

## Método práctico de cría masiva de *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) en condiciones de laboratorio

HERRERA, María E., Carla V. DAGATTI & Violeta C. BECERRA

Estación Experimental Agropecuaria Mendoza INTA, San Martín 3853, C.P. 5507, Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina. E-mail: herrera.mariae@inta.gob.ar

### A practical rearing method for *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) under laboratory conditions

**ABSTRACT.** *Lobesia botrana* Den. & Schiff. is a quarantine pest in Argentina. It was recorded in Maipú, Mendoza, in 2010. The aim of this study was the mass production of *L. botrana*, setting up the duration of each stage and the mortality rate. The insect rearing was developed in a chamber at  $25 \pm 5$  °C, 30 - 50% RH, and 16:8 (L:D) photoperiod. Under the experimental conditions, the European grapevine moths' cycle, lasted from egg to adult death  $31.27 \pm 2.36$  days. The incubation period was  $2.82 \pm 0.14$  days; the larval stage lasted  $13.63 \pm 1.37$  days. The pupal stage lasted  $6.57 \pm 0.22$  days and the adults survived for  $8.25 \pm 0.64$  days. The mortality egg stage was 37%, followed by the larval stage 1 with 26.30%. The other stages showed a mortality rate of less than 2.5%. Under the described conditions, the moth mass-rearing is possible. The method allows to obtain all stages. The technique used makes the rearing procedures less expensive and less time-consuming.

**KEY WORDS.** Artificial rearing. Quarantine pest. Vineyard.

**RESUMEN.** *Lobesia botrana* Den. & Schiff. es plaga cuarentenaria de la Argentina. En el año 2010 se registró su aparición en Maipú, Mendoza. El estudio describe la técnica de cría de *L. botrana* sobre una dieta artificial. El objetivo fue producir de manera continua ejemplares de *L. botrana*, determinar la duración de cada etapa de desarrollo y el porcentaje de mortalidad de los estados del insecto. La cría se desarrolló en una cámara, con fotoperíodo 16:8 (L: O),  $25 \pm 5$  °C de temperatura y humedad entre 30 - 50%. El ciclo de la polilla europea, bajo las condiciones del insectario, tuvo una duración de huevo hasta la muerte del adulto de  $31,27 \pm 2,36$  días. El periodo de incubación de huevos fue  $2,82 \pm 0,14$  días; el estado larval duró  $13,63 \pm 1,37$  días. El estado pupal duró  $6,57 \pm 0,22$  días y los adultos sobrevivieron  $8,25 \pm 0,64$  días. La mortalidad de los huevos fue del 37%, seguida por la del estadio larval 1 con 26,30%. Los estadios restantes presentaron una mortalidad menor al 2,5%. Con las condiciones descriptas, es posible la cría en masa de *L. botrana*. El método permite obtener todos los estados, con conocimiento de la edad de los ejemplares y un mínimo de gasto de material y mano de obra.

**PALABRAS CLAVE.** Cría artificial. Plaga cuarentenaria. Vid.

### INTRODUCCIÓN

*Lobesia botrana* Den. & Schiff. "polilla del racimo" es una plaga cuarentenaria de la Argen-

tina. En febrero de 2010 fue declarada su presencia en el departamento de Maipú, Mendoza (SENASA, 2010). Debido al desconocimiento de su comportamiento, fue necesario realizar

estudios biológicos y bioensayos de la plaga en condiciones de laboratorio, por lo cual se tuvo que poner a punto un método de cría práctico, con el menor manipuleo de los insectos y por ende, el uso mínimo de mano de obra.

Varios Tortricidae fueron criados en laboratorio en condiciones controladas de temperatura entre 18 °C - 24 °C, humedad relativa entre 60% y 70% y fotoperíodo de 16:8 h L:O tales como *Grapholita molesta* (Busk) (Ivaldi Sender, 1974), *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Dickson *et al.*, 1952) y *Epiphyas postvittana* (Walker) (Pritam Singh, 1974). En la Argentina, Marín *et al.* (2006) criaron en laboratorio *G. molesta* para la realización de estudios bioetológicos. Turica (1951) crió *C. pomonella* sobre brotes de duraznero y sobre manzanas para obtener datos bioecológicos de la zona del Delta del Paraná. Laumann *et al.* (2000) pusieron a punto la cría de *C. pomonella*, a fin de evaluar en laboratorio a *Goniozus legneri* (Gordh) como controlador biológico. Aybar *et al.* (2011) criaron a *Mastrus ridibundus* (Gravenhorst) sobre larvas de *C. pomonella* para incorporarlo en un programa de manejo Integrado de plagas del nogal. Tortosa *et al.* (2014) evaluaron la eficacia de *Trichogramma cacoeciae* (Marchal) como parasitoide de huevo de *Cydia* sp.

Para la realización de diferentes bioensayos de control, o estudios bioecológicos se requiere un método de cría eficiente que proporcione insectos sanos, vigorosos y de manera sostenida en el tiempo. La bibliografía señala diferentes métodos, aunque muchos de los utilizados hasta el momento emplean sustratos de origen vegetal que no se encuentran disponibles a lo largo del año (Leonard & Doane, 1966).

Para el caso particular de *L. botrana*, se llevaron a cabo crías en diferentes ciudades europeas como Valencia (Coscollá, 1981; Coscollá *et al.*, 1986), Burdeos (Stockel *et al.*, 1989), Roma (Rapagnani *et al.*, 1989) y Thessaloniki (Savopoulou-Soultani & Stavridis, 1998) en las que, los autores mencionados realizaron crías de laboratorio sobre sustancias naturales. Rapagnani *et al.* (1989) mencionaron que las dietas utilizadas hasta ese momento eran a base de racimos florales, uvas y hojas de vid. Este material es lábil, de difícil manejo y presenta el inconveniente de que no se encuentra disponible durante todo el año. Otros autores han logrado sustituir la vid por otras plantas. Roehrich (1967) crió larvas de *L. botrana* sobre hojas de ligustro, lechuga,

coles y manzana. Las hojas posibilitaron una buena instalación de las larvas neonatas y las manzanas permitieron completar exitosamente el ciclo sin tener que ser renovadas. Luego Maison & Pergade (1967) pusieron a punto la técnica de cría sobre manzana, método utilizado posteriormente por Touzeau & Vonderheyd (1968) cuando desarrollaron las primeras trampas de feromona.

Posteriormente, se comenzaron a buscar sustratos alimenticios alternativos a los racimos, que hasta ese momento resultaban lábiles y que tenían que ser reemplazados en el transcurso del desarrollo larvario, además de no estar disponibles en todas las épocas del año. Moreau (1965) desarrolló este insecto sobre una dieta semisintética, utilizando hojas de vid, finamente trituradas y levadura de cerveza. Guennelon *et al.* (1970, 1975) y Tzanakakis & Savopoulou (1973) perfeccionaron una técnica de cría en medios artificiales gelificados para la cría de *L. botrana*, lo que representa un notable avance. Thiéry & Moreau (2005) compararon el desempeño de las larvas de *L. botrana* alimentadas sobre una dieta semisintética y hospedantes alternativos.

En el presente trabajo se describe la técnica de cría masiva de *L. botrana*, sobre una dieta artificial. Los ejemplares obtenidos sirven de material de base para diversas líneas de investigación que se llevan a cabo en la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA Mza INTA), las que requieren grandes cantidades de insectos de alta calidad, así como también, de sexo y edad conocida. El objetivo de este trabajo es producir de manera continua ejemplares de *L. botrana* en calidad y cantidad adecuadas para la ejecución de estudios bioecológicos y ensayos biológicos, determinar la duración de cada etapa de desarrollo del insecto y el porcentaje de mortalidad de cada estado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Pie de cría

Durante la temporada 2010-2011 se estableció el pie de cría a partir del material recolectado del área vitícola de la localidad de Cruz de Piedra (33°01'52"S; 68°46'34"O), Maipú, provincia de Mendoza. Se tomaron racimos infestados con ejemplares de *L. botrana* de diferentes estados, los cuales se llevaron al laboratorio

para que continuaran con su desarrollo y descartar así enfermedades o parasitismo. La cría se desarrolló en una cámara, bajo condiciones controladas de luz, con fotoperíodo 16:8 (L: O),  $25 \pm 5$  °C de temperatura y entre 30-50% HR, características de la zona.

La dieta que se utilizó en este estudio fue un desarrollo de Ferreira *et al.* (2003). En un recipiente apto para someter al calor se diluyó 10 g de agar en agua fría. Se calentó la mezcla hasta la ebullición, se retiró del fuego. Se agregó 3,20 g de ácido ascórbico, 1 g de ácido benzoico, 0,75 g de estreptomycin, 0,075 g de fumagilina, 31 g de germen de trigo, 32,50 g de harina de maíz, 32,50 g de levadura de cerveza y 1 g de metil hidroxibenzoato. Se mezcló con batidora eléctrica. Al final se incorporó el aceite de maíz, el alcohol etílico y el carbendazim 5% SC ( $C_9H_9N_3O_2$ ). El preparado obtenido se colocó en caliente en recipientes de plástico de 30 cm x 20 cm x 5 cm provistos de tapa hermética destinados a la cría, previamente esterilizados con alcohol 90°. Los mismos se conservaron refrigerados a una temperatura de aproximadamente 10 °C hasta su uso.

### Procedimiento de cría

#### Etapa adulto:

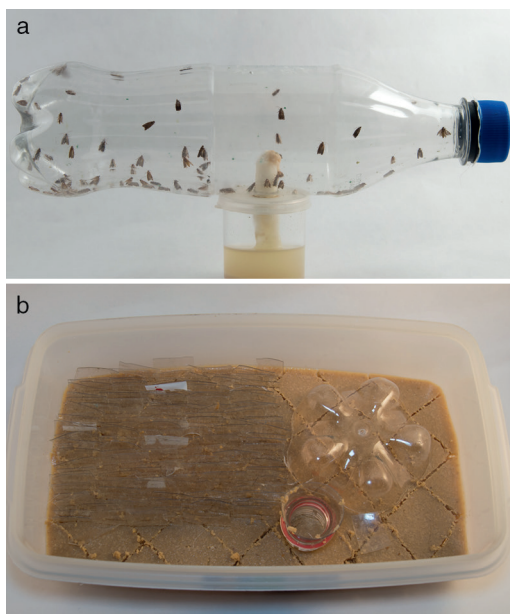
Los adultos de *L. botrana* se colocaron en la cámara de reproducción, que consistió en una botella de 2000 ml de PVC, provista de un bebedero con una solución de ácido ascórbico 5% como fuente de alimentación. Ahí se verificó la cópula y el plástico fue el sitio de oviposición (Fig. 1a).

#### Etapa de huevo - larva:

La botella con las posturas debió ser desinfectada. Se realizaron dos enjuagues con una solución de 500 ml de agua corriente y 12 cm<sup>3</sup> de hipoclorito de sodio, luego se enjuagó con agua corriente. Se realizó la inmersión durante 1 minuto en una solución de 500 cm<sup>3</sup> de agua corriente, 1 g de estreptomycin y 1 g de fumagilina. Se dejó secar al aire. Luego se recortó el PVC que contenía huevos. Se incrustaron los trozos de plástico sobre la dieta artificial. Previamente se realizó un reticulado sobre la superficie de la dieta, a fin de que las larvas emergentes se desplazaran hasta ubicarse en estas hendiduras. Las larvas permanecieron allí desde la eclosión de huevos y hasta completar su desarrollo larvario. (Fig. 1b).

#### Etapa de pupa - adulto:

Una vez alcanzado el estado de pupa, se ex-

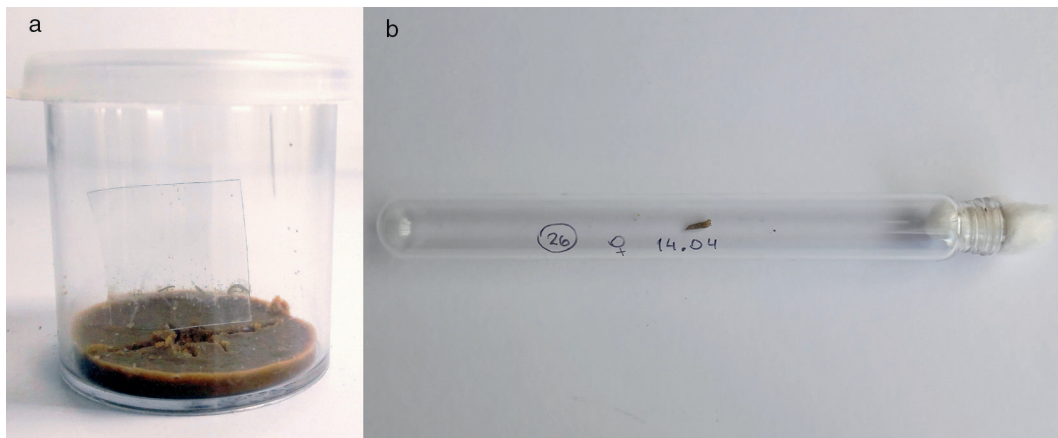


**Fig. 1.** a: Cámara de reproducción: botella de PVC, sitio de cópula y oviposición con bebedero. b: Recipiente con dieta artificial que contiene trozos de PVC con huevos de *L. botrana*. Las larvas emergentes se desplazan para alimentarse.

trajeron las crisálidas y se transfirieron a un recipiente esterilizado con alcohol 90° de 4 cm de diámetro por 4 cm de alto con tapa hermética, sin ningún soporte. Allí emergieron los adultos, quienes inician el ciclo nuevamente.

### Duración del ciclo y porcentaje de mortalidad de *L. botrana*

Se trabajó con 5 réplicas de 50 huevos de 24 h de edad. Cada postura se colocó individualmente en un recipiente esterilizado con alcohol 90° de 4 cm de diámetro por 4 cm de alto, con tapa hermética provisto de dieta artificial (Fig. 2a). Se realizó la observación y el registro diario a fin de determinar la duración media de cada fase de desarrollo. Se determinó el momento de eclosión de los huevos, la duración de cada fase larvaria, tomándose como criterio la pérdida de la cápsula cefálica para determinar la muda. Se verificó el momento de formación de las pupas, las que se extrajeron de la dieta y se colocaron individualmente en tubos de vidrio de 15 cm y 1 cm de diámetro cubierto con un tapón de algodón (Fig. 2b). El porcentaje de mortalidad de los huevos se calculó considerando el número de larvas de primer estadio emergidas del total de huevos de cada réplica. La



**Fig. 2.** a: Recipiente con dieta artificial y trozo de PVC con postura; b: Tubo con pupa.

mortalidad de cada estadio larval se determinó tomando el número de larvas de determinado estadio respecto del anterior para cada cohorte. La mortalidad de las pupas se estableció teniendo en cuenta el número de adultos obtenidos en relación al número de pupas formadas en cada réplica. Se registró el momento de emergencia y muerte de los adultos para el cálculo de la longevidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla I expone la duración de cada fase de desarrollo y los porcentajes de mortalidad de *L. botrana* obtenidos en las condiciones del insectario y con la dieta descrita.

Los resultados muestran que la duración media del ciclo de vida fue de  $31,27 \pm 2,34$  días,

**Tabla I.** Duración media en días ( $\pm$  error estándar) y porcentaje de mortalidad de los estados y estadios de *L. botrana* en laboratorio a  $25 \pm 5$  °C, 16:8 (L: O) y 30-50% HR.

Estados / Estadios del insecto	Duración media en días ( $\pm$ error estándar)	% Mortalidad ( $\pm$ error estándar)
Huevo	2,82 (0,14)	37 (4,3)
Larva 1	3,11 (0,19)	26,34 (4,6)
Larva 2	2,33 (0,19)	2,5 (1,2)
Larva 3	3,00 (0,35)	1,2 (1,1)
Larva 4	2,11 (0,25)	1,2 (0,5)
Larva 5	3,08 (0,37)	1,2 (1,1)
Pupa	6,57 (0,22)	1,2 (1,1)
Adulto	8,25 (0,63)	1,2 (1,1)

lo que difiere con lo observado por otros autores. Coscollá (1981) determinó en ejemplares alimentados sobre botones florales y racimos de vid que la duración media del ciclo de vida fue de 40 – 54 días. Savopoulou-Soultani & Stavridis (1998) comprobaron que larvas alimentadas sobre flores prolongaron esta fase durante 30 días. Thiéry & Moreau (2005) verificaron que ejemplares de *L. botrana* mantenidas sobre dieta semiartificial completaron su ciclo en 45,76 días.

El estado de huevo junto al estadio larval 1 de *L. botrana* presentan una elevada mortalidad, la cual desciende drásticamente en los estados subsiguientes (Tabla I). Esto coincide con lo observado por Guennelon *et al.* (1970), quienes determinaron que la mortalidad del estado de huevo ascendió al 87,9%, seguida por los primeros estadios larvales (35%). En tanto que Savopoulou-Soultani & Stavridis (1998) en su ensayo registraron una mortalidad larval del 70%. Thiéry & Moreau (2005) observaron que la mortalidad de los huevos fue del 18,1%, y la del estado larval del 30%.

## CONCLUSIONES

Los resultados indican que la metodología aplicada se ajustó a los objetivos propuestos, por lo tanto, la técnica de cría descrita en este trabajo, se considera adecuada para la producción masiva de *L. botrana*, siendo capaz de mantener el vigor adecuado de la colonia, la supervivencia del insecto, la reproducción y el comportamiento normal. Se logró la obtención de insectos sanos y con una producción sos-

tenida a lo largo del tiempo, requisito deseable para disponer de ellos en programas de investigación. Este método permite mantener la colonia de insectos desde larvas neonatas hasta el estado pupal, sin necesidad de cambiar de recipiente, ni reponer la dieta, evitando la manipulación de los ejemplares y reduciendo los riesgos de contaminación. Por lo tanto, puede concluirse que con las condiciones expuestas en el presente trabajo, es posible la cría en laboratorio de *L. botrana* con fines de investigación.

Ajustada la cría de *L. botrana*, resta establecer los parámetros biológicos de la plaga, a partir de tablas de vida desarrolladas en laboratorio, herramienta básica para elaborar estrategias de control.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Ing. Agr. Anahí Soto por las fotografías tomadas para este artículo.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Aybar, S., Sticca, F., Humana, A., Lescano, M., Delgado, I. & Pereyra Constan, V. (2011) Cría de "Carpocapsa" *Cydia pomonella* (L) (Tortricidae, Lepidoptero) En el departamento de Sanidad Vegetal, Dirección Provincial de Agricultura, Catamarca. *Biología en Agronomía*, **1**(1), 148-149.
- Coscollá, R. (1981) Algunas consideraciones sobre la dinámica poblacional de *Lobesia botrana* Den. & Schiff. en las comarcas vitícolas valencianas *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas*, **7**, 169-184.
- Coscollá, R., Sánchez, J. & Béltran, V. (1986) Estudio preliminar sobre mortalidad de huevos de *Lobesia botrana* Den. & Schiff. por efecto de altas temperaturas y bajas humedades relativas en laboratorio. *Boletín Sanidad Vegetal-Plagas*, **12**, 3-7.
- Dickson, R.C., Barnes, M.M. & Turzan, C.L. (1952) Continuous rearing of the codling moth. *Journal of Economic Entomology*, **45**, 66-68.
- Ferreira, A., Bastos, M. & Aguiar, A. (2003) Criação de traça da uva *Lobesia botrana* Den. y Schiff. En: *Actas do VI Encontro Nacional de Proteção Integrada, 2003*, Castelo Branco-Portugal. pp. 83-88.
- Guennelon, G., D'Arcier, E. & Trincal, J. (1975) Description d'une production massive de l' Eudemis de la vigne sur milieu artificiel *Lobesia botrana* Den. et Schiff. (Lepidoptera Tortricidae). *Annales de Zoologie, Ecologia Animal*, **7**(3), 295-309.
- Guennelon, G., Sender, C., D'Arcier, E. & Audemanrd, H. (1970) Mise au point d'un milieu artificiel pour l'élevage au laboratoire des larves de l' Eudemis de la vigne *Lobesia botrana* Den. et Schiff. (Lepidoptera Tortricidae). *Annales de Zoologie. Ecologia Animal*, **2**(1), 51-77.
- Ivaldi Sender, C. (1974) Techniques simples pour un élevage permanent de la tourdeuse orientale, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) sur milieu artificiel. *Annales Zoologie Ecologie Animale*, **6**(2), 337-343.
- Laumann, R.A., Ferrero, A.A. & Stadler, T. (2000) Evaluación en laboratorio de *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethyilidae) enemigo natural de *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) en cultivos de nogal de la provincia de Catamarca, República Argentina. *Boletín Sanidad Vegetal-Plagas*, **26**, 537-550.
- Leonard, D.E. & Doane, C. (1966) An artificial diet for gypsy moth *Porthetria dispar* (Lepidoptera Lymantridae). *Annals of the Entomological Society of America*, **59**, 462-464.
- Maison, P. & Pargade, P. (1967) La Piégage sexuel de l' Eudemis su service de l'Avertissement Agricole. *Phytoma*, **190**, 9-13.
- Marín, M.S., Sáez, C.C., Caballero, A.E. & Quercetti, M.J. (2006) *Grapholita molesta*. Caracterización de una Cría Artificial. *Revista Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo*, **38**(1), 7-12.
- Moreau, J.P. (1965) Comportement des vers de la grappe vis-à-vis de divers cépages et essais d'alimentation artificielle. *Revue de Zoologie Agricole et Appliquée*, **1**(3), 13-16.
- Rapagnani, M.R., Caffarelli, V. & Barlatattani, F.M. (1989) Descrizione de un allevamento, in laboratorio, della tignoletta dell'uva *Lobesia botrana* Den. et Schiff. (Lepidoptera - Tortricidae) su nuovo alimento semi sintetico. *Bollettino dell'Istituto di Entomologia "Guido Grandi" dell'Università di Bologna*, **44**, 57- 64.
- Roehrich, R. (1967) Élevage des Chenilles de l'Eudemis (*Lobesia botrana* Schiff.) sur des aliments naturels de remplacement. *Revue de Zoologie Agricole et Appliquée*, **66**, 111-115.
- Savopoulou-Soultani, M. & Stavridis, D.G. (1998) Larval performance and oviposition preference for known and potential hosts by *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *European Journal of Entomology*, **95**, 55-63.
- SENASA (2010) Resolución 122/2010 <http://www.senasa.gov.ar/normativas/resolucion-1222010> [Acceso: setiembre de 2016]
- Singh, P. (1974) Aseptic rearing of *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae) on a meridic diet. *New Zealand Journal of Zoology*, **1**(1), 111-117.
- Stockel, J., Roehrich, R., Carles, J.P. & Nadaud, A. (1989) Technique d'élevage pour l'obtention programmé d'adultes vierges d'eudémis. *Phytoma*, **412**, 45-47.
- Thiéry D. & Moreau, J. (2005) Relative performance of European grapevine moth (*Lobesia botrana*) on grapes and other hosts. *Oecologia*, **143**, 548-557.
- Tortosa, O.E., Carmona, A., Monje, J.C., Giardina, M., Manzano, P. & Martínez, E. (2014) Relevamiento y evaluación de parasitoides de huevo para el control de *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) y *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, **73**(3-4), 119-124.
- Touzeau, J & Vonderheyden, F. (1968) L'élevage semi-industriel des tordeuses de la grappe destinée au piégeage sexuel. *Phytoma*, **197**, 25-33.
- Turica, A. (1951) *Cydia (Laspeyresia) molesta* Busck. Datos bioecológicos para la zona del Delta del Paraná. *IDIA*, **46**, 23-31.
- Tzanakakis M.E. & Savopoulou, M.C. (1973) Artificial diets for larvae of *Lobesia botrana* (Lepidoptera - Tortricidae). *Annals of the Entomological Society of America* **66**: 470-471.