

Desarrollo de un método de semicampo para el estudio de los efectos secundarios de los productos fitosanitarios sobre el parasitoide *Opius concolor* Szèpligetì

M. GONZÁLEZ, F. BAHENA y E. VIÑUELA

Se describe un método de semicampo para medir los efectos secundarios de los productos fitosanitarios en el parasitoide *Opius concolor* Szèpligetì, basado en las directrices de la Organización Internacional para la Lucha Biológica (OILB). Como unidades experimentales se utilizan pequeños plantones de olivo que se pulverizan hasta el punto de goteo con la dosis máxima recomendada de los plaguicidas a estudiar, y se encierra su parte aérea en una caja especialmente diseñada para este fin. Posteriormente se libera en su interior 30 hembras de menos de un día de edad provistas de comida y agua. El efecto se evalúa mediante la obtención de la longevidad media de los insectos en cada caja.

M. GONZÁLEZ, F. BAHENA y E. VIÑUELA: Protección de Cultivos, E.T.S.I. Agrónomos, 28040-Madrid

Palabras clave: *Opius concolor*, *Bactrocera oleae*, efectos secundarios, ensayos de semicampo, olivo.

INTRODUCCIÓN

La defensa fitosanitaria del olivar en nuestro país ha venido estando basada casi exclusivamente en la utilización de productos químicos. No obstante, en los últimos años, la necesidad de reducir la cantidad de aplicaciones ha hecho que aparezcan tentativas de poner en práctica estrategias de control integrado en la olivicultura (ALVARADO *et al.*, 1997).

Según DELRÍO (1995) el olivar se presta bastante bien a una gestión integrada (IPM), la cual debe estar centrada en el control de la mosca del olivo *Bactrocera oleae* (Gmelin), que es una de sus plagas más importantes. La utilización del parasitoide *Opius concolor* Szèpligetì para el control biológico de dicha plaga viene siendo postulada casi desde su descubrimiento a principios de siglo. Procedente del norte de África este hi-

menóptero ha sido establecido con éxito en diversas zonas del mediterráneo (Sicilia, Creta, Cerdeña, etc.) (MONASTERO, 1967; MICHELAKIS, 1986). En otras áreas de clima más continental, característica de gran parte de los olivares, donde la aclimatación del parasitoide no es tan buena (GONZÁLEZ *et al.*, 1996), se obtienen buenos resultados con liberaciones inundativas en la época estival y otoñal de individuos criados en biofábricas (JIMÉNEZ *et al.*, 1990).

Como los programas de IPM combinan el uso del agente biológico con la aplicación de tratamientos químicos, es necesario conocer los efectos que tienen los productos fitosanitarios utilizables en el olivar sobre dicho parasitoide (JACAS *et al.*, 1992).

En este sentido, siguiendo las directrices del grupo de trabajo de la Organización Internacional para la Lucha Biológica (OILB) *Plaguicidas y Organismos Beneficiosos*

para los estudios de efectos secundarios sobre la fauna útil, se puso a punto un método normalizado para el estudio de dichos efectos en laboratorio (JACAS y VIÑUELA, 1994a) y se evaluaron gran número de plaguicidas sobre los adultos del enemigo (JACAS *et al.*, 1992; JACAS y VIÑUELA, 1994b; STERK *et al.*, 1998). El siguiente paso, según el esquema secuencial propuesto por el mencionado grupo de trabajo, son los ensayos de semicampo (HASSAN *et al.*, 1985; SAMSØE-PETERSEN, 1990; HASSAN, 1994).

En el presente trabajo se describe el método diseñado en nuestra Unidad para realizar estos ensayos de semicampo con el parasitoide *O. concolor*.

REQUERIMIENTOS DE LOS ENSAYOS

En este tipo de ensayos se expone la especie útil a los productos que no resultaron inocuos en ensayos de laboratorio. Dicha exposición debe realizarse bajo ciertas directrices (SAMSØE-PETERSEN, 1990; HASSAN, 1994): Plantas pulverizadas hasta el punto de goteo con la dosis máxima recomendada en campo y los testigos con agua destilada; exposición de los organismos al residuo reciente y seco del producto, bajo condiciones de campo; uso de organismos de laboratorio y de edad uniforme; insectos provistos de comida o presa colocadas cerca del centro del follaje tratado; y un adecuado

período de exposición antes de evaluar el efecto.

De acuerdo con la magnitud del efecto observado, la OILB establece una escala que sirve para encuadrar cada producto en una categoría de toxicidad definida por un número del 1 al 4 (fig. 1): 1 = inocuo, 2 = ligeramente tóxico, 3 = moderadamente tóxico y 4 = tóxico (HASSAN, 1994).

MATERIAL DE ENSAYO

Material vegetal

Se utilizan plántulas de olivo de la variedad «Cornicabra» de tres años de edad cuyos brotes han sido despuntados regularmente para obtener un follaje lo más tupido y homogéneo posible y de una altura uniforme de 50-55 cm. Estos pequeños olivos están plantados en contenedores de plástico de 10 l de capacidad y a cada uno se le coloca un gotero para el suministro del agua de riego necesaria.

Insectos

En cada unidad experimental (planta de olivo) se sueltan 30 hembras de menos de un día de edad del parasitoide *O. concolor*. Estos parasitoides son criados en el laboratorio sobre el huésped alternativo *Ceratitis capitata* (Wiedemann) siguiendo el procedimiento descrito por JACAS y VIÑUELA (1994a). La cámara de cría donde se mantienen tanto el huésped como el parasitoide tiene una temperatura de 25 ± 2 °C, una humedad relativa de $75 \pm 5\%$ y el fotoperíodo es de 16:8 (L:O).

Las cajas de ensayo

La mayor dificultad que encontramos en la puesta a punto de este método fue lograr un diseño de caja que se ajustara a los requerimientos del ensayo.

Reducción	Categoría	Efecto
<25%	1	inocuo
25-50%	2	ligeramente tóxico
51-75%	3	moderadamente tóxico
>75%	4	tóxico

Fig. 1.—Escala de la OILB para clasificar los productos fitosanitarios según su efecto sobre los enemigos naturales en semicampo.

La caja debía ser ventilada, lo suficientemente abierta como para aproximar las condiciones de su interior a las de campo, pero a la vez lo suficientemente hermética como para que no escaparan unos insectos de tan reducido tamaño y además, voladores. Por otra parte la caja debía permitir el acceso fácil desde el exterior para manipular los insectos, remplazar la comida y los bebederos; y hacer posible el conteo de los insectos muertos sin necesidad de abrirla (fácil evaluación del efecto). Por supuesto, también debía tener suficiente resistencia a las condiciones exteriores y poderse construir con los limitados medios del laboratorio.

Después de sucesivas mejoras, la caja diseñada es la representada en la Figura 2.

Tiene 60 cm de altura y base cuadrada de 25 cm de lado. Su estructura y techo son de madera. Tres de sus paredes laterales son de tela de tul, una de las cuales lleva incorporada una manga (m) del mismo material, para acceder al interior, quedando cerrada mediante un nudo. La otra pared es una lámina de metacrilato que da la transparencia necesaria para la visualización de los insectos.

Anteriormente se habían probado cajas cuyas paredes eran todas de tela de tul pero se procedió a cambiar dicho diseño ya que la visualización de los insectos era muy difícil al no dar este material la transparencia necesaria. Por otro lado también se incorporó un techo de madera ya que con la lluvia

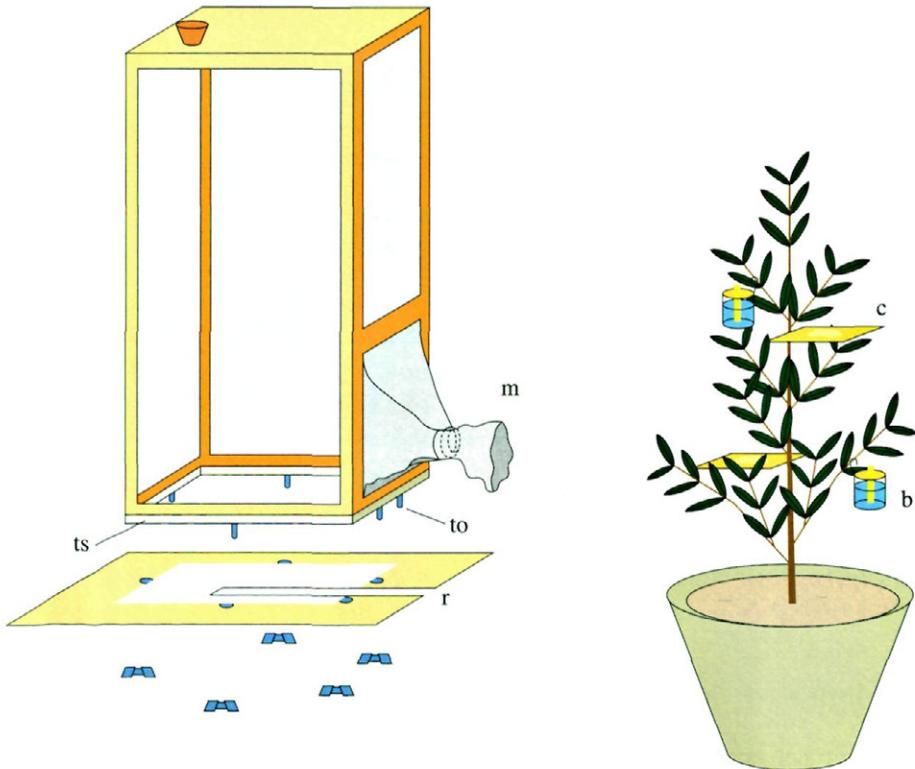


Fig. 2.—Material empleado en los ensayos de semicampo: caja de ensayo y plantón de olivo con los bebederos y dispensadores de alimento.

se producía la muerte prematura de los insectos, el lavado del residuo depositado en la planta y el deterioro del alimento.

El fondo de la caja es móvil, de madera, con una ranura (r) para ajustarse el tronco de la planta, que posteriormente se sella con masilla (Plastilina®). Este fondo se fija al resto de la caja mediante unos tornillos (to) empotrados en la estructura de ésta. Para cerrar cualquier resquicio entre la caja y el fondo, el marco de unión lleva pegadas unas tiras de burlete (Tesamoll®) (ts). En ensayos previos se había probado a cerrar la caja mediante cintas adhesivas de cierre automático (Velcro®) pero no resultó apropiado este material ya que se deformaba con las condiciones exteriores. La parte interior del fondo está pintada de blanco para que contrastase con el color de los insectos y así facilitar su conteo.

El confinar los insectos en la parte aérea de una pequeña planta ofrece ciertas ventajas importantes frente a otras alternativas posibles. Encerrar toda la planta en la caja de ensayo supondría ofrecer a los parasitoides un área excesiva de refugio y por otro lado sería muy difícil poder contar los individuos muertos sin abrir la caja. Otro método ampliamente utilizado, consistente en encerrar ramas de plantas adultas en cilindros de tela (JEPSON y MEAD-BRIGGS, 1992), presenta en nuestro caso el inconveniente de que habría que disponer en el lugar del ensayo de olivos adultos y por otra parte tampoco sería posible el control periódico de la mortalidad.

Con el diseño aquí descrito se recupera el total de los insectos. Éstos, cuando mueren, suelen caer sobre la base de la caja donde se cuentan con facilidad, a través de la pared de metacrilato (Figura 3).

PROCEDIMIENTO

Mediante un pulverizador manual se aplica sobre la parte aérea de los plantones de olivo la dosis máxima recomendada en campo de los productos a ensayar, hasta el

«punto de goteo». La aplicación se hace siguiendo las buenas prácticas agrícolas, que en el caso del olivo suponen usar el equivalente a 1.500 l/ha de agua. Con los testigos se procede de la misma forma pero utilizando agua destilada en la pulverización.

Una vez seco el residuo, se ajusta el fondo de la caja al tronco de la planta mediante la ranura «r» (ver Figura 2), sellando ésta bien con la ayuda de masilla (Plastilina®). Posteriormente, después de colocar los dispensadores de agua y comida en el interior del follaje de la planta, se procede a encerrar la parte aérea de ésta en la caja, ajustando el fondo mediante los tornillos «to».

Los bebederos consisten en pequeños recipientes de vidrio llenos de agua destilada y tapados mediante una lámina de plástico adhesivo (Parafilm®) en la que se abre un orificio por el que se introduce una tira de



Fig. 3.—Detalle de una caja de ensayo, en la que se aprecian algunos adultos de *O. concolor* muertos en el fondo

bayeta tipo Spontex® a modo de mecha (Figuras 2 y 3), según describen BUDIA y VIÑUELA (1996). Estos bebederos se cuelgan de ramitas de la planta con la ayuda de un alambre.

Los dispensadores de alimento consisten en unas porciones rectangulares de plástico rígido que se sujetan también a las ramitas y en ellos se pone la misma dieta que se utiliza para la cría (Figuras 2 y 3). En cada planta se colocan dos bebederos y dos dispensadores de alimento, remplazándolos cuando es necesario.

Por último se introducen en cada caja las treinta hembras del parasitoide recién emergidas. Se emplean 3 repeticiones para cada producto que se colocan distribuidas al azar, en líneas, sujetando las cajas a unas guías de alambre para evitar que fueran derribadas por el viento (Figura 4).

EVALUACIÓN DEL EFECTO

El parámetro utilizado para evaluar el efecto que tienen los productos fitosanitarios ensayados sobre el parasitoide es la **longevidad media** de los individuos encerrados en las cajas. El uso de este parámetro es controvertido porque la longevidad individual no suele distribuirse de forma normal, ya que la probabilidad de muerte de los diferentes grupos de edades de una población no es la misma. Por ello hay autores que consideran que no debería emplearse para comparaciones entre tratamientos (JERVIS y KIDD, 1996) aunque su uso es generalizado entre los investigadores que estudian los efectos secundarios de los plaguicidas en los enemigos naturales. En nuestras experiencias, tanto en laboratorio como en el desarrollo de este método de semicampo, hemos comprobado que utilizando como dato a analizar, no la longevidad individual, sino la media de cada grupo de insectos (unidad de ensayo), se cumple la condición de normalidad.

Uno de los problemas que se plantea, a la hora de medir el efecto sobre la longevidad



Fig. 4.—Vista general del ensayo de semicampo.

de los insectos, es definir el período de tiempo adecuado transcurrido el cual se realiza la evaluación, ya que éste sería distinto según que tipo de producto fitosanitario estemos ensayando. Muchos autores optan por evaluar el efecto de los plaguicidas a un intervalo fijo tras el tratamiento, como por ejemplo HELYER (1992) en las larvas de *Aphidoletes aphidimyza* (Rondani) (Diptera: Cecidomyiidae) que lo evalúa a las 24 y 48h, o LEWIS *et al.* (1992) en adultos de *Pterostichus melanarius* (L.) (Coleoptera: Carabidae) que lo hacen a las 3 horas, 1 día, 2 días y 6 días. Nosotros, para obtener una información lo más completa posible, hemos optado por evaluar la longevidad media, pues así la clasificación del producto se hará en función del efecto que produzca sobre el parasitoide a lo largo toda su vida.

Otro inconveniente de evaluar el efecto a través de la longevidad media, es que para su obtención es necesario un control periódico de la mortalidad y al tratarse de insectos voladores, el diseño de las cajas ha de ser tal que los individuos muertos se puedan contar sin necesidad de abrir las mismas.

Para la obtención de la longevidad media, se procederá al conteo periódico de los individuos muertos en cada caja, terminándose el ensayo con la muerte del último de los insectos.

Cuadro 1.-Longevidad media (días) en las cajas testigo de diferentes ensayos realizados en distintas épocas del año

Ensayo	Testigo 1	Testigo 2	Testigo 3	Testigo 4	Testigo 5	\bar{X}	s
Julio 96	38,3	37,8	37,5	37,4	38,6	37,9	0,5
Septiembre 96	37,7	37,2	37,6	37,0	38,0	37,5	0,4
Octubre 96	24,4	22,9	21,9	20,3	21,5	22,2	1,5
Septiembre 97	22,3	17,9	17,9	18,5	19,1	19,1	1,8
Octubre 97	16,5	15,4	14,7	15,1	15,5	15,4	0,7

Para verificar que el método era bueno, obtuvimos datos de longevidad media para diferentes testigos tratados sólo con agua y en diferentes épocas del año (Cuadro 1). Al igual que observó LIOTTA (1968), hay una variación de la longevidad media con las estaciones, pero ésta es bastante uniforme para los diferentes testigos de una misma época. Las diferencias se deben sin duda a las diferentes condiciones climáticas en que se realizaron los ensayos, pues para los tres últimos, que coincidieron con temperaturas nocturnas más bajas y con precipitaciones elevadas, la longevidad es claramente más reducida que en el resto. Por tanto, dado que la longevidad de *O. concolor* varía con las épocas del año, para que los resultados de los ensayos sean verdaderamente útiles hay autores que recomiendan se realicen únicamente entre mediados de primavera y finales de otoño, que es la época comprendida entre la recomendada para las primeras liberaciones de los parasitoides y el final de su acción de control en zonas continentales (GENDUSO, 1981; DELRIO, 1995).

Cuando realicemos un ensayo con varios plaguicidas, habrá que ver si existen diferencias significativas entre las longevidades de tratados y testigos, para lo cual realizaremos un análisis de varianza (ANOVA) ($P < 0,05$) usando el programa Statgraphics (STSC, 1987). De existir éstas, habrá que calcular el porcentaje de reducción de la longevidad respecto a los testigos, y clasificar el producto en una de las cuatro categorías de la OILB (Figura 1).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en parte, gracias al proyecto de la Comunidad de Madrid 06M/022/96 y a la Acción Integrada España-Alemania HA1996-0020 del Ministerio de Educación y Cultura de España. M. González realiza su Tesis Doctoral con el apoyo de una beca de la Consejería de Educación y Cultura de la Comunidad de Madrid y F. Bahena es becario del Instituto de Cooperación Iberoamericano (ICI).

ABSTRACT

GONZÁLEZ, M.; BAHENA, F. y VIÑUELA, E., 1998: A semi-field method to test side-effects of pesticides on the parasitoid *Opius concolor* Szèpligeti. *Bol. San. Veg. Plagas*, 24(4): 661-668.

A method to study the side-effects of pesticides on *Opius concolor* Szèpligeti, under semi-field conditions is described. Small olive trees are sprayed to the point of run-off with the highest field recommended doses of pesticides. When the residue is dried the aerial part of the plants is enclosed in a special cage designed for this purpose and thirty adult females less than one-day-old are introduced, as well as food and water. Effects of pesticides are evaluated by mean of the average longevity of the insects per cage.

Key words: *Opius concolor*, *Bactrocera oleae*, side-effects, semi-field tests, olive crop.

REFERENCIAS

- ALVARADO, M.; CIVANTOS, M. y DURÁN, J. M., 1997: Plagas. En: *El cultivo del olivo*. Barranco, D., D. Fernández-Escobar y L. Rallo (Eds): 401-459. Junta de Andalucía y Ediciones Mundiprensa. Madrid.
- BUDIA, F. y VIÑUELA, E., 1996: Effects of cyromazine on adult *Ceratitis capitata* on mortality and reproduction. *J. Econ. Entomol.* 89: 826-831.
- DEL RIO, G., 1995: Controllo integrato dei fitofagi dell'olivo. *Informatore Fitopatologico*, 12: 9-15.
- GENDUSO, P., 1981: Attuali conoscenze sulla lotta biologica contro la mosca delle olive amezzo di entomofagi. *Informatore Fitopatologico*, 31: 57-59.
- GONZÁLEZ, M.; JACAS, J.; JIMÉNEZ, A. y VIÑUELA, E., 1996: Optimización de la cría de *Opius concolor* Szèpl. mediante la utilización de bajas temperaturas durante su desarrollo preimaginal. *Bol. San. Veg. Plagas*. 22: 107-114.
- HASSAN, S. A., 1994: Activities of the IOBC/WPRS Working Group «Pesticides and Beneficial Organisms». *Bull. OILB SROP/IOBC WPRS Bull.* 17: 1-5.
- HASSAN, S. A.; BIGLER, F.; BLAISINGER, P.; BOGENSHÜTZ, H.; BRUN, J.; CHIVERTON, P.; DICKLER, E.; EASTERBROOK, M. A.; EDWARDS, P. J.; ENGLERT, W. D.; FIRTH, S. I.; HUANG, P.; INGLESFIELD, C.; KLINGAUF, F.; KÜHNER, C.; LEDIEU, M. S.; NATON, E.; OOMEN, P. A.; OVERMEER, W. P. J.; PLEVOETS, P.; REBOULET, J. N.; RIECKMANN, W.; SAMSØE-PETERSEN, L.; SHIRES, S. W.; STÄUBLI, A.; STEVENSON, J.; TUSET, J. J.; VANWETSINKEL, G. y VAN ZON, A. Q., 1985: Standard methods to test the side-effects of pesticides on natural enemies of insects and mites. *EPPO Bulletin* 15, 214-255.
- HELYER, N., 1992: Guidelines for the laboratory evaluation of pesticide against the aphid predatory midge *Aphidoletes aphidimyza* (Rondani). *Bull. OILB SROP/IOBC WPRS Bull.* 15: 96-99.
- JACAS, J. A.; VIÑUELA, E.; ADÁN, A.; BUDIA, F.; DEL ESTAL, P. y MARCO, V., 1992: Efectos secundarios de algunos plaguicidas utilizados en el olivar español sobre adultos de *Opius concolor* parasitoides de la mosca de la aceituna, *Bactrocera oleae*. *Bol. San. Veg. Plagas*, 18: 315-321.
- JACAS, J. y VIÑUELA, E., 1994a: Analysis of a method to test the effects of pesticides on adult females of *Opius concolor* Szèpl. (Hym., Braconidae), a parasitoid of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Dip., Tephritidae). *Bioc. Sci. Technol.* 4: 147-174.
- JACAS, J. y VIÑUELA, E., 1994b: Side-effects of pesticides on *Opius concolor* Szèpl., a parasitoid of the olive fruit fly. *IOBC Bulletin* 17: 143-146.
- JEPSON, P. y MEAD-BRIGGS, M., 1992: A discussion of methods used in semifield studies to evaluate pesticide toxicity to beneficial invertebrates. *Bull. OILB SROP/IOBC WPRS Bull.* 15: 4-17.
- JERVIS, M. y KIDD, N., 1996: *Insect natural enemies. Practical approaches to their study and evaluation*. London. 491 pp.
- JIMÉNEZ, A.; CASTILLO, E. y LORITE, P., 1990: Supervivencia del himenóptero braconídeo *Opius concolor* Szep. parásito de *Dacus oleae* Gmelin. en olivares de Jaén. *Bol. San. Veg. Plagas*, 16: 97-103.
- LEWIS, G. B.; BROWN, R. A.; EDWARDS, P. J. y CANNING, L. C., 1992: Laboratory test method for assessing the toxicity of pesticides to the ground beetle *Pterostichus melanarius* (L.). *Bull. OILB SROP/IOBC WPRS Bull.* 15: 110-115.
- LIOTTA, G., 1968: Osservazioni sulla durata media della vita dell'*Opius c. siculus* Mon. *Boll. Ist. Ent. Agr. e Oss. Fitop. Palermo*, 7: 159-170.
- MICHELAKIS, S. E., 1986: Parasitoids for the control of *Dacus oleae* in Crete. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 16: 389-393.
- MONASTERO, S., 1967: La prima grande applicazione di lotta biologica artificiale contro la mosca delle olive (*Dacus oleae* Gmel). *Boll. Ist. Ent. Agr. e Oss. Fitop. Palermo*, 7: 63-100.
- SAMSØE-PETERSEN, L., 1990: Sequences of standard methods to test effects of chemicals on terrestrial arthropods. *Ecotoxicological and Environmental Safety* 19, 310-319.

STERK, G.; HASSAN, S. A.; BAKKER, F.; BIGLER, F.; BOGENSCHÜTZ, H.; BOLLER, E.; BROMAND, B.; BRUN, J.; CALIS, J. N. M.; COREMANS-PELSENEER, J.; DUSO, C.; GARRIDO, A.; GROVE, A.; HEIMBACH, U.; HOKKANEN, H.; JACAS, J.; LEWIS, G.; MANSOUR, F.; MORETH, L.; POLGAR, L.; ROVESTI, L.; SAMSØE-PETERSEN, L.; SAUPHANOR, B.; STÄUBLI, A.; TUSET, J. J.; VAINIO, A.; VAN DE VEIRE, M.; VIGGIANI, G.; VIÑUELA, E. y VOGT, H., 1998: Results of the seventh joint pesti-

de testing programme carried out by the IOBC/WPRS-Working group «Pesticides and Beneficial Organisms». *Biocontrol* (in press).
STSC, 1987: *Statgraphics user's guide, version 5.0*. Graphic software system. STSC. Rockville. MD.

(Recepción: 15 enero 1998)

(Aceptación: 11 mayo 1998)