER, M., TEALE, S.A., WANG, Z., YAN, S., MILLAR, J.G. y HANKS, L.M., 2013. 2-(Undecyloxy)-ethanol is a major component of the male-produced aggregation pheromone of *Monochamus sutor*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 149, no. 2, pp. 118-127.
- PAJARES, J.A., ALVAREZ, G., IBEAS, F., GALLEGO, D., HALL, D.R. y FARMAN, D.I., 2010. Identification and field activity of a male-produced aggregation pheromone in the Pine Sawyer Beetle, *Monochamus galloprovincialis*. *Journal of chemical ecology*, vol. 36, no. 6, pp. 570-583.
- PAJARES, J.A., IBEAS, F. y GALLEGO, D., 2004. Attractive responses by *Monochamus galloprovincialis* (Col.: Cerambycidae) to host and bark beetle semiochemicals. *Journal of Applied Entomology*, vol. 128, pp. 633-638.
- PERSHING, J.C. y LINIT, M. J., 1986. Biology of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae) on Scotch Pine in Missouri. *Journal of the Kansas Entomological Society*, vol. 59, no. 4, pp. 706-711.
- PIMENTEL, C.S., GONCALVES, E. V., FIRMINO, P.N., CALVAO, T., FONSECA, L., ABRANTES, I., CORREIA, O. y MAGUAS, C., 2016. Differences in constitutive and inducible defences in pine species determining susceptibility to pinewood nematode. *Plant Pathology*, pp. 131-139.
- ROSS, D.W. y DATERMAN, D.E., 1998. Pheromone-baited traps *Dendroctonus pseudotsugae* (Col.: Scolytidae): Influenced of selected release rates and traps designs. *Jour. Econ. Entom.*, vol. 91, pp. 500-506.
- RUTHERFORD, T. a y WEBSTER, J.M., 1987. Distribution of pine wilt disease with respect to temperature in North America, Japan, and Europe. *Canadian Journal of Forest Research*, vol. 17, no. 9, pp. 1050-1059.
- RYSS, A., VIEIRA, P., MOTA, M. y KULINICH, O., 2005. A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. *Nematology*, vol. 7, no. 3, pp. 393-458.
- SANCHEZ-HUSILLOS, E., ETXEBESTE, I. y PAJARES, J., 2015. Effectiveness of mass trapping in the reduction of *Monochamus galloprovincialis* Olivier (Col.: Cerambycidae) populations. *Journal of Applied Entomology*, vol. 139, no. 10, pp. 747-758.
- SANCHEZ-HUSILLOS, E., ETXEBESTE, I. y PAJARES, J., 2016. Physiological development and dispersal ability of newly emerged *Monochamus galloprovincialis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, vol. 161, no. 2, pp. 141-151.
- SENEVIRATNE, S.I., LÜTHI, D., LITSCHI, M. y SCHÄR, C., 2006. Land-atmosphere coupling and climate change in Europe. *Nature*, vol. 443, no. 7108, pp. 205-209.
- SHAH, P.A. y PELL, J.K., 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 61, no. 5-6, pp. 413-423.

- SHIMAZU, M., 2004. A novel technique to inoculate conidia of entomopathogenic fungi and its application for investigation of susceptibility of the Japanese pine sawyer, *M. alternatus*, to *Beauveria bassiana*. *Applied Entomology and Zoology*, vol. 39, no. 3, pp. 485-490.
- SHIMAZU, M. y SATO, H., 2003. Effects of larval age on mortality of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) after application of nonwoven fabric strips with *Beauveria bassiana*. *Applied Entomology and Zoology*, vol. 38, no. 1, pp. 1-5.
- SHIMAZU, M., TSUCHIYA, D., SATO, H. y KUSHIDA, T., 1995. Microbial control of *M. alternatus* by application of Nonwoven fabric strips with *B. bassiana* on infested tree trunks. *Applied Entomology and Zoology*, vol. 30, pp. 207-2013.
- SHIN, S.-C., PARK, I.-K., CHOI, I.-H., PARK, J.-Y., KIM, C.-S., KIM, K.-H. y CHOI, K.-S., 2005. Nematicidal activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and cinnamon (*Cinnamomum verum*) oils against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Nematology*, vol. 7, no. 5, pp. 767-774.
- SOUSA, E., BRAVO, M.A., PIRES, J., NAVES, P., PENAS, A.C., BONIFÁCIO, L. y MOTA, M., 2001. *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Col.: Cerambycidae) in Portugal. *Nematology*, vol. 3, no. 1, pp. 89-91.
- TOMMINEN, J., HALIK, S. y BERGDAHL, D.R., 1991. Incubation temperature and time effects on Life Stages of *Bursaphelenchus xylophilus* in wood chips. *Journal of nematology*, vol. 23, no. 4, pp. 477-484.
- W. R. NICKLE, A. M. GOLDEN, Y. MAMIYA, P.W., 1981. On the taxonomy and morphology of the Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner 1934) Nickle 1970. *Journal of nematology*, vol. 13, no. 3, pp. 385-392.
- WARREN, J.E. y LINIT, M.J., 1993. Effect of *Monochamus carolinensis* on the Life History of the Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of nematology*, vol. 25, no. 4, pp. 703-9.
- WINGFIELD, M.J., 1983. Transmission of PWN to cut timber and girdled trees. *Plant Disease*, vol. 67, pp. 35-37.
- YASUDA, K., 1999. Auto-infection system for the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae) with entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* using a modified sex pheromone trap in the field. *Applied Entomology and Zoology*, vol. 34, no. 2, pp. 501-505.
- ZAMORA, P., RODRÍGUEZ, V., RENEDO, F., SANZ, A., DOMÍNGUEZ, J., PÉREZ-ESCOLAR, G., MIRANDA, J., ÁLVAREZ, B., GONZÁLEZ-CASAS, A. y MAYOR, E., 2015. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* causing pine wilt disease on *Pinus radiata* in Spain. *Plant Disease*, vol. 599, no. 10, pp. 1449-1449.
- ZHAO, L., MOTA, M., VIEIRA, P., BUTCHER, R.A. y SUN, J., 2014. Interspecific communication between pinewood nematode, its insect vector, and associated microbes. *Trends in Parasitology*, vol. 30, no. 6, pp. 299-308.