



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**Claves y factores que afectan el comportamiento de búsqueda de
hospedadores en el parasitoide *Ibalia leucospoides* (Hymenoptera:
Ibaliidae)**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área: Ciencias Biológicas

Nélida Raquel Jofré

Directores de tesis: Juan Carlos Corley
Director Asistente: Andrés Santiago Martínez
Consejero de Estudios: Juan Carlos Reboreda

EEA Bariloche INTA, Grupo de Ecología de Poblaciones de Insectos. Modesta Victoria, 4450
(8400), S.C. de Bariloche, Río Negro, Argentina.

Buenos Aires, Agosto 2017

Resumen

Claves y factores que afectan el comportamiento de búsqueda de hospedadores en el parasitoide *Ibalia leucospoides* (Hymenoptera: Ibalidae)

Autora: Nélide Raquel Jofré

Director: Juan Carlos Corley, Director Asistente: Andrés Santiago Martínez

El objetivo de esta tesis fue describir las claves y otros factores involucrados en el proceso de localización de hospedador por el parasitoide *Ibalia leucospoides* (Hymenoptera: Ibalidae). Estudié la respuesta de hembras hacia claves provenientes de su hospedador, la plaga forestal *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae), de sus conespecíficos, de árboles de pino atacados y no atacados por la avispa de la madera, y del hongo simbionte *Amylostereum areolatum*, usado por el hospedador para degradar la celulosa. Luego, dada su relevancia en el control biológico, y en el contexto del conocimiento adquirido sobre rasgos de historia de vida de la especie, exploré las implicancias del estado nutricional del parasitoide en el comportamiento de búsqueda de hospedadores. Los principales resultados confirman que el hongo simbionte de *S. noctilio*, juega un papel central en la interacción entre el parasitoide y su hospedador. *Ibalia leucospoides* es atraída hacia volátiles liberados por el cultivo de hongo de dos semanas de desarrollo, lo que indicaría la ventana óptima para atacar las larvas hospedadoras. Sorprendentemente, no se encontraron evidencias de otros componentes del sistema (i.e.: planta hospedadora, hospedador adulto y conespecíficos) que influyan sobre la conducta de las hembras parasitoides. Además, la respuesta de *I. leucospoides* mostró ser estado-dependiente; hembras privadas de alimento fueron atraídas hacia los volátiles del hongo, a diferencia de las alimentadas, sugiriendo una urgencia en descargar sus huevos. Estos resultados no sólo son importantes para una mejor comprensión del comportamiento de búsqueda de hospedadores de los parasitoides, sino que pueden ser fundamentales para el mejoramiento de los planes de manejo de la plaga *S. noctilio*.

Palabras clave

Ibalia leucospoides; localización de hospedadores; interacciones multitróficas; *Amylostereum areolatum*; *Sirex noctilio*; semioquímicos; respuesta estado-dependiente.

Abstract

Cues and factors affecting host location behaviour in the parasitoid *Ibalia leucospoides* (Hymenoptera: Ibaliidae)

Author: Nélide Raquel Jofré

Supervisor: Juan Carlos Corley

Assistant Supervisor: Andrés Santiago Martínez

The aim of this thesis was to describe the cues and other factors involved in the process of host location by the parasitoid *Ibalia leucospoides* (Hymenoptera: Ibaliidae). I studied the response of female parasitoids to cues from its host, the woodboring forest insect pest, *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae), from conspecifics, from pine trees attacked by woodwasps, and from the symbiotic fungus *Amylostereum areolatum*, used by the *S. noctilio* to degrade cellulose and feed their larvae. Then, considering the importance of this parasitoid in biological control, and in the context of the knowledge acquired on life history traits of the species, I explored the implications of female nutritional status during the host location. The main findings confirm that *S. noctilio* symbiotic fungus volatiles play a key role in the interaction between the parasitoid and its host. *Ibalia leucospoides* is attracted to volatiles elicited by fungus culture after two weeks' development, which may indicate the best window for attacking host larvae. Surprisingly, no evidence was found of other components of the system (i.e.: the attacked host plant, adult hosts or conspecifics) influencing parasitoid foraging behaviour. Also, *I. leucospoides* responses were shown to be state-dependent; food-deprived females were attracted to fungus volatiles, unlike fed females, suggesting an urgency in egg discharge. These results are important not only to further our understanding parasitoid host location behaviour but may prove central to the improvement of the *S. noctilio* management plans.

Key words

Ibalia leucospoides; host location; multitrophic interactions; *Amylostereum areolatum*; *Sirex noctilio*; semiochemicals; state-dependent response.

Agradecimientos

- A Juan por haber aceptado que forme parte de su grupo de investigación durante esta importante etapa de mi formación, por guiarme en el proceso de investigación y de escritura de la tesis, y por su paciencia.
- A Andrés por acompañarme y guiarme en la etapa final del doctorado, sus constantes aportes y buena onda.
- A Debo, Octavio y Ana Laura, mis compañeros de oficina por la agradable convivencia a pesar del pequeño espacio, por las charlas compartidas y la ayuda incondicional.
- A José, Debo y Maite, mis compañeros de ruta y de colecta de troncos de pino, por los inolvidables (e incontables) viajes a las distintas plantaciones de pino de la región, por los almuerzos compartidos y el enorme trabajo cooperativo.
- A todos los integrantes del grupo de ecología de poblaciones de insectos, Juan, Andrés, José, Debo, Maite, Ana Julia, Vicky y Alejandro, que han estado durante mi paso este, por su compañerismo, buena onda y apoyo incondicional.
- A los integrantes del grupo de Genética del INTA Bariloche, María Marta, las Carolinas, Paula y Mario, por permitirme utilizar parte de su equipamiento para preparar medios de cultivo, y enseñarme a utilizarlo.
- A Paleta, por su constante ayuda en el trabajo pesado, como la reparación de las jaulas, la colecta de palos de pino y el mantenimiento del rancho, y por su buena onda.
- A mi familia, a todos!, por su incondicional acompañamiento.
- A Javier por bancarse mi estadía en Bariloche y por estar siempre, gracias!

ÍNDICE

Resumen.....	2
Abstract	3
Agradecimientos	4
Capítulo I - Introducción General	8
La problemática de los insectos plaga en sistemas forestales.....	9
La ecología química y los insectos.....	10
Estrategias sustentables para el manejo de plagas	14
Fundamentos del control biológico de plagas	15
Los semioquímicos en el manejo de plagas.....	18
Las interacciones multitróficas y los parasitoides.....	22
Sistema de estudio: la avispa de los pinos <i>Sirex noctilio</i> y el parasitoide <i>Ibalia leucospoides</i>	27
Objetivo general.....	40
<i>Objetivos particulares</i>	40
Capítulo II - Información provista por el primer (<i>Pinus</i> spp.) y segundo (<i>Sirex noctilio</i>) nivel trófico.....	42
Introducción	43
Materiales y métodos	47
Cría de insectos	47
Evaluación de la actividad de <i>I. leucospoides</i> ante volátiles de pinos	48
Ensayos de preferencia de <i>I. leucospoides</i> a olores de pinos de diferentes especies sanos y atacados.	50
Respuesta de <i>I. leucospoides</i> hacia extractos de <i>S. noctilio</i>	52
Resultados	55
Evaluación de la actividad de <i>I. leucospoides</i> ante volátiles de pinos	55

Ensayos de preferencia de <i>I. leucospoides</i> a olores de pinos de diferentes especies sanos y atacados.	56
Respuesta de <i>I. leucospoides</i> hacia extractos de <i>S. noctilio</i>	57
Discusión	57
Capítulo III - Variabilidad temporal en la emisión de volátiles de <i>Amylostereum areolatum</i> y su implicancia en la localización del hospedadores.	62
Introducción	63
Materiales y Métodos	65
<i>Cultivo de Amylostereum areolatum</i>	65
<i>Ensayos comportamentales</i>	66
<i>Identificación de los volátiles emitidos por Amylostereum areolatum</i>	67
Resultados	68
<i>Ensayos comportamentales</i>	68
<i>Identificación de los volátiles emitidos por Amylostereum areolatum</i>	69
Discusión	71
Capítulo IV - La influencia de los conespecíficos (el tercer nivel trófico) y del estado nutricional en el comportamiento de búsqueda de hospedadores.....	75
Introducción	76
Materiales y métodos	79
<i>Evaluación de la información provista por los conespecíficos</i>	79
<i>Preferencia hacia el hongo en función del estado de alimentación</i>	81
Resultados	82
<i>Ensayos de olfatometría</i>	82
<i>Ensayos olfativo-visual</i>	82
<i>Preferencia hacia el hongo en función del estado de alimentación</i>	83
Discusión	84
Capítulo V - Discusión general.....	89

La relevancia de la información proveniente del pino (Capítulo II)	90
Respuesta hacia <i>S. noctilio</i> (Capítulo II)	91
El hongo (Capítulo III)	92
Los conespecíficos (Capítulo IV)	94
La influencia del estado nutricional y los rasgos de historia de vida (Capítulo IV)	95
Bibliografía	98
Anexo 1.....	120
Anexo 2.....	127
Anexo 3.....	135

Capítulo I - Introducción General

La problemática de los insectos plaga en sistemas forestales.

De la totalidad de los bosques que existen a nivel mundial, se ha estimado que el 7% lo constituyen plantaciones, y un cuarto de ellas involucra especies exóticas de árboles (FAO, 2010). En la Argentina, grandes extensiones han sido forestadas con especies exóticas como *Pinus* spp., *Eucalyptus* spp., *Salix* spp. y *Populus* spp., entre otras. Las plantaciones con especies exóticas, son realizadas mayoritariamente con fines económicos ya que tienen como propósito la producción de madera para la construcción y mueblería o pasta de celulosa para la fabricación de papel. Las principales regiones del país con bosques implantados son la Mesopotamia, el Litoral, el Delta del Paraná y, en menor medida, la Patagonia (DPF, 2014).

La introducción de árboles exóticos en nuevos sitios puede traer aparejado una serie de inconvenientes que afectan la productividad maderera o el hábitat donde la actividad se establece. Entre estos inconvenientes, emergen por su relevancia aquellos relacionados con el arribo de especies de insectos perjudiciales (Liebhold, 2012). Por ejemplo, los árboles exóticos pueden ser introducidos junto con insectos plaga provenientes de su área de origen pero sin los enemigos naturales de estos últimos. Por su parte, los insectos nativos pueden tornarse en enemigos de los árboles exóticos introducidos al exponerlos a una sobreabundancia de recursos, muchas veces con una mínima capacidad de resistencia por tratarse de interacciones nuevas en términos evolutivos así como por la escasa variabilidad genética (i.e.: clones de árboles) vinculada a la mejora de la productividad. Por último, las especies introducidas junto con los árboles exóticos pueden afectar a las plantas nativas del lugar donde fueron implantadas (Corley & Jervis, 2012). Es importante recordar que un elemento fundamental de la productividad del cultivo forestal con especies no nativas, es precisamente el principio de ausencia de una presión de herbivoría de significación.

En numerosos ámbitos de investigación se estudian las interacciones entre las especies arbóreas de interés tanto económico como ambiental, sus plagas y los enemigos naturales de estas últimas. La información generada puede resultar fundamental para

mejorar la producción sustentable de productos del bosque. El presente trabajo es ejemplo de ello ya que intenta profundizar sobre los conocimientos de las interacciones entre especies de pinos introducidas en la Argentina, la avispa de la madera *Sirex noctilio* Fabricius (Hymenoptera: Siricidae), el insecto plaga de pinos quizás más importante del hemisferio sur, y uno de sus enemigos naturales introducido en todas la regiones afectadas por la plaga, la avispa *Ibalia leucospoides* Hochenwarth (Hymenoptera: Ibalidae).

La ecología química y los insectos

Los insectos, viven inmersos en un complejo mundo de estímulos de diferente naturaleza, entre los cuales deben detectar las claves que los conduzcan a sus parejas, alimento, hospedadores y refugios. El desempeño de estos es producto de un uso adaptativo de claves sensoriales específicas que induce a un grupo de respuestas comportamentales estereotipadas. Los organismos detectan y extraen información de su ambiente en función de la sensibilidad de sus receptores sensoriales, los cuales han sido moldeados, al igual que otras adaptaciones sensoriales, reflejando soluciones a las necesidades específicas del animal (Larsson & Svensson, 2005).

Ciertos compuestos químicos de variado origen, juegan un rol preponderante en la comunicación entre los organismos de una misma especie y de especies diferentes. Todos los organismos producen señales químicas, y todos en sus respectivas maneras, responden a las emisiones químicas de otros. Los organismos usan compuestos químicos para atraer a sus parejas, asociarse con simbioses, disuadir a los enemigos, buscar alimento, entre otras actividades (Eisner & Meinwald, 1995; Schoonhoven et al., 2005; Bergström, 2007; Herrmann, 2010a). En este contexto, la ecología química es la disciplina que estudia las interacciones entre organismos mediadas por sustancias químicas. Esta rama de la ecología multidisciplinaria intenta descifrar la estructura química, función, origen, y la significancia de los compuestos que median las interacciones intra e interespecíficas entre los organismos (Eisner & Meinwald, 1995; Millar & Haynes, 1998).

Los compuestos químicos involucrados en las interacciones químicas entre los organismos son denominados semioquímicos o infoquímicos. Dependiendo si la interacción es intraespecífica o interespecífica, los semioquímicos son divididos en feromonas o aleloquímicos, respectivamente (Nordlund & Lewis, 1976). A su vez los aleloquímicos se dividen en sinomonas, alomonas y kairomonas, en función de si la interacción mediada por estos beneficia a los individuos de ambas especies, al organismo que emite o al organismo que recibe la señal química (Klowden, 2007; Thacker & Train, 2010). Los aleloquímicos son contexto-dependientes, es decir que el origen de una kairomona, volátiles explotados por un ilegítimo receptor y que no favorecen al emisor, puede ser por ejemplo una feromona (Larsson & Svensson, 2005; Klowden, 2007). También dentro de los aleloquímicos se hallan las aneumonas, que son emitidas por material no vivo que benefician a organismos receptores de una especie pero dañan a organismos de otra especie (Nordlund & Lewis, 1976). Usualmente, los semioquímicos son referidos como atractantes, arrestantes, repelentes, disuasorios y estimulantes, términos que indican el comportamiento que evocan en el receptor.

Los compuestos químicos que juegan un rol prominente en las interacciones entre los organismos son raramente las mismas sustancias involucradas en el mantenimiento básico de un organismo, como por ejemplo la respiración, la digestión, la excreción, y la fotosíntesis en el caso de las plantas (Berenbaum, 1995). Los semioquímicos son de un carácter secundario. Estos compuestos secundarios, de ahora en más metabolitos secundarios, derivan generalmente de metabolitos que participan en procesos fisiológicos primarios. Presumiblemente, los metabolitos secundarios son fisiológicamente activos entre los organismos precisamente a raíz de su naturaleza secundaria. Los metabolitos secundarios son frecuentemente encontrados sólo en una especie o en un grupo de especies relacionadas, a diferencia de los metabolitos primarios que son universales (Berenbaum, 1995; Taiz & Zeiger, 2002; Schoonhoven et al., 2005).

Entre los metabolitos secundarios (toxinas, anti-digestivos, antibióticos, compuestos orgánicos volátiles), los compuestos orgánicos volátiles (VOC por su sigla en Inglés) en particular son los principales involucrados en mediar las interacciones biológicas (Herrmann, 2010b). Los volátiles se caracterizan por tener una alta presión de vapor, lo que permite una eficiente evaporación desde diferentes superficies, y ser transportados por el aire y alcanzar al organismo receptor. Quizás, la propiedad más importante de estos compuestos es que pueden ser detectados a muy bajas concentraciones (Herrmann, 2010a; Bruce & Pickett, 2011).

Particularmente en los insectos, la comunicación está fuertemente mediada por semioquímicos. Entre ellos, los compuestos químicos gobiernan muchos de sus comportamientos (Klowden, 2007). Por ejemplo, los insectos utilizan claves químicas para encontrar pareja, agregarse, reconocer a sus conespecíficos, encontrar alimento y sitios para oviponer, entre otras conductas con valor adaptativo. Un ejemplo bien conocido de una interacción mediada por semioquímicos en insectos es el de la atracción sexual de la polilla de la seda *Bombyx mori*, la hembra de esta polilla libera la feromona denominada “bombykol”, producida en una glándula exócrina, para atraer al macho, el cual responde a bajas concentraciones de las moléculas en el aire (Schowalter, 2007). Además de las feromonas sexuales, que aumentan la probabilidad de apareamiento, en el mundo de los insectos otros tipos de feromonas han sido registradas, como las feromonas de alarma que informan peligro estimulando el escape o la defensa, las de agregación que inducen la formación de grupos, las de camino que informa a los conespecíficos el camino a seguir hacia una fuente de alimento o un refugio (Blanco-Metzler, 1996; Klowden, 2007; Mori, 2010).

Por su parte, las kairomonas median comportamientos como la localización de hospedadores y sitios de oviposición. Muchos insectos fitófagos encuentran a su planta hospedadora de la cual comer o donde oviponer por metabolitos secundarios liberados por las mismas plantas (Mareggiani, 2001; Klowden, 2007). Los insectos que se alimentan de otros insectos utilizan semioquímicos liberados por sus presas u

hospedadores para hallarlos, muchos de estos insectos explotan feromonas sexuales o de agregación las cuales en este caso están actuando como kairomonas (Godfray, 1994; Meiners & Hilker, 1997; Cournoyer & Boivin, 2004; Fatouros et al., 2008). También muchos insectos hematófagos localizan a sus hospedadores vertebrados por químicos producidos por la respiración y emanados a través de la piel de sus hospedadores como el dióxido de carbono (Bernier et al., 2000; Logan & Birkett, 2007). Las sinomonas en el mundo de los insectos, incluyen esencias florales que atraen a polinizadores, y a semioquímicos liberados por plantas dañadas por la actividad de insectos herbívoros que son utilizados por insectos carnívoros para la localización de sus hospedadores (Dicke, 1999; Hilker & Meiners, 2006; Mills & Wajnberg, 2008; Fatouros et al., 2008). Las alomonas, abarcan químicos que son usados primariamente para la defensa, tales como toxinas, repelentes y anti digestivos. Estos químicos son producidos por las plantas para la defensa contra los insectos herbívoros, y por insectos para disuadir y defenderse de sus depredadores (Klowden, 2007).

Si bien en muchas interacciones sólo un compuesto químico es necesario para evocar una respuesta comportamental en el receptor, en la mayoría de las ellas la respuesta comportamental es mejorada cuando otros compuestos químicos se encuentran junto al compuesto biológicamente activo o es evocada por una mezcla de compuestos que se encuentran en una proporción determinada (Klowden, 2007; Hilker & McNeil, 2008; Mori, 2010; Bruce & Pickett, 2011). Varias especies parecen emplear un único compuesto en sus feromonas (Klowden, 2007), aunque la mayoría de las feromonas son mezclas de diferentes compuestos (Klowden, 2007; Mori, 2010; Ioriatti et al., 2011). Los insectos que explotan señales de plantas, como los insectos herbívoros o los que se alimentan de herbívoros, responden comportamentalmente a mezclas de volátiles liberados por la planta hospedadora y a mezclas de volátiles inducidos por la herbivoría (Dicke, 1999; Mumm & Hilker, 2005; Hilker & McNeil, 2008; Bruce & Pickett, 2011; Rodríguez-Saona et al., 2012). Los compuestos individuales que se encuentran en las mezclas biológicamente activas son con frecuencia, comunes a varias especies;

la proporción específica de los compuestos individuales le confieren a la mezcla el carácter de especie-especificidad (Klowden, 2007; Bruce & Pickett, 2011).

Estrategias sustentables para el manejo de plagas

Los insectos son uno de los grupos de animales que mayor cantidad de especies problema presentan alrededor del mundo, ocasionando daños importantes en la producción agrícola y forestal, en áreas naturales e incluso pueden afectar severamente la salud humana al transmitir enfermedades severas como el Mal de Changas, el dengue, la malaria, entre otras (Pimentel, 2002; Schoonhoven et al., 2005; Logan & Birkett, 2007; Van Driesche et al., 2007).

En el control de los insectos plaga, otros insectos como los parasitoides (insectos cuyas larvas se alimentan del cuerpo de otro artrópodo) y depredadores de herbívoros, son utilizados con frecuencia para disminuir la densidad poblacional de la plaga y así mitigar su impacto negativo (Van Driesche et al., 2007). Esta herramienta – el control biológico–, tiene como fin último reducir el uso de insecticidas de síntesis que conllevan serios problemas sanitarios y ambientales (Hajek, 2004; Cock et al., 2016). El control biológico es parte de la estrategia de manejo de insectos plaga más consensuada en la actualidad, conocida como manejo integrado de plagas (MIP). El MIP combina diversas tácticas de intervención, pero tiene como eje fundamental, la adquisición de conocimientos ecológicos de las interacciones. En este contexto, la ecología química aporta conocimientos sobre las interacciones entre los organismos mediadas por químicos que pueden ser utilizados para mejorar los programas de manejo integrado de plagas.

El uso de semioquímicos en los planes de manejo de plagas requiere de estudios exhaustivos sobre los compuestos químicos y proporciones involucradas en las interacciones entre los organismos, sobre la biología de la plaga y de sus enemigos naturales, y sobre el sitio donde se debe aplicar el control. Dichos estudios abarcan técnicas de extracción de las muestras, de cromatografía para separar, identificar y

cuantificar los compuestos químicos, la síntesis de compuestos en algunos casos, el análisis fisiológico en los animales blanco y no blanco y pruebas comportamentales de los insectos implicados en el control. Por su parte, el diseño de los dispositivos que contengan los semioquímicos para atraer o repeler a los insectos implicados y el diseño de trampas para atrapar individuos de la especie blanco así como el estudio de las condiciones ambientales del sitio donde se debe aplicar el control, el análisis sobre los procedimientos de aplicación y las pruebas de la o las técnicas a utilizar en el sitio de aplicación, son pasos necesarios para su correcta implementación (Pélozuelo & Frérot, 2007; Herrmann, 2010a; Ioriatti et al., 2011; Mallinger et al., 2011; Rodríguez-Saona et al., 2012).

Fundamentos del control biológico de plagas

La distribución y abundancia de las especies en sus ambientes nativos está fuertemente influenciada por la actividad de sus enemigos naturales (predadores, parásitos, parasitoides, patógenos o competidores). Pero cuando las especies invaden o son introducidas en nuevas áreas, o las condiciones de su ambiente nativo son modificadas (ej.: cambio climático, imposición de cultivos, etc.), las interacciones biológicas son interrumpidas y ciertas especies escapan a la regulación natural y se convierten en plaga (Gullan & Cranston, 2000).

En su enfoque tradicional, el control de plagas se basa en la aplicación de productos químicos (insecticidas o plaguicidas), especialmente de síntesis. Sin embargo, esta práctica es fuertemente cuestionada debido al efecto nocivo que causan en el medio ambiente, la salud humana y, por su toxicidad para especies no blanco afectando a especies benéficas o de importancia ecológica, o incluso por la generación de cepas o variedades resistentes y el surgimiento de plagas secundarias (Hajek, 2004; Begon et al., 2006; Hajek et al., 2007). Alternativas al uso de pesticidas están constantemente siendo estudiadas y aplicadas, entre las que se encuentra el control biológico. Este método de control de plagas se basa en la reducción de la abundancia y de la actividad de una dada especie plaga por efecto de enemigos naturales, usualmente introducidos

a tal fin (Hawkins & Cornell, 1999; Gullan & Cranston, 2000; Mills & Wajnberg, 2008). Una de las ventajas de los enemigos naturales es que muchos son hospedador-específico, disminuyendo los riesgos para especies no blanco (Gullan & Cranston, 2000).

Existen tres estrategias de control biológico (Gullan & Cranston, 2000; Mills & Wajnberg, 2008). El *control biológico clásico* se basa en la introducción en el área invadida de un enemigo natural hospedador-específico importado del área nativa de la plaga exótica, la finalidad de esta estrategia es que el enemigo natural introducido se establezca en el área invadida por la plaga y provea una supresión de largo término, de las densidades poblacionales de la plaga. El *control biológico aumentativo* implica liberar periódicamente individuos para una supresión inmediata o a lo largo de una temporada, este tipo de control se realiza cuando se necesita aumentar las poblaciones de los enemigos naturales o cuando los enemigos naturales no se establecen de modo persistente. Por último, el *control biológico conservativo* está enfocado a mejorar y proteger las poblaciones de enemigos naturales (tanto nativos como introducidos) presentes en el área invadida a través del mejoramiento de los recursos limitantes (ej: proveer fuentes de alimento) y la minimización de prácticas que interrumpen los procesos ecológicos naturales (por ej. disminución del uso de plaguicidas) (Gullan & Cranston, 2000; Mills & Wajnberg, 2008).

Debido a que los enemigos naturales no eliminan completamente a la plaga, se espera que con el control biológico se reduzca y se mantenga a la plaga por debajo de los umbrales de daño (Gullan & Cranston, 2000). En la actualidad se recomienda aplicar el control biológico dentro de un programa de manejo integrado de plagas, en donde se combinan estrategias y prácticas de manejo para suprimir la plaga, reducir el uso de plaguicidas y mejorar su eficacia (Sithanantham et al., 2013; Omkar, 2016; Coll & Wajnberg, 2017). La silvicultura y la sanidad vegetal, el cultivo de plantas modificadas genéticamente resistentes a las plagas, el trampeo mecánico o con semioquímicos (feromonas, aleloquímicos), la confusión sexual (feromonas sexuales) y la introducción de machos estériles son algunas de las técnicas que pueden combinarse con el control

biológico. MIP también contempla el uso de pesticidas de origen químicos (i.e.: de síntesis o productos naturales) como último recurso (Maredia, 2003).

En los sistemas forestales, diversos insectos plaga han sido y son un problema a nivel mundial, ocasionando daño tanto económico como ambiental. Se ha estimado que más de un 2% de los bosques se pierden por el ataque de insectos, superando incluso las pérdidas ocasionadas por fuego (FAO, 2010). En plantaciones forestales de Argentina, quizás entre los ejemplos más conocidos de plagas se encuentran la avispa de la madera *Sirex noctilio* (Himenóptera: Siricidae), la polilla del pino *Rhyacionia buoliana* (Lepidóptera: Tortricidae), la avispa sierra de los sauces, *Nematus oligospilus* (Himenóptera: Tenthredinidae) y la chinche del eucalipto (*Thaumastocoris peregrinus*) (Gomez, 2003; Hurley et al., 2007; Alderete et al., 2010; Villalba & Eskiviski, 2014). En este tipo de sistemas, el uso de pesticidas resulta dificultoso debido a las grandes extensiones que presentan las forestaciones; es por ello que otras técnicas deben ser consideradas para un manejo exitoso de sus plagas.

La mayoría de las especies de insectos mencionados, son exóticas en plantaciones forestales del hemisferio sur (donde también son exóticas las especies forestales implantadas). En sus áreas de origen, presentan enemigos naturales que controlan su abundancia y distribución, además de que en general los bosques naturales son diversos en cuanto a especies, composición genética y estructura etaria. Los enemigos naturales han sido y son considerados en los programas de control de plagas, en donde, por su naturaleza exótica, el control biológico clásico es el que ha sido mayormente empleado (Hurley et al., 2007; Loch, 2008; Ramos Sanz & Lanfranco, 2010), introduciendo enemigos naturales desde sus áreas nativas a los sitios de interés. Si bien el éxito del control biológico en sistemas forestales es mayor que en otros sistemas agrícolas (Hajek et al., 2007), particularmente el aplicado en hábitats exóticos cuando hay parasitoides involucrados (Hawkins et al., 1999), este varía entre los sitios en donde los enemigos naturales son introducidos (Cordero Rivera et al., 1999; Lanfranco & Ide, 2000; Hurley et al., 2007; Loch, 2008), justificándose en

ocasiones un manejo integrado en este tipo de sistemas, combinando el control biológico con otras técnicas para un mejor control de la plaga. Prácticas bien conocidas en este sentido son el raleo preventivo (la eliminación de ejemplares susceptibles), el raleo sanitario (la eliminación los árboles afectados), las cuarentenas (prevenir el movimiento de material afectado hacia áreas libres de plaga o con baja prevalencia) y el trapeo con semioquímicos o mecánico, entre otros.

Los semioquímicos en el manejo de plagas.

Los compuestos químicos que modifican el comportamiento de los insectos son herramientas ideales para el control de las plagas debido a su condición amigable con el medioambiente. Los semioquímicos presentan diferentes características que respaldan su aptitud en el manejo de insectos. Son generalmente especie-específicos, afectando exclusivamente el comportamiento de la especie blanco; son activas en muy pequeñas cantidades por lo que no contaminan y no afectan a organismos benéficos, es poco probable que generen resistencia por tratarse de compuestos involucrados en procesos sujetos a selección; la gran mayoría no son tóxicas para los animales y no dejan residuos químicos en los productos agrícolas y en los agro-ecosistemas (Marrone, 2009; Witzgall et al., 2010).

Dentro de los semioquímicos, las feromonas y las kairomonas han recibido más atención en relación al control de insectos plaga, ya que son volátiles químicos que estos usan como atrayentes (Amman & Lindgren, 1995; Gut et al., 2004; Pélozuelo & Frérot, 2007; Thacker & Train, 2010; Witzgall et al., 2010; Ioriatti et al., 2011). No obstante, en los últimos años se han desarrollado estrategias de control que incluyen, entre otros elementos, la utilización de alomonas como repelentes (Cook et al., 2007).

Las feromonas sexuales, que son los compuestos químicos que mayor uso han recibido en este contexto, principalmente por su alto nivel de especificidad, pueden ser utilizadas de diferentes maneras en el control de plagas (Pélozuelo & Frérot, 2007; Baker, 2009; Thacker & Train, 2010; Witzgall et al., 2010; Ioriatti et al., 2011). La

técnica que más comúnmente ha utilizado a las feromonas es la técnica de la confusión sexual (Witzgall et al., 2008, 2010). Dicha técnica tiene como objetivo desorientar al macho de una especie plaga durante el proceso la localización de las hembras, lo que tiene como consecuencia una disminución en la reproducción. La misma combina tres mecanismos fisiológicos y comportamentales que pueden ser clasificados como, (1) habituación sensorial o fatiga sensorial, (2) competencia entre la fuente sintética y la natural, y (3) camuflaje (Witzgall et al., 2008; Baker, 2009; Ioriatti et al., 2011). Las aplicaciones más extendidas y exitosas de las feromonas sexuales están relacionadas con su uso en la detección y el monitoreo de especies plaga. El sistema de detección permite detectar el ingreso de una especie de insectos desde una región a otra o también desde un área sin cultivo a un área con cultivo (Baker, 2009). Por su parte, a través del sistema de monitoreo se relacionan las capturas en trampas con la abundancia o el daño ocasionado por la especie plaga, medida que es utilizada para determinar umbrales de captura sobre los cuales se basan las decisiones a tomar y las acciones a seguir para el control (Baker, 2009; Thacker & Train, 2010; Witzgall et al., 2010). Otras técnicas en las que las feromonas sexuales son empleadas son las de trampeo masivo y las de atrapar y matar, que tienen como propósito reducir la población de la plaga por la captura de una gran proporción de la misma. En la técnica de trampeo masivo, los individuos son atraídos por medio de los semioquímicos a trampas donde quedan atrapados, mientras que en la técnica de atrapar y matar se atrae a los individuos a una fuente que contiene un insecticida en bajas concentraciones (Thacker & Train, 2010; Witzgall et al., 2010). Un trampeo masivo con miles de trampas cebadas con una feromona sexual se aplica en el monitoreo de la mosca gitana *Limantria dispar* en EEUU, siendo esta técnica la base de los planes de manejo de esta plaga para su erradicación (Tobin et al., 2012).

Al igual que las feromonas sexuales, las feromonas de agregación, generalmente producidas por distintos grupos de escarabajos, son frecuentemente utilizadas en la detección, monitoreo y en el trampeo masivo de insectos plaga (Amman & Lindgren, 1995; Gut et al., 2004; Thacker & Train, 2010). En contraste con las feromonas

sexuales, las que mayormente atraen solo a un sexo, las feromonas de agregación pueden darle un uso más eficiente a estas técnicas ya que atraen a ambos. El trampeo masivos empleando este tipo de feromonas ha dado resultados positivos, en combinación con otras técnicas, en el control de poblaciones de ciertas especies de escarabajos (para una revisión ver Gut et al. 2004). Por otro lado, en escarabajos de la corteza se han detectado feromonas de anti-agregación, que son liberadas por estos insectos para disuadir a los conoespecíficos de una planta ya colonizada. Las feromonas de anti-agregación son consideradas en técnicas que implican el desplazamiento de la plaga del lugar de interés. Tanto las feromonas de agregación y anti-agregación son empleadas en técnicas que emplean elementos disuasorios y de atracción, como la de *Push-Pull* (Atracción-repulsión en inglés, Khan et al. 2000; Cook et al. 2007; Bruce 2010; Heuskin et al. 2011; Rodriguez-Saona et al. 2012). La utilización de estos dos tipos de feromonas ha arrojado resultados satisfactorios para su aplicación con la técnica de *Push-Pull* en el control del escarabajo de la corteza *Dendroctonus ponderosae* (Lindgren & Borden, 1993).

Las kairomonas han sido usadas principalmente en programas de trapeo y monitoreo (Gut et al., 2004; Thacker & Train, 2010). Las mismas también pueden ser utilizadas en combinación con otro tipo de semioquímicos, como por ejemplo se ha observado en algunos casos en donde volátiles derivados de las plantas mejoran la atracción a los cebos de feromonas (Witzgall et al., 2010). Recientemente este tipo de semioquímicos viene siendo examinado para mejorar la efectividad de las especies benéficas (Gut et al., 2004; Thacker & Train, 2010; Heuskin et al., 2011). En la práctica cuyo objetivo es mejorar la atracción de los enemigos naturales y reducir la población de la plaga (Rodriguez-Saona et al., 2012), no solamente se pueden utilizar kairomonas o feromonas que actúan como kairomonas, sino también feromonas de agregación producidas por depredadores y sinomonas como lo son los volátiles de plantas inducidos por herbivoría (Thacker & Train, 2010; Rodriguez-Saona et al., 2012).

En los últimos años se han desarrollado estrategias para el manejo integrado de plagas, que integran varios elementos de las diferentes tácticas de control, denominadas de *Push-Pull*. Esta estrategia de estímulo-disuasión simultánea, utilizan una combinación de estímulos que modifican el comportamiento para manipular la distribución y abundancia tanto de la plaga como de insectos benéficos. Mediante estas estrategias se tiene como objetivo desplazar a la plaga fuera del cultivo o del área a proteger utilizando estímulos que enmascaren la presencia de la planta hospedadora o que repelan o disuadan a los individuos, así como también atraigan a los enemigos naturales de la plaga a través de cebos , y simultáneamente se atrae a la plaga utilizando estímulos atractivos desde las áreas donde se la quiere eliminar a otras áreas tal como trampas donde la plaga es concentrada facilitando así su eliminación (Cook et al., 2007; Rodríguez-Saona et al., 2012). Dentro de los estímulos para los componentes *Push* de las estrategias se pueden utilizar, volátiles de plantas no hospedadoras que enmascaren los olores de las plantas hospedadoras o alomonas que evoquen un comportamiento de repelencia y atraigan enemigos naturales, semioquímicos derivados del hospedador proporcionados en una proporción diferente a la que son atractivos (en algunos insectos una proporción diferente de los volátiles de la planta hospedadora puede evocar un comportamiento de repelencia), volátiles de plantas inducidos por herbivoría que indican competencia o inducción de defensa por parte de la planta, feromonas de anti-agregación, feromonas de alarma y feromonas que disuaden la oviposición. Por otro lado, para los componentes *Pull* de las estrategias se pueden utilizar volátiles de las plantas hospedadoras, feromonas sexuales y feromonas de agregación que son empleados en técnicas que se aplican fuera de los cultivo, y volátiles inducidos por herbivoría que atraen a enemigos naturales que se emplean en técnicas que se aplican dentro de los cultivos, (Cook et al., 2007; Bruce, 2010; Rodríguez-Saona et al., 2012). En esta práctica no sólo se utilizan semioquímicos para atraer o disuadir a los insectos sino también se pueden utilizar claves visuales, suplementos alimentarios y anti-digestivos, entre otros (Cook et al., 2007; Bruce, 2010). Un ejemplo del uso de esta técnica, es la observada en África; con el objetivo de disminuir las pérdidas y como consecuencia de que las técnicas

tradicionales (ej. pesticidas químicos; la quema de plantas hospedadoras silvestres y de maíces secos) no han dado buenos resultados, además de que son costosas y causan un deterioro en el medioambiente, la técnica *push-pull* se ha puesto en práctica en cultivos de maíz que son atacados por insectos barrenadores del tallo de las familias Pyralidae, Crambidae y Noctuidae. (Khan et al., 2003; Khan & Pickett, 2004; Midega et al., 2014).

Las interacciones multitróficas y los parasitoides

Las relaciones multitróficas frecuentemente vinculan a varias especies en una comunidad a través de la herbivoría, depredación y/o parasitismo. Cuando estas conexiones atraviesan tres niveles tróficos son llamadas interacciones tritróficas. Ejemplo de este tipo de interacciones son las que relacionan plantas con herbívoros y patógenos que se alimentan de plantas, y con enemigos naturales de los herbívoros y los patógenos (Agrawal, 2000). Algunas interacciones tritróficas tienen un alto grado de especialidad, mientras que otras son más generalistas.

Particular atención han recibido las interacciones tritróficas donde se interrelacionan plantas, herbívoros y carnívoros (parasitoides o depredadores de herbívoros). Esto se debe en parte a la gran abundancia de este clase de interacciones y a la diversidad de los animales herbívoros y carnívoros que participan en ellas (Kaplan, 2012). Se ha estimado que el 50% de los metazoos están involucrados en interacciones planta-herbívoro-enemigo natural (Hawkins, 1994). Pero también ésta particular atención se debe al interés por comprender las complejas relaciones establecidas entre estos niveles tróficos (Tkaczuk et al., 2007). El estudio de las interacciones tritróficas es importante para entender patrones de asociación en comunidades naturales, y dicho conocimiento puede ser utilizado para mejorar métodos de control de plagas mediante la manipulación del comportamiento de los enemigos naturales (Agrawal, 2000; Tkaczuk et al., 2007).

Entre los enemigos naturales que atacan herbívoros se encuentran los parasitoides, estos insectos han recibido particular interés debido a su abundancia y diversidad, su peculiar ciclo de vida, sus complejas interacciones con sus hospedadores y su uso en programas de manejo de insectos plaga. Además los parasitoides han sido un modelo para el estudio de la ecología y evolución del comportamiento de los insectos (Godfray, 1994; Baalen & Hemerik, 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, los parasitoides son insectos cuyas larvas se alimentan exclusivamente del cuerpo de otro artrópodo (hospedador o huésped), al cual inevitablemente terminan matando. Dependiendo de la especie que se trate una o más larvas (hasta miles) pueden desarrollarse en un mismo hospedador (en un mismo individuo). El ciclo de vida de estos insectos comienza cuando la hembra deposita uno o más huevos en, sobre o en cercanías su hospedador. Luego de la eclosión del huevo, la larva se desarrolla sobre o dentro del hospedador. Posteriormente, la larva se transforma en pupa donde se forman los tejidos y las estructuras del adulto. Finalmente, de la pupa emerge el adulto que se deberá alimentarse, buscar pareja y un nuevo hospedador donde oviponer (Godfray, 1994).

Se han descrito alrededor de 68.000 especies parasitoides, lo que corresponde aproximadamente al 10 % de las especies de insectos descritas hasta el momento. Se cree que sólo el 10 % de los insectos que habitan la tierra son conocidos para la ciencia, y que aproximadamente unos 800000 posee el hábito parasitoides. Las especies descritas pertenecen a cinco órdenes de insectos, pero la mayoría están incluidos dentro de los himenópteros y dípteros, y en menor medida son coleópteros, lepidópteros y neurópteros (Jayashankar et al., 2016).

Los parasitoides pueden clasificarse de diferentes maneras según aspectos de su historia de vida: según el estadio del herbívoro que atacan pueden clasificarse en parasitoides de huevo, de larva, de pupa y de adultos si atacan insectos holometábolos y en *parasitoides de huevo-larva* y *parasitoides de larva-pupa* si atacan insectos hemimetábolos. Si una única larva se desarrolla en un único hospedador se los

denomina *solitarios* y si varias larvas (hasta miles) se desarrollan en un único hospedador son *gregarios*. También se los puede clasificar según su conducta alimenticia: los parasitoides pueden dividirse en *endoparasitoides* si la larva se desarrolla dentro del cuerpo del hospedador y en *ectoparasitoides* si la larva vive externamente con sus partes bucales enterradas en el cuerpo del hospedador. Pero una clasificación importante por sus implicancias evolutivas se basa en su estrategia de ataque en donde los *koinobiontes* le permiten a su hospedador continuar con su crecimiento luego de sucedido el evento de parasitación (en este tipo de parasitoides la larva se alimenta gradualmente de los órganos no vitales de su hospedador), y los *idiobiontes*, paralizan completamente el desarrollo del hospedador al momento de la ovipostura o ataque, en este caso la nutrición de la larva del parasitoide se limita a los recursos energéticos presentes en el hospedador en el momento de la parasitación). Finalmente, existen diferentes formas de parasitismo: el parasitismo simple o primario es cuando una única hembra parasitoide deja sus huevos en un hospedador, mientras que si dos o más individuos de una especie oviponen en un mismo hospedador se lo denomina *superparasitismo*, pero si individuos de diferentes especies oviponen en el mismo hospedador puede ocurrir *multiparasitismo*, cuando las larvas de las distintas especies compiten por el recurso, o hiperparasitismo, cuando la larva de la segunda especie se alimenta de la larva parasitoide ovipuesta en primera instancia (Godfray, 1994).

Desde tiempos remotos, los insectos que se alimentan de insectos herbívoros han sido utilizados en el manejo de insectos plagas; el primer registro data del año 300 DC (Peng, 1983). Por su lado, los parasitoides han sido centrales en el desarrollo de la teoría del control biológico, en parte por el alto grado de especificidad alcanzado por muchos de ellos, y por una notable capacidad de búsqueda en especial a bajas densidades de hospedador. También, otros atributos como una alta capacidad de adaptación a cambios en las condiciones del ambiente; la sincronización con el ciclo biológico del hospedador, la capacidad de sobrevivir períodos en los que el hospedador esté ausente (diapausa, letargo), y por ser capaces de constituir

poblaciones que responden de modo denso-dependiente (esto es, crecer en abundancia en función de su propia densidad y la del hospedador), los hacen más efectivos para su empleo en los programas de control biológico de insectos plagas que otros animales (Hajek, 2004; Van Driesche et al., 2007). De cientos de programas de control biológico de insectos plagas a nivel mundial, los parasitoides han sido el tipo más común de enemigo natural introducido (Van Driesche et al., 2007).

Debido a que los parasitoides han evolucionado dentro de un contexto multitrófico, su fisiología y comportamiento están influenciados por los elementos de los otros niveles tróficos tales como su herbívoro víctima (segundo nivel trófico) y la planta de la cual se alimenta el herbívoro (primer nivel trófico; de ahora en adelante “planta hospedadora”) (Vet & Dicke, 1992). La información química que proveen los otros niveles tróficos juega un papel preponderante en la búsqueda de hospedadores por parte de los parasitoides (Vet & Dicke, 1992; Godfray, 1994; Powell & Poppy, 2001).

Se han propuesto diversas estrategias de búsqueda de hospedadores por parte de los parasitoides. Entre ellas, la más difundida divide al proceso de búsqueda en una serie de fases de acercamiento que comprenden la localización del hábitat del hospedador, la localización del hospedador en sí, la selección del hospedador adecuado para ser parasitado y el uso del hospedador (Vinson, 1981; Godfray, 1994). Esta estrategia establece que las claves utilizadas por el parasitoide en su búsqueda cambiarán según la escala espacial en la que este se encuentre. Por otro lado se ha propuesto un modelo más dinámico que plantea que los parasitoides responden en mayor medida a los estímulos más asociados con el hospedador, desencadenándose una respuesta diferenciada según los estímulos presentados (Lewis et al., 1990; Vet et al., 1990). Esta estrategia considera la experiencia previa, ya que la jerarquía de cada respuesta variará a lo largo de la vida de un parasitoide, haciendo que responda al estímulo más relacionado con el hospedador.

En la búsqueda de hospedadores, los parasitoides tienen que detectar información relevante dentro de un amplio espectro. En esta búsqueda se enfrentan con el dilema

denominado de la confiabilidad y de la detectabilidad (Vet & Dicke, 1992). Los estímulos confiables ofrecen alguna certeza sobre la presencia del herbívoro a atacar, mientras que los estímulos detectables debido a su abundancia son más fáciles de detectar pero son menos confiables dado que no garantizan la presencia del herbívoro. En este sentido, la información proveniente del herbívoro (segundo nivel trófico) es confiable por ser específica, pero dado a que estos son un pequeño componente de un ambiente complejo, la información que proveen puede ser difícil de detectar. Por el contrario la información proveniente de la planta hospedadora (primer nivel trófico) es más fácil de detectar pero es menos confiable debido a que podría no estar asociada al herbívoro (Vet & Dicke, 1992; Powell & Poppy, 2001; Hilker & McNeil, 2008).

Vet y Dicke (1992) han propuesto que para maximizar la eficiencia de búsqueda y en consecuencia el éxito reproductivo (i.e. *fitness*), los parasitoides resuelven el dilema de la confiabilidad y la detectabilidad mediante diferentes vías, las cuales involucran la utilización de diferentes tipos de claves, a saber: (a) utilizando información química más conspicua producida por un estadio del herbívoro diferente al que se ataca (por ejemplo: enemigos naturales que atacan estadios inmaduros utilizan feromonas producidas por los estadios adultos); (b) utilizando estímulos creados por las interacciones específicas entre el herbívoro y su planta hospedadora (por ejemplo: kairomonas: información química producida por las actividades de alimentación y de oviposición del herbívoro en su planta hospedadora); y (c) aprendiendo a relacionar estímulos fáciles de detectar con estímulos confiables pero difíciles de detectar (Vet & Dicke, 1992; Powell & Poppy, 2001).

Por otro lado, la información suministrada por los conespecíficos puede ser utilizada por los parasitoides en la toma de decisiones acerca de la explotación de un parche o de un hospedador. En algunas especies, la presencia de conespecíficos induce un comportamiento de evitación del parche y del hospedador ya parasitado evitando así la competencia (Bernstein & Driessen, 1996; Castelo et al., 2003).

Sistema de estudio: la avispa de los pinos *Sirex noctilio* y el parasitoide *Ibalia leucospoides*.

Uno de los ejemplos más emblemáticos de especies de insectos forestales invasores a nivel mundial es la avispa barrenadora de los pinos *Sirex noctilio*. Desde principios del siglo XX, esta avispa nativa de Eurasia y del norte de África ha sido introducida accidentalmente en varios países del hemisferio norte y sur en donde ha causado importantes daños económicos en forestaciones de pino (Hurley et al., 2007). Hasta fines del siglo XX, había afectado a plantaciones exóticas de pinos alrededor del mundo, y en el año 2005 fue detectada en plantaciones de pino en América del Norte. Desde sus primeras invasiones, métodos de control han sido empleados constantemente en contra de esta plaga. Entre estos métodos se encuentra el control biológico con parasitoides, siendo la avispa cynipoidea *Ibalia leucospoides* uno de los agentes de control biológico de elección (Hurley et al., 2007; Slippers et al., 2012).

La avispa de la madera *Sirex noctilio* Fabricius (Hymenoptera: Siricidae) es un insecto fitófago que ataca maderas blandas, principalmente especies de pino (*Pinus* spp.). En la Argentina fue detectada por primera vez en la provincia de Entre Ríos en el año 1985 (Espinosa Zúñiga et al., 1986) y en el año 1991 se la registro en la Patagonia (Fritz, 1993; Klasmer et al., 1997).

Sirex noctilio es una avispa primitiva y solitaria con un ciclo de vida usualmente univoltino, el cual puede acortarse o alargarse en climas cálidos y fríos respectivamente (Neumann & Minko, 1981; Taylor, 1981). La mayor parte del ciclo de vida ocurre dentro de la madera del árbol. La hembra taladra agujeros en la madera con su ovipositor donde deja sus huevos. Además de los agujeros de oviposición que son simples estos pueden estar ramificados en dos a cuatro túneles, no en todos los túneles las hembras dejan huevos (Coutts & Dolezal, 1969; Madden, 1981), asimismo en los agujeros de oviposición introducen esporas de un hongo simbiote (*Amylostereum areolatum*, ver más adelante) en túneles con o sin huevos (Coutts & Dolezal, 1969). Los huevos eclosionan dentro de los 10 a 15 días luego de la

oviposición dependiendo de la temperatura ambiente (Madden, 1981, 1988). En función de las condiciones experimentadas durante el desarrollo larvario, la cantidad de estadios larvales puede variar entre 6 y 12 siendo mayor en condiciones subóptimas (Madden, 1988). Durante este periodo la larva excava la madera, formando en ésta típicas galerías, y la presiona con sus mandíbulas extrayendo una fracción de líquido que ingiere por la cavidad oral (Thompson et al., 2014). La pupación se da dentro de la madera y el adulto abre su paso hacia la salida con sus mandíbulas formando característicos agujeros de emergencia (Nuttall, 1989).

Los adultos de *S. noctilio* presentan un marcado dimorfismo sexual (Figura 1.1), las hembras son de color azul oscuro metálico, excepto las alas y las patas que son de color ámbar y anaranjado respectivamente. Por su parte, los machos que también son de color azul oscuro metálico, presentan los segmentos abdominales III a VII y las patas anteriores y medias de color naranja, además las patas posteriores son de color castaño oscuro y son más engrosadas que las de las hembras. En ambos sexos, el último segmento abdominal termina en una prominente espina (cerco)(Neumann & Minko, 1981). En esta especie los adultos no se alimentan, por lo que dependen exclusivamente de los recursos obtenidos en los estadios larvales (Taylor, 1981). Al igual que el resto de los himenópteros, su reproducción es arrenotóquica, es decir que los huevos fecundados dan origen a hembras mientras que los no fecundados a machos.

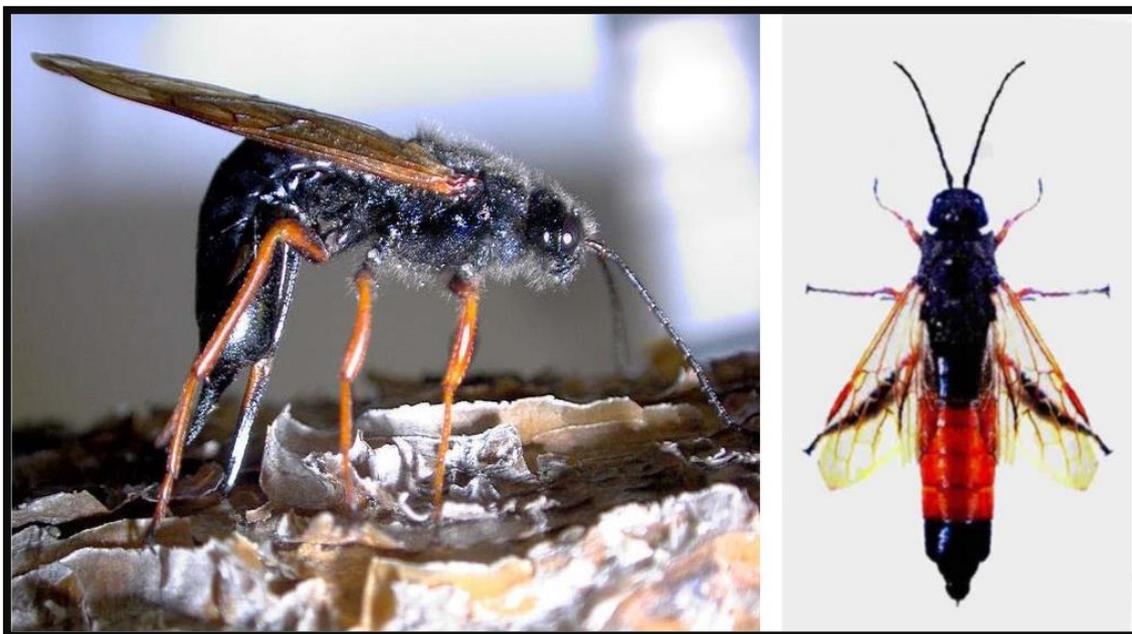


Figura 1.1. Hembra de *Sirex noctilio* oviponiendo (izquierda) y macho de *S. noctilio*. Fotos de Andrés S. Martínez.

Esta especie se caracteriza por la ocurrencia de estallidos poblacionales descritos como “pulsos eruptivos” (Madden, 1988; Corley et al., 2007). Durante periodos variables la población de la plaga se mantiene en densidades bajas, en estos periodos las hembras de *S. noctilio* atacan árboles debilitados. El crecimiento repentino de la población ocasiona los estallidos, llevando a la plaga a niveles epidémicos (Corley et al., 2002; Corley & Villacide, 2005; Villacide & Corley, 2012). En los periodos de estallido se afectan árboles sanos y se producen importantes daños económicos. Una mortalidad de entre un 30 y 70 % de los ejemplares se ha estimado en plantaciones durante estos periodos (Iede et al., 1992). El patrón espacial de los estallidos de *S. noctilio* a una escala de paisaje está fuertemente influenciado por la especie de pino presente, la orientación (norte, sur, este, oeste) de la pendiente donde se encuentra la plantación y la distancia al estallido más cercano (Lantschner & Corley, 2015). En este tipo de dinámica de pulsos eruptivos, la terminación de los estallidos es rápida, mediada por la mortalidad a través de enemigos naturales o la limitación del recurso por excesivo ataque a la forestación (Berryman, 1986, 1987).

En plantaciones de la Patagonia Argentina (Figura 1.2) se ha registrado una fuerte agregación espacial de los ataques de *S. noctilio* durante las etapas tempranas de colonización y una tendencia a incrementarse la agregación con un aumento en los niveles de ataque (Corley et al., 2007). Se ha determinado que el patrón de ataque de la avispa de la madera dentro de la plantación de pino varía en función de su densidad poblacional (Lantschner & Corley, 2015). Una fuerte agregación espacial puede explicar un incremento en el desempeño individual del insecto ya sea por un aumento en las probabilidades de escapar de los enemigos naturales o por un enfrentamiento colectivo con las defensas químicas de las plantas (Rhoades, 1985). Un aumento de la performance individual de los insectos lleva consiguientemente a un aumento poblacional.



Figura 1.2. Vistas de plantación de pino de la localidad de San Carlos de Bariloche atacada por la avispa de la madera *S. noctilio*. El follaje clorótico de los árboles demuestra el ataque de la plaga. Fotos de la autora.

A nivel mundial, las estrategias empleadas para el control de *S. noctilio* son diversas (control biológico, control silvicultural, erradicación y cuarentena) (Hurley et al., 2007), entre ellas el control biológico ha sido una de las más difundidas. Dos tipos de agentes

han sido utilizados en el control biológico de *S. noctilio*, un nematodo parasítico y un conjunto de parasitoides.

El nematodo *Deladenus (=Beddingia) siricidicola* Bedding (Tylenchida: Neotylenchidae) ha sido introducido en algunas regiones y en otras ingresó naturalmente con el hospedador (Zondag, 1969; Iede et al., 2000; Tribe & Cillió, 2004; Carnegie et al., 2005). Este parásito ingresa en el aparato reproductor de la hembra hospedadora atrofiando los ovarios y sus huevos (Zondag, 1979). Se han registrado altos niveles de parasitismo de *D. siricidicola* (Zondag, 1979; Tribe & Cillió, 2004; Iede et al., 2010) aunque su nivel de virulencia ha ido disminuyendo debido -en parte- a que se mantiene a una misma cepa de nematodo cultivándose en el laboratorio por varios años (Hurley et al., 2007). También se ha observado que este enemigo natural no afecta la dispersión geográfica de la plaga (Corley et al., 2014).

Rhyssa persuasoria Linnaeus (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Megarhyssa nortoni* Cresson (Hymenoptera: Ichneumonidae) e *Ibalia leucospoides* son algunas de las avispas introducidas en regiones afectadas con *S. noctilio* (Tribe & Cillió, 2004; Bain, 2005; Carnegie et al., 2005). Las primeras dos atacan estadios inmaduros tardíos mientras que la última ataca estadios inmaduros tempranos (Taylor, 1978). En casi todas las regiones en donde estos parasitoides han sido liberados o han ingresado naturalmente junto con su hospedador se han establecido exitosamente (Zondag, 1959; Taylor, 1967, 1976; Neumann & Morey, 1984; Eskiviski et al., 2004; Tribe & Cillió, 2004; Bain, 2005; Carnegie et al., 2005). Los niveles de parasitismos de cada una de estas avispas son variables en cada región (Hurley et al., 2007). La presencia de *I. leucospoides* y algunos de los risinos (*Megarhyssa nortoni*, *Rhyssa* sp.) en una misma región puede resultar en una tasa de parasitismo combinada alta (Nuttall, 1989).

La avispa *Ibalia leucospoides* Hochenwarth (Hymenoptera: Ibalidae; Figura 1.3) es un endoparasitoide koinobionte solitario de origen holártico (África del Norte y Eurasia) (Nordlander et al., 1996). *Ibalia leucospoides* ataca huevos y larvas del primer y segundo estadio de *S. noctilio* (Madden, 1968; Taylor, 1978). La hembra utiliza los

mismos agujeros que realizó *S. noctilio* durante su oviposición para insertar sus propios huevos. Según Chrystal (1930) el diámetro del ovipositor es cuatro veces menor que el diámetro del túnel, por lo que cuenta con amplio espacio para moverlo libremente. Un sólo huevo es dejado por hospedador, una vez que el huevo eclosiona la larva parasitoide que emerge se alimenta de la larva hospedadora y permanece como endoparásito hasta el tercer estadio larval, cuando emerge de su hospedador y permanece como ectoparásito. Completado el cuarto estadio, empupa, y una vez finalizada la etapa pupal el adulto realiza un agujero en la corteza del árbol y sale del mismo (Chrystal, 1930).



Figura 1.3. Hembra de *Ibalia leucospoides*.

Los adultos presentan un dimorfismo sexual poco marcado, los machos además de presentar las antenas más largas que las hembras tienen una hendidura o muesca en el lado externo del tercer segmento antenal. Otra característica que los diferencia es la forma del abdomen visto lateralmente; el de las hembras es más anguloso mientras el de los machos tiene una forma aproximada a una media luna (Chrystal, 1930; Nuttall, 1980). El tamaño del cuerpo es variable, las hembras miden en promedio 13 mm y los machos 10mm. Es importante recordar que en muchos parasitoides el tamaño del insecto adulto está en gran parte determinado por la calidad y el tamaño del

hospedador (Arakawa et al., 2004; Da Rocha et al., 2007; Häckermann et al., 2007; Li et al., 2017).

En condiciones de laboratorio se ha estimado que las hembras alimentadas *ad libitum* con solución azucarada viven en promedio 35 días y las no alimentadas, 24. La hembra emerge con una carga de huevos inicial promedio de 470 huevos y el 80% de estos están maduros al emerger el adulto, su fecundidad potencial es entonces de aproximadamente unos 600 huevos (Fischbein et al., 2013). De acuerdo a las propiedades reproductivas mencionadas, *I. leucospoides* no necesita alimentarse para madurar sus huevos y oviponer; el alimento ingerido durante la vida adulta sería aprovechado para el mantenimiento de sus funciones somáticas. Fischbein y colaboradores (2011) demostraron que la capacidad de vuelo en esta avispa no se ve modificada entre individuos alimentados y no alimentados. Sólo en una ocasión se registró una hembra silvestre capturada en una forestación de pinos en la Patagonia Argentina con un nivel de azúcar mayor al observado en hembras recién emergidas, este bajo porcentaje de hembras alimentadas capturadas en el campo indicaría que la ingesta de alimento en este contexto es un evento poco frecuente en este parasitoide (Fischbein et al., 2013). Probablemente esto se deba a la estructura de las plantaciones de pino en esta región, en donde la oferta de alimento en forma de néctar es muy limitada (Pietrantuono, 2007). El alimento, como se mencionó anteriormente, prolonga la supervivencia de los adultos, y este aumento de la supervivencia por la alimentación resultaría en un aumento en la fecundidad expresada.

Se ha demostrado que las hembras de *I. leucospoides* son potencialmente buenas voladoras, alcanzando en promedio 10 km por día (Fischbein et al., 2011). No obstante esto es casi la mitad de lo que potencialmente vuela su hospedador *S. noctilio* (17,4 km promedio por día; Bruzzone et al. 2009). En condiciones poblacionales del tipo endémicas (i.e.: baja abundancia), la dispersión de *S. noctilio* dentro de una plantación es muy limitada, mostrando un patrón espacial agregado de los árboles atacados con un radio menor a 150m (Corley et al., 2007), en este contexto la capacidad de vuelo de

I. leucospoides es suficiente para volar de árbol atacado en árbol atacado en búsqueda de hospedadores, permitiéndole de esta manera una exhaustiva exploración dentro y entre parches con hospedador. Sin embargo, en los eventos de estallido de *S. noctilio*, donde la abundancia poblacional crece repentinamente alcanzando niveles epidémicos, *I. leucospoides* no alcanzaría en el corto plazo los nuevos sitios atacados por la plaga, debido a la dispersión producida por la plaga durante estos periodos.

Es ampliamente conocido que el comportamiento de los animales está influenciado tanto por factores externos (del entorno inmediato al individuo) como por factores internos (propios del individuo). Se ha demostrado que un factor externo como la abundancia de hospedadores en combinación con la distancia viajada hacia el parche con hospedador influyen el tiempo que el parasitoide *I. leucospoides* permanece en el parche con hospedador. Sin embargo el tiempo de residencia en el parche no se ve influenciado por la alimentación en este parasitoide (Corley et al., 2010).

Ibalia leucospoides ha sido utilizada en programas de manejo de *S. noctilio* alrededor del mundo (ver Fischbein & Corley 2014 para una revisión detallada de este parasitoide en el control de *S. noctilio*). En la década del 50 este parasitoide fue introducido en Nueva Zelanda estableciendo exitosamente (Zondag, 1959), a fines de 1950, mientras que en 1960 y 1970 fue introducido en diferentes regiones de Australia (Tasmania, Victoria, New South Wales), en donde también fue exitoso su establecimiento (Taylor, 1967; Neumann & Morey, 1984; Carnegie et al., 2005), incluso en algunas de las regiones se ha dispersado rápidamente (Taylor, 1967). En Sudáfrica se comenzó con las liberaciones de *I. leucospoides* en el año 1998, registrándose su establecimiento pocos años después, en el año 2002 (Tribe & Cillié, 2004). En Sudamérica *I. leucospoides* fue introducida accidentalmente junto con su hospedador, primero fue registrada en Uruguay (1984) y luego se dispersó conjuntamente con *S. noctilio* a través de este país, Argentina, Brasil y Chile (Eskiviski et al., 2004). En la Patagonia *I. leucospoides* ha sido registrada en todas las plantaciones infestadas con *S. noctilio* (José Villacide, comunicación personal).

Los niveles de parasitismo de *Ibalia leucospoides* alcanzado en las diferentes regiones en donde fue introducido o ingresó naturalmente son variables. Las tasas de parasitismo registradas en Australia varían entre el 12 y 40% (Neumann et al., 1987) y en Nueva Zelanda entre el 25 y 35%, aunque logró alcanzar en algunas regiones el 55% (Nuttall, 1989). En tanto en Sudamérica se han registrado tasas de parasitismo del 0 al 40% (Eskiviski et al., 2004; Iede et al., 2010). Este parasitoide ha sido considerado el más exitoso de los parasitoides en algunas regiones, siendo el responsable de hasta 99% de la mortalidad de *S. noctilio* por parasitoides (Haugen, 1990; Carnegie et al., 2005).

En la Patagonia Argentina, en general las tasas de parasitismo son similares a las estimadas para el resto de Sudamérica, aunque también se han registrado tasas más altas (Corley et al., datos no publicados). Los porcentajes de parasitismo en la región noroeste de la Patagonia Argentina son muy variables tanto temporalmente (de año en año) como espacialmente (entre plantaciones). Los porcentajes más altos de parasitismo fueron registrados en plantaciones ubicadas en las provincias de Chubut y Neuquén (Plantación Estancia Algar-Neuquén: 54%, temporada 2009-2010; Plantación Provincial Manosa-Chubut: 56,5%, temporada 2009-2010; Plantación Estancia Quechuquina-Neuquén: 60%, temporada 2010-2011), y los porcentajes más bajos fueron registrados en plantaciones ubicadas en las provincias de Río Negro y Chubut (Plantación Estancia San Ramón-Río Negro: 9,6%, temporada 1995-1996; Plantación Estancia El Mirador, Cholila-Chubut: 4,21%, temporada 2012-2013; Plantación Estancia Arroyo del Medio 1-Río Negro: 2,2%, 0,2%, temporadas 2011-2012, 2012-2013 respectivamente; Plantación Estancia Arroyo del Medio 2-Río Negro: 2,2%, 0,2%, temporadas 4,8%, 2012-2013).

En el momento de la oviposición, como se mencionó anteriormente, la hembra de *S. noctilio* deposita huevos y junto con estos inyecta esporas de un hongo simbiote, *Amylostereum areolatum* Boiding (Basidiomycota: Amylostereaceae) (Spradbery, 1977). El hongo reduce el contenido de humedad de la madera favoreciendo la

eclosión del huevo y el desarrollo de la larva, así como también le provee nutrientes esenciales a la larva y causa la muerte de la madera facilitando la actividad taladradora de la larva (Coutts & Dolezal, 1965; Neumann & Minko, 1981). En esta relación simbiótica, el hongo no sólo se beneficia al ser transportado a un árbol específico en donde se desarrollará sino que también porque es inyectado debajo de la corteza, la primer barrera de defensa del árbol (Smith & Schiff, 2002). Además de inyectar esporas del hongo durante la oviposición, la hembra de *S. noctilio* introduce una secreción de mucus o veneno fitotóxico (Spradbery, 1977), este mucus aumenta aún más la susceptibilidad del árbol, condicionándolo para un mejor crecimiento del hongo (Coutts, 1969). Coutts (1969) ha demostrado que la combinación del hongo y el mucus es lo que causa la muerte del árbol.

La simbiosis con la avispa de la madera beneficia a *A. areolatum* por la dispersión que *S. noctilio* le provee. El hongo mientras crece dentro de la madera, también ocupa estructuras especializadas en la cutícula de las larvas hembras de *S. noctilio*, antes de la muda que precede a la pupación, las células glandulares del órgano hipopleural (ubicado en los pliegues hipopleurales del primer segmento abdominal) producen abundantes secreciones que envuelven a las hifas y las esporas del hongo contenidas en los mismos tornándolas cerosas y con forma laminada. Cuando la hembra adulta emerge de la pupa y comienza a realizar con su mandíbula el orificio de salida, las láminas cerosas se rompen y se pegan al cuerpo de la avispa, y a través de movimientos del cuerpo y del ovipositor los pedazos de las láminas cerosas conteniendo el hongo son transportados hacia las micangias (estructura especial en el cuerpo de algunos animales que está adaptada para el transporte de un hongo simbiote, generalmente en forma de espora) donde se liberan de las secreciones (Wermelinger & Thomsen, 2012). La hembra recién emergida con el hongo en sus micangias, se mueve hacia nuevos árboles donde dejar sus huevos dispersando así al hongo tanto como vuelen las avispas.

Si bien se cree que *S. noctilio* es incapaz de desarrollarse sin el hongo, este último puede proliferar más allá de la simbiosis con la avispa. *Amylostereum areolatum* es un hongo basidiomicete cuyas fructificaciones pueden ser encontradas en los troncos de varias coníferas en Europa, la producción de esporas es otra manera de dispersarse, sin embargo se ha observado que las fructificaciones de *A. areolatum* son raras indicando una dominancia de los clones y así una baja variación dentro de la especie (Wermelinger & Thomsen, 2012). Mientras que se ha propuesto que esta interacción posee una alta especificidad, estudios recientes sugieren que otros hongos pueden ser transportados por *S. noctilio* y cumplir idéntica función (Wooding et al., 2013).

Es conocido que una de las claves que utiliza la avispa *I. leucospoides* para encontrar a su hospedador son los volátiles del hongo simbiote de *S. noctilio* (Madden, 1968; Spradbery, 1974; Martínez et al., 2006). El primer estudio sobre el comportamiento de este parasitoide demostró que las hembras de *I. leucospoides* tiene preferencia por agujeros de oviposición de *S. noctilio* de 2 a 3 semanas (Madden, 1968). Este mismo estudio y otro posterior mostraron que las hembras de *I. leucospoides* son atraídas a cultivos de *A. areolatum* en ausencia de señales químicas provenientes del hospedador y derivadas del árbol hospedador (Madden, 1968; Spradbery, 1974). Posteriormente se mostró que las hembras son atraídas hacia y pueden discriminar entre diferentes concentraciones de volátiles de *A. areolatum* (Martínez et al., 2006), sugiriendo que el hongo puede proveer información sobre las densidades relativas de hospedadores disponibles para la oviposición. Otro estudio reveló que las hembras de *I. leucospoides* son capaces de discriminar densidades diferentes de hospedadores entre parches desde una distancia sin la necesidad de hacer contacto directo con los parches para evaluar su rendimiento (Fischbein et al., 2012). En concordancia con otros trabajos (Martínez et al., 2006; Corley et al., 2010), los autores han sugerido que claves químicas provenientes principalmente del hongo simbiote *A. areolatum* ayudan a la hembra parasitoide a optimizar las decisiones de elección del parche a explotar, aun antes de que la hembra arribe al parche (Fischbein et al., 2012).

En relación con la búsqueda de hospedadores y según lo propuesto por Vet y Dicke (1992), la información provista por el pino sería fácil de detectar para el parasitoide pero no confiable, ya que no garantiza la presencia del hospedador. Por su parte, el hospedador puede proveer información confiable pero la detectabilidad es baja especialmente a grandes distancias debido a que las larvas están dentro de la madera de pino, a varios milímetros de la superficie. En cambio, la información derivada del hongo simbiote de *S. noctilio* sería una información confiable y detectable, especialmente a distancias intermedias. Una vez que la hembra de *S. noctilio* inocula el hongo en la madera del pino, este se propaga es través de ella incrementando su tamaño y en consecuencia, una mayor cantidad de compuestos volátiles serán emitidos. La relación del hongo con los parasitoides parece haber surgido antes de la co-evolución entre los Ibalidae y los Siricidae, ya que se ha sugerido que los Siricoidea y las especies parasíticas tuvieron un ancestro en común; una especie fitófaga que se alimentaba parcialmente de hongos (Whitfield, 1998). *Sirex noctilio* no puede prescindir de la simbiosis con el hongo, entonces parece estar atrapado entre este y los enemigos naturales que explotan los volátiles que este emana para localizar a su hospedador.

En el contexto en que *I. leucospides* se desarrolla y desenvuelve, una multiplicidad de estímulos podrían ser utilizados por este parasitoide para localizar a su hospedador. Los pinos liberan una variedad de volátiles y modifican su patrón de emisión en condiciones de estrés y ante el ataque de la avispa de la madera; el parasitoide podría explotar primariamente estímulos provenientes de la planta hospedadora atacada por el insecto plaga (Capítulo II). Debido a que en condiciones poblacionales endémicas, el hospedador presenta una distribución fuertemente agregada, información proveniente del hospedador en estado adulto una vez que este ha localizado el árbol donde oviponer, podría también ser utilizada por el parasitoide para encontrar los parches con huevos y larvas del hospedador (Capítulo II). Se ha observado que las hembras de *I. leucospoides* son atraídas a volátiles del hongo pero no siempre, esto se correlaciona con la presencia de hospedadores dentro de una ventana temporal

factible de ser parasitados. Por ello, la respuesta del parasitoide frente a estos volátiles puede estar sintonizada finamente con el desarrollo del hongo dentro de la madera (Capítulo III). Si bien los conespecíficos le significarían a la hembra que busca hospedadores una potencial competencia por el recurso donde oviponer, dado el contexto de agregación y que las poblaciones de *S. noctilio* son pequeñas durante periodos prolongados, la presencia de otras hembras de *I. leucospoides* sobre un árbol podrían proveerle a la hembra naïve que está buscando hospedadores información sobre la localización de un parche positivo en términos de presencia de estos (capítulo IV). Finalmente, se conoce que *I. leucospoides* es una especie con un índice de ovigenia alto (0,77), es decir que emerge con una importante proporción de su complemento de huevos maduro, dicho índice es esperado (según estudio paralelo realizado en colaboración, ver Anexo 3) para un parasitoide que es incapaz de alimentarse de sus hospedadores en su estadio adulto sino que lo hace de jugos azucarados. Entonces, considerando además su uso como agente de control biológico en plantaciones de pinos en donde el recurso alimenticio es escaso, exploré cómo el estado nutricional del insecto puede influenciar las decisiones conductuales durante la búsqueda de hospedadores (Capítulo IV). En la Figura 1.4, se resume esquemáticamente el escenario de estímulos que modelarían las conductas de búsqueda de hospedadores de *Ibalia leucospoides*.

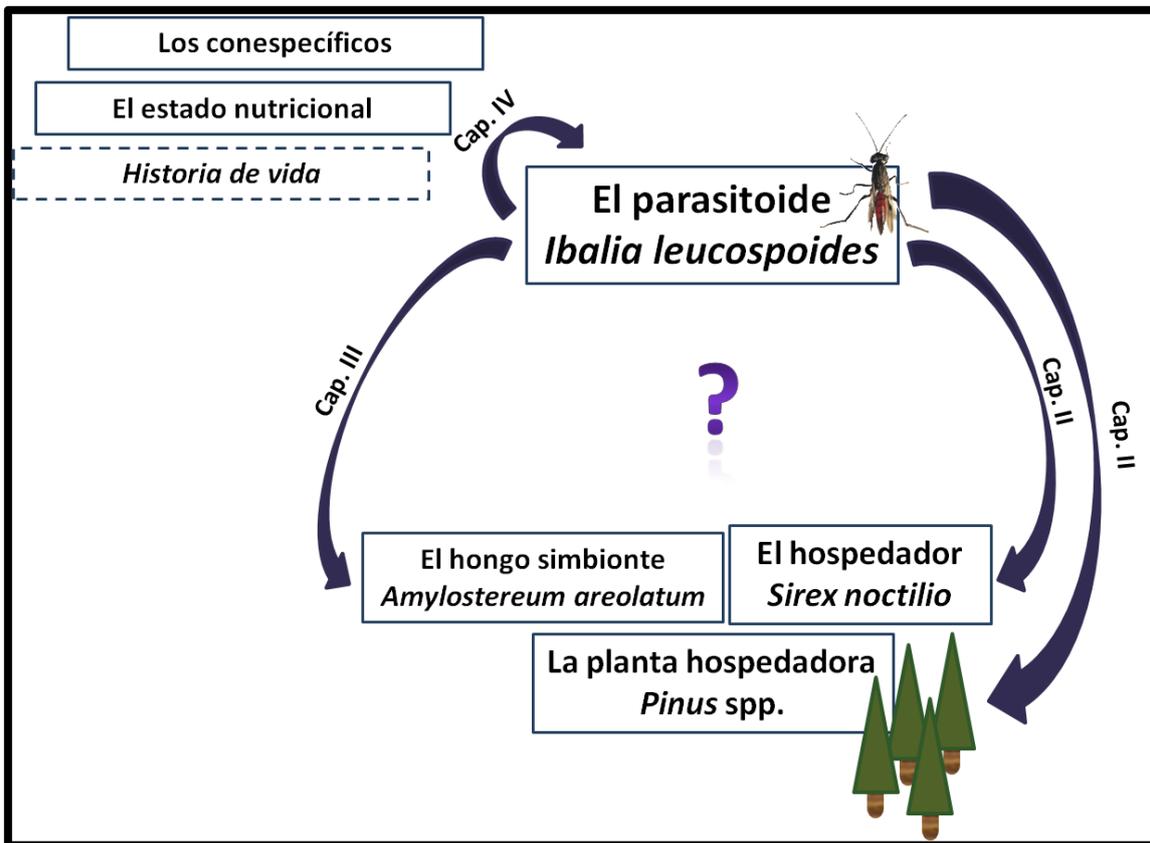


Figura 1.4. Esquema de las interacciones y los factores que pueden influir en el comportamiento búsqueda de hospedadores de *Ibalia leucospoides*.

Objetivo general

El objetivo central de esta tesis fue conocer cuáles son las claves químicas y visuales, producidas por *Sirex noctilio* y su entorno inmediato (el espacio multitrófico), que son efectivamente explotadas por *I. leucospoides* en el proceso de localización de hospedadores. El fin último es contribuir a comprender mejor las variaciones en los porcentajes de parasitismo alcanzados por esta especie de parasitoide en el control biológico de la más importante plaga forestal de Argentina.

Objetivos particulares

Objetivo 1 - (capítulo II). Información provista por el primer (Pinus spp.) y segundo (Sirex noctilio) nivel trófico.

- Conocer si los compuestos volátiles emitidos por árboles de pino de distintas especies sanos y atacados por *S. noctilio* son atractivos para el parasitoide.
- Evaluar la relevancia del entorno en el que se desarrolló la larva en las decisiones de hembras adultas.
- Determinar si las hembras de *S. noctilio* ofrecen señales químicas en su cuerpo que puedan ser utilizadas por el parasitoide para encontrar sitios con hospedadores.

Objetivo 2 - (capítulo III). Variabilidad temporal en la emisión de volátiles de Amylostereum areolatum y su implicancia en la localización del hospedador.

- Determinar los compuestos producidos el hongo *Amylostereum areolatum* de diferentes edades de desarrollo y analizar su responsabilidad en la atracción del parasitoide.

Objetivo 3 -(capítulo IV). La influencia de los conespecíficos (el tercer nivel trófico) y del estado nutricional en el comportamiento de búsqueda de hospedadores.

- Conocer si la presencia de conespecíficos brinda información acerca de la existencia de parches con hospedadores y/o si son determinantes en las decisiones que toma el parasitoide en cuanto a la explotación de ciertos parches.
- Establecer si la respuesta comportamental de las hembras adultas del parasitoide hacia los volátiles del hongo varía en función de su estado alimenticio.

Capítulo II - Información provista por el primer (*Pinus* spp.) y segundo (*Sirex noctilio*) nivel trófico.

Introducción

Entre las claves que utilizan muchos parasitoides para localizar a sus hospedadores se hallan las provistas por las plantas atacadas. Estas producen una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que no participan directamente en su crecimiento, desarrollo y funciones básicas. A este grupo de compuestos se los ha denominado metabolitos secundarios, y en general son específicos para una especie o un grupos de especies relacionadas (Taiz & Zeiger, 2002; Schoonhoven et al., 2005). Se ha sugerido que los metabolitos secundarios tienen una importante función ecológica en las plantas, entre las que se encuentra la de defensa, y muchas de estas sustancias pueden actuar como atrayentes de enemigos naturales (predadores y parasitoides) de los herbívoros que se alimentan de las plantas, minimizando así su daño (Taiz & Zeiger, 2002).

En la búsqueda de hospedadores, numerosas especies de parasitoides explotan compuestos volátiles emitidos por la planta hospedadora o del microhábitat del hospedador (Vet, 1985; Noldus, 1989; Havill & Raffa, 2000; Steidle et al., 2001; Gohole et al., 2003). Las claves provistas por la planta hospedadora son generalmente abundantes y en consecuencia, fáciles de detectar pero no garantizan la presencia del hospedador. El dilema presentado entre la confiabilidad y la detectabilidad muchas veces es enfrentado por los parasitoides a través de la explotación de claves resultantes de la interacción del hospedador con su planta hospedadora (Vet & Dicke, 1992). Las actividades de alimentación y de oviposición por un herbívoro, inducen en la planta respuestas fisiológicas que modifican el patrón de emisión de volátiles cualitativa y cuantitativamente (Turlings et al., 1995; De Moraes et al., 1998; Mumm et al., 2004; Blassioli Moraes et al., 2005; Kugimiya et al., 2010), lo cual se convierte en una información confiable y a su vez en una señal fácil de detectar para el parasitoide. Muchos parasitoides de herbívoros han desarrollado la capacidad de distinguir entre volátiles de la planta inducidos por herbivoría de aquellos emanados por la planta hospedadora intacta (De Moraes et al., 1998; Powell et al., 1998; Takabayashi et al., 1998; Dicke, 1999; Dicke & van Loon, 2000; Blassioli Moraes et al., 2005; Mumm &

Hilker, 2006; Kugimiya et al., 2010). Asimismo, el comportamiento de búsqueda de hospedadores basado en claves químicas puede ser innato o aprendido (Giunti et al., 2015). En numerosas especies de parasitoides la experiencia modifica el comportamiento de búsqueda de hospedadores (Guerrieri et al., 1997; Takasu & Lewis, 2003; Langley et al., 2006). El aprendizaje asociativo encontrado en los parasitoides puede explicarse por la necesidad de localizar hospedadores en un ambiente en constante cambio (Godfray, 1994), es por ello que la información adquirida por la experiencia es crucial para mejorar el desempeño reproductivo de los insectos (Dukas, 2008). Las claves químicas asociadas con el complejo planta-hospedador pueden ser aprendidas tanto durante los estadios pre-imaginales, la emergencia y/o las actividades de búsqueda (Guerrieri et al., 1997; Takasu & Lewis, 2003; Langley et al., 2006; Gutiérrez-Ibáñez et al., 2007; Takemoto et al., 2009).

Entre los volátiles liberados por distintas especies de pino, los terpenos (principalmente los monoterpenos), un grupo de metabolitos secundarios, son los más abundantes (Sullivan et al., 2000; Manninen et al., 2002; Mumm et al., 2003, 2004; Santos et al., 2006; Fan et al., 2007; Thoss et al., 2007). La composición de los terpenos es diversa, variando ampliamente dentro y entre especies. Dicha variación puede estar relacionada a la genética específica de cada especie o bien ser regulada por factores ambientales impactando a la fisiología del individuo (Manninen et al., 2002; Thoss et al., 2007). Al igual que ocurre con otros grupos de plantas que sufren ataques de herbívoros, los pinos modifican su patrón de emisión de volátiles ante el ataque de un herbívoro o algún daño mecánico (Mumm et al., 2003, 2004; Mumm & Hilker, 2006; Fan et al., 2007) y esta variación en la emisión de volátiles puede ser utilizada por los enemigos naturales de los herbívoros en la localización de hospedadores (Hilker et al., 2002; Mumm & Hilker, 2005, 2006). Pocos trabajos han analizado las diferencias entre la emisión de volátiles de pinos atacados por la avispa de la madera *S. noctilio* y pinos sanos (Böröczky et al., 2008). Particularmente, el trabajo de Böröczky y colaboradores (2008) mostró variaciones en el patrón de volátiles emanados por *P. sylvestris* ante el

ataque de esta avispa, produciendo un incremento en los monoterpenos más abundantes (α -pineno, β -pineno y δ -3-careno).

Los parasitoides que oviponen en hospedadores ocultos, como es el caso de *I. leucospoides*, pueden utilizar información que no proviene directamente de sus hospedadores, ni producida por la interacción de estos con su planta hospedadora, sino que pueden explotar una vía alternativa usando infoquímicos provenientes de un estadio diferente al que parasitan, como los usados en la comunicación entre los herbívoros adultos (Vinson, 1984; Hoffmeister & Gienapp, 1999). A este tipo de estrategia, en la cual son explotados infoquímicos de una comunicación intraespecífica por un tercer organismo para su propio beneficio y en detrimento de los organismos que se comunican intraespecíficamente se la ha denominado espionaje químico (ver Fatouros et al. 2008). Feromonas sexuales, de agregación (Noldus, 1989; Noldus et al., 1991; Stowe et al., 1995; Reddy et al., 2002; Fatouros et al., 2008), de marcado (Hoffmeister & Gienapp, 1999), escamas de las alas del adulto (Noldus, 1989; Fatouros et al., 2005) y trazas químicas dejadas durante la caminata del adulto (Colazza et al., 1999; Borges et al., 2003; Salerno et al., 2006) pueden ser explotadas por los parasitoides en este espionaje químico. Esta información puede ser percibida a grandes distancias, si el compuesto químico es de alta volatilidad (semioquímicos de largo rango), o detectados a cortas distancias o a través del contacto si la volatilidad de los mismos es baja (semioquímicos de corto rango y de contacto), como es el caso de las feromonas de marcado, y los presentes en las escamas de las alas y las trazas químicas (Fatouros et al., 2008).

La avispa de la madera *S. noctilio* presenta una dinámica poblacional de pulsos eruptivos (Berryman, 1987), que se caracteriza por un largo periodo donde la población permanece en densidades relativamente bajas (condiciones endémicas), sucedido por un crecimiento repentino provocando un estallido poblacional denominado pico eruptivo (niveles epidémicos) (Corley et al., 2002; Corley & Villacide, 2005). En condiciones endémicas (bajo nivel de ataque), el patrón espacial de árboles atacados por *S. noctilio* dentro de la plantación de pino es fuertemente agregado en

las primeras etapas de la colonización. Este patrón espacial tiene una tendencia a incrementar la agregación con el aumento de los árboles atacados a lo largo de los años mientras la población de la avispa esté en bajas densidades (Corley et al., 2007). La agregación de los ataques de las hembras de *S. noctilio* puede deberse al comportamiento de oviposición de *S. noctilio* en función al estado fisiológico del árbol de pino, más precisamente relacionado con la presión osmótica del fluido del mismo (Madden, 1974). A su vez, la agregación de los ataques puede favorecer las condiciones de crecimiento del hongo simbiote, *A. areolatum*, lo que llevaría a la producción de descendencia más grande y por lo tanto mejorar el desempeño poblacional (Corley et al., 2007), ya que individuos de mayor tamaño cargan mayor cantidad de huevos maduros al momento de la emergencia (Madden, 1974). En un reciente trabajo se demostró que las hembras de *S. noctilio* son atraídas a los volátiles del hongo *A. areolatum*, indicando que esta avispa utilizaría estos volátiles como una sinomona para orientarse hacia arboles ya atacados, comportamiento que explicaría la agregación observada en el campo (Fernández Ajó et al, 2015). En este contexto de agregación espacial, donde un alto porcentaje de hembras atacan árboles ya infestados, el parasitoide podría explotar claves provenientes de las hembras de *S. noctilio* (estadio no atacado), ya que es probable encontrar en esos árboles los estadios aptos para la oviposición.

Los objetivos del presente capítulo fueron evaluar, en primer lugar, el comportamiento de hembras parasitoides hacia algunos de los volátiles que es sabido incrementan su abundancia en ciertas especies de pino ante un ataque de *S. noctilio*. En segundo lugar, se deseó conocer si los compuestos volátiles emitidos por pinos de diferentes especies sanos y atacados son atractivos para el parasitoide, así como también la relevancia del entorno larval en las decisiones de las hembras parasitoides adultas. Aquí se midió la respuesta del parasitoide hacia dos especies de pino presentes en la Patagonia con y sin hongo, siendo una de ellas sobre la que se desarrolló el parasitoide. En tercer lugar se desea explorar la relevancia de estímulos olfativos provenientes de hembras adultas de *S. noctilio*.

Materiales y métodos

Cría de insectos

Tanto la cría como el mantenimiento de las hembras de *I. leucospoides* utilizadas en todos los bioensayos del presente estudio (y en resto de los capítulos de esta tesis) se realizaron de acuerdo al siguiente protocolo. Los insectos utilizados en el presente estudio, tanto *I. leucospoides* como *S. noctilio*, fueron obtenidos de árboles de pino (*Pinus contorta* var. murrayana y *Pinus ponderosa ponderosa*) colectados de plantaciones localizadas en el noroeste de la Patagonia Argentina, durante los años 2008 a 2012. Los árboles infestados, reconocidos por el follaje clorótico y gotas de resina en el tronco principal (señales típicas del ataque de la avispa de la madera) fueron talados, cortados en troncos de 1 metro de longitud y almacenados en jaulas en condiciones ambientales con un régimen de temperatura e iluminación naturales (Figura 2.1).



Figura 2.1. Jaulas de cría de *S. noctilio* e *I. leucospoides*. Dentro de las jaulas se almacenaban los troncos infestados recolectados en las plantaciones de pino. Fotos de la autora.

Como se hizo mención en el párrafo anterior, los pinos seleccionados para ser cortados y almacenados en las jaulas presentaban indicadores de la presencia *S. noctilio*, sin embargo la ovipostura de *I. leucospoides* no deja indicadores reconocibles a nuestra vista, es por ello que hasta el momento de la emergencia de adultos es imposible establecer la cantidad de ejemplares de *I. leucospoides* que se van a obtener para la experimentación. Esto en ocasiones, impactó en un bajo número de réplicas, concretamente en algunas temporadas donde el éxito de la identificación de árboles con *I. leucospoides* fue bajo.

Durante el periodo de emergencia de los adultos (la temporada de vuelo), los insectos fueron colectados de las jaulas a intervalos diarios, todas las mañanas a primera hora, para minimizar el tiempo de residencia en las jaulas de cría y el contacto con conespecíficos. Las hembras parasitoides colectadas fueron mantenidas a temperatura ambiente en pequeños potes plásticos traslucidos (8 cm de diámetro) conteniendo un trozo de algodón humedecido individualmente, hasta la realización de los ensayos. En estos se utilizaron hembras parasitoides de 24 a 48 horas desde el momento de emergencia de los troncos. Las hembras de *S. noctilio*, de las que se obtuvieron las esporas del hongo *A. areolatum* y se realizaron extractos, fueron colectadas y conservadas a 7°C en oscuridad. Salvo otra indicación, las hembras utilizadas en los bioensayos de esta tesis fueron expuestas a dos machos durante 24 hs luego de su emergencia, a fin de asegurar su fecundación.

Evaluación de la actividad de *I. leucospoides* ante volátiles de pinos

Con el fin de establecer si las emisiones del pino pueden proveerle información a la hembra parasitoide durante su búsqueda, se realizaron ensayos de actividad del parasitoide utilizando terpenos cuya producción se ve incrementada en ciertas especies de pino ante un ataque de la avispa de la madera. Para dichos bioensayos se utilizó una arena estática consistente en una caja rectangular de acrílico (largo: 14 cm; ancho: 7,5 cm; alto: 7 cm), con un entrepiso perforado (una plancha de acrílico con 21 agujeros de 0,22 mm de diámetro cada uno) a 2 cm del piso, la misma era desmontable para facilitar la limpieza de la caja (Figura 2.2).



Figura 2.2. Caja de acrílico, con el piso perforado, donde se llevaron a cabo los bioensayos de actividad. Fotos de Valeria Fernández Arhex.

Una vez dentro de dicha arena experimental, el insecto era capaz de desplazarse sin tomar contacto con la fuente de olor. La fuente de olor se colocó dentro de un frasco que se adosaba en el centro inferior de la caja, de tal forma que los volátiles se esparcían por toda la arena experimental. La tapa de la caja, de acrílico transparente fue trazada con tres líneas horizontales y tres verticales equidistantes, formando una grilla de 9 rectángulos de igual tamaño. La actividad del parasitoide fue cuantificada como la cantidad de cruces de las líneas de la grilla que realiza el parasitoide durante su estadía en la arena.

Una hembra de *I leucospoides* fue introducida en la caja y su actividad registrada durante 5 minutos. Los estímulos utilizados fueron: 10 μ l de α -pineno 98,5% (Sigma-Aldrich), 10 μ l b- β -pineno 99% (Sigma-Aldrich) colocados sobre un papel de filtro de 10 mm x 25 mm y un control (papel de filtro sólo). Los papeles de filtro con o sin terpenos fueron colocados en papel de filtro dentro del frasco mencionado. Luego de cada réplica la caja era lavada y secada, y la fuente de estímulo se cambió cada cinco réplicas. Los experimentos fueron llevados a cabo bajo luz natural y a humedad (50 ± 5 %) y temperatura ambiente (22 ± 2 °C). Los datos de actividad fueron comparados entre tratamientos mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía o factor. Un total de 20 hembras fueron evaluadas para cada tratamiento.

Ensayos de preferencia de *I. leucospoides* a olores de pinos de diferentes especies sanos y atacados.

Con el objetivo de evaluar la preferencia de *I. leucospoides* a volátiles emitidos pinos de diferentes especies sanos y atacados, se llevaron a cabo pruebas en un olfatómetro de cuatro vías (Pettersson, 1970; Vet et al., 1983). El mismo consiste de una arena central y cuatro brazos simétricos (Figura. 2.3). Desde el centro al extremo de cada uno de los brazo hay una longitud de 17,5 cm. Sobre la arena fue colocado un vidrio de 6mm de espesor (37 cm x 37 cm) creando un sello hermético. El aire fluye desde los extremos de los brazos (0,75 l/min/brazo) hacia una abertura central por la cual sale del sistema. Antes de ingresar al olfatómetro, el aire era filtrado al pasar por 0,5 Kg de carbón activado y humedecido por su paso a través de 0,5L de agua destilada. La arena se iluminó con una tira de luz LED de 3 metros de longitud (60 W, Alic S.A., Argentina) dispuesta de manera circular y centrada al olfatómetro a 150 cm por encima de la arena experimental.



Figura 2.3. Olfatómetro de cuatro vías usado en los bioensayos de evaluación de la preferencia a volátiles asociados a la planta hospedadora inoculada o no con el hongo simbiote. Foto de la autora.

Las fuentes de olor, las cuales consistían en tarugos de madera (8 x 10 mm) extraídos con un sacabocados el mismo día de las pruebas, eran: (i) *Pinus contorta* var. murrayana; (ii) *Pinus ponderosa*; (iii) *P. contorta* var. murrayana inoculado con hongo simbiote *A. areolatum* y (iv) *P. ponderosa* inoculado con hongo simbiote *A. areolatum*. Para obtener los tarugos de pino inoculados con hongo, en primer lugar se hizo oviponer a hembras de *S. noctilio* en troncos de pino de *P. contorta* y *P. ponderosa* de aproximadamente 30cm de longitud, luego de dos semanas a los troncos se les removió la corteza para encontrar los agujeros de oviposición realizados por la avispa de la madera, posteriormente con un sacabocados se extrajo el tarugo de madera asegurando que el agujero de oviposición quede en el centro del mismo. Un sólo tarugo de madera era colocado en una de las cámaras. Después de cada prueba, el olfatómetro se lavaba con agua y alcohol. Las fuentes de olor se renovaban luego de cada réplica y se rotaban cada cuatro réplicas acorde a un esquema de rotación pre-definido para minimizar los sesgos de orientación.

Las fuentes de olor eran colocadas dentro de cuatro cámaras cilíndricas de vidrio (longitud: 7 cm, circunferencia: 3 cm) conectadas a cada uno de los brazo del olfatómetro y a las entradas de aire del dispositivo. Dos fuentes de olor eran presentadas simultáneamente a una hembra parasitoide. La hembra una vez introducida en la arena se dejaba aclimatar durante un minuto y luego se registraba su comportamiento durante 10 minutos.

Se registró el movimiento de las avispas durante 10 minutos con una cámara de filmación (Genius Facecam 1000) ubicada a 150 cm por encima del olfatómetro. Los registros se archivaban en el formato .avi a 5 cuadros/s. La posición (las coordenadas X-Y en pixeles) de las avispas fue determinadas para cada cuadro a través de un análisis realizado con el programa ImageJ (Rasban et al. 1997-2016) en combinación con el wrMTrck (Nussbaum-Krammer et al., 2015). Una vez que la posición de las avispas fue determinada para cada cuadro, se calculó el porcentaje del tiempo que el insecto estuvo en cada brazo del olfatómetro (excluyendo el tiempo en el área central,

definida como un cuadrado de 16 cm de lado centrado en el dispositivo). Debido a que los datos no cumplieron con la suposición de normalidad, los porcentajes fueron comparados mediante el test no paramétrico de suma de rangos de Wilcoxon.

Las fuentes de olor se presentaron de la siguiente manera: (i) *P. contorta* vs. aire; (ii) *P. ponderosa* vs. aire; (iii) *P. contorta* vs. *P. ponderosa*; (iv) *P. contorta* vs. *P. contorta* inoculado con hongo simbiote y (v) *P. contorta* inoculado con hongo simbiote vs. *P. ponderosa* con inoculado hongo simbiote. Para todos los tratamiento se evaluó la respuesta de 12 hembras, salvo para el de *P. contorta* vs. *P. ponderosa* donde 11 hembras fueron testeadas. Todas las hembras emergieron de troncos de pino de la especie *P. contorta* var. murrayana.

Respuesta de *I. leucospoides* hacia extractos de *S. noctilio*

Descripción del dispositivo

Se utilizó un olfatómetro en forma de “Y” (Figura 2.4) para evaluar la respuesta olfativa de hembras de *I. leucospoides* a extractos de hembras de *S. noctilio* preparados con etanol o hexano. Este olfatómetro consiste en un tubo que presenta un brazo mayor de 13 cm y dos brazos menores de 7 cm y un diámetro de 2 cm. En el extremo mayor del tubo fue conectada una bomba de aire creando un flujo de 1 cm/s desde los brazos menores al mayor. Antes de que el aire ingrese al tubo fue filtrado con 100 gr de carbón activado y luego fue re-humedecido por su paso a través de un trozo de algodón húmedo. Los estímulos fueron colocados en cajas de acrílico (7 x 7 x 7 cm) las cuales fueron acopladas en los extremos de los brazos del olfatómetro. Para evitar asimetrías visuales, este dispositivo se puso adentro de una caja de acrílico blanco (50 x 50 x 25 cm), cubierta por una tapa desmontable de color rojo translucido (Martínez et al., 2006).

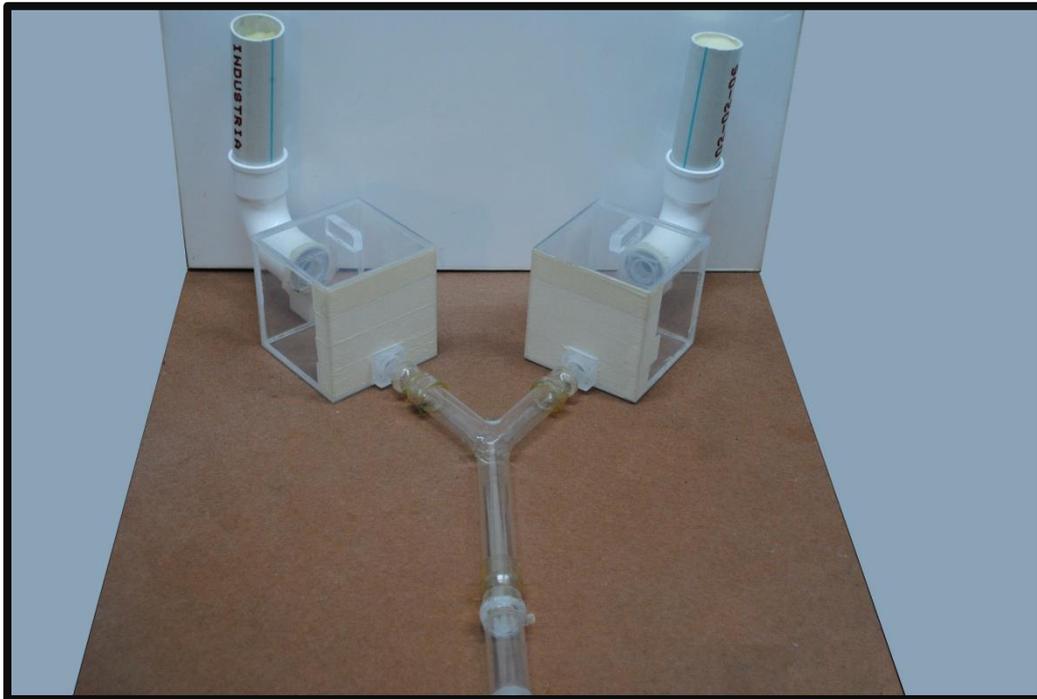


Figura 2.4. Olfatómetro en forma de “Y”. La hembra era introducida en la base del olfatómetro y en las cajas se colocaban los estímulos. Foto de la autora.

En cada prueba, una sola hembra parasitoide fue introducida en la base del olfatómetro, y se le dio un corto periodo de adaptación de 1 minuto y un máximo de 15 minutos para que elija entre los dos brazos del mismo. Se consideraba una elección válida cuando la avispa cruzaba una línea imaginaria 5 cm adentro de cada brazo menor. Luego de cada prueba, el olfatómetro fue lavado, secado y ventilado para evitar resultados pseudoreplicados (Ramírez et al., 2000). Adicionalmente, el olfatómetro fue rotado dentro de la caja de acrílico y la posición de las cajas con los estímulos intercambiada entre los brazos para evitar un sesgo en la elección debido a las asimetrías en el dispositivo experimental.

Extractos de hembras de Sirex noctilio

Los extractos de las hembras de *S. noctilio* se realizaron independientemente con dos solventes: Por un lado se utilizó etanol (Alcohol Etílico Absoluto, pureza 99.5% Laboratorios Cicarelli) y por el otro, hexano (n-hexano para cromatografía, pureza 98% Lichrosolv). El etanol es un componente de polaridad intermedia por lo que en este se

disuelven compuestos de esa misma polaridad, en cambio en el hexano se disuelven compuestos no polares como las ceras y los aceites.

El protocolo para la extracción fue adaptado de (Castelo & Lazzari, 2004; Crespo, 2011). Debido a que no hay información sobre la atracción de *I. leucospoides* a estímulos provenientes del hospedador adulto, se realizaron extractos de las hembras enteras. En primer lugar se inmovilizaron las hembras colocándolas en un congelador por 30 minutos, luego se las machacó en un mortero y se les agregó el solvente (etanol o hexano) continuando con el machacado, se realizaron tres lavados con el solvente. Los extractos fueron almacenados y mantenidos en un congelador a -12°C para evitar su degradación. Los mismos pueden permanecer en un congelador por 3 meses (Crespo, 2011). Al igual que los extractos, los solventes a utilizar en los ensayos de olfatometría fueron mantenidos en frío.

Pruebas de preferencia

Los extractos y los solventes (control: hexano o etanol) fueron colocados en las cajas de acrílico adosadas a los extremos de los brazos del olfatómetro de dos vías. En una de las cajas se colocaron 500 µl del extracto, este volumen representa el extracto de una avispa. En la otra caja se colocó el solvente con el que se había realizado el extracto (etanol o hexano) a manera de control. Una hembra de *I. leucospoides* era introducida en la base del olfatómetro, se la dejó un minuto para que se adapte antes de permitirle el acceso a los brazos del olfatómetro y un máximo de 15 minutos para su elección. Luego de cada prueba el olfatómetro era lavado y ventilado, los estímulos fueron renovados después de cada réplica. Los datos fueron analizados mediante un prueba binomial. La preferencia de 22 hembras fue testeada con el extracto de hexano y 14 con el extracto de etanol.

Resultados

Evaluación de la actividad de *I. leucospoides* ante volátiles de pinos

Las hembras parasitoides generalmente presentaron algún nivel de actividad en la arena experimental, sólo una avispa no mostró actividad dentro de la caja experimental. El nivel de actividad de las hembras parasitoides fue similar para todos los tratamientos, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de cruces de las líneas de la grilla (ANOVA $F=0.11$, $df=2$, $p=0.88$; α -pineno= $30,3 \pm 2,6$ líneas cruzadas, $n= 20$; β -pineno= $30,6 \pm 4,1$ líneas cruzadas, $n= 20$; control= $32,8 \pm 4,6$ líneas cruzadas, $n= 20$; Figura 2.5).

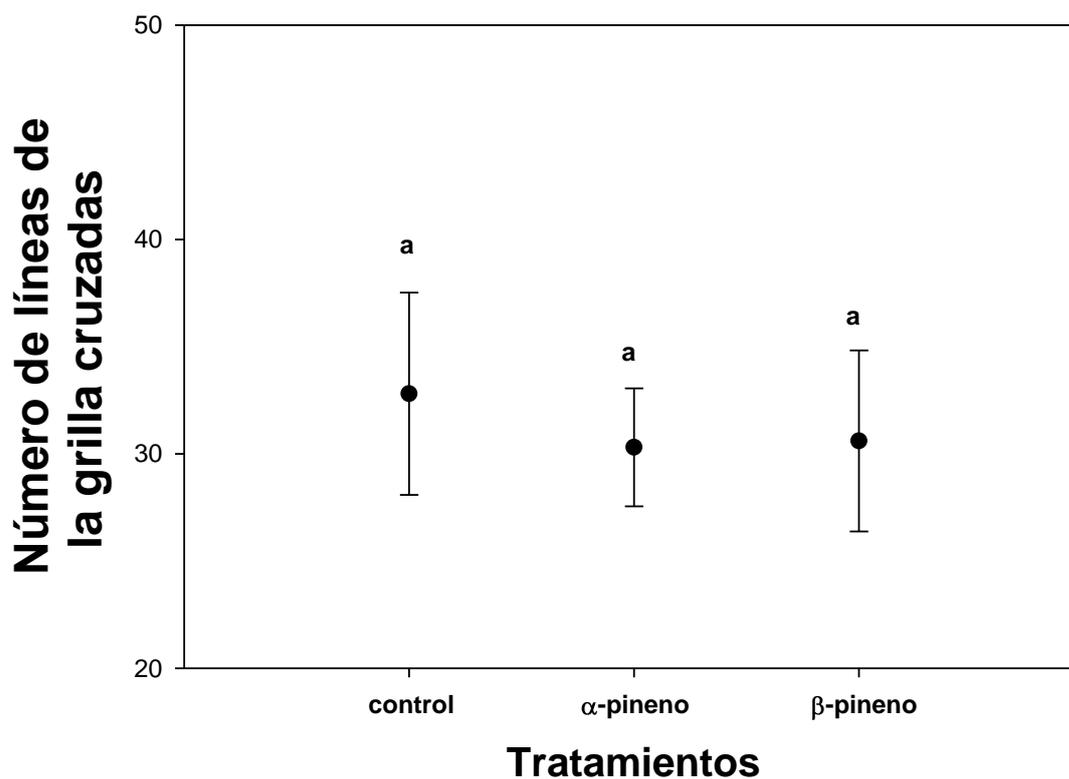


Figura 2.5. Número de cruces de líneas (media \pm ES) de la grilla realizados por *I. leucospoides* para los tres tratamientos (α -pineno; β -pineno y control) (ANOVA $F=0.11$, $df=2$, $p=0.88$; las mismas letras por encima de la media \pm ES indican que no hay diferencias entre los tratamientos).

Ensayos de preferencia de *I. leucospoides* a olores de pinos de diferentes especies sanos y atacados.

No se observaron diferencias significativas en el comportamiento de *I. leucospoides* dentro del olfatómetro de 4 vías (utilizado con dos estímulos) al presentarle simultáneamente los siguientes estímulos olfativos: *P. contorta* vs. aire ($P=0,52$, $\chi^2=0,40$, $n=12$), *P. ponderosa* vs. aire ($P=0,69$, $\chi^2=0,16$, $n=12$), *P. contorta* vs. *P. ponderosa* ($P=0,17$, $\chi^2=1,81$, $n=11$) y *P. contorta* inoculado con hongo simbiote vs. *P. ponderosa* inoculado con hongo simbiote ($P=0,58$, $\chi^2=0,30$, $n=12$). Se encontraron diferencias significativas al presentarle simultáneamente *P. contorta* sano vs. *P. contorta* inoculado con hongo simbiote ($P=0,017$, $\chi^2=5,6$, $n=12$), contrario a lo que se esperaba, las hembras permanecieron un mayor porcentaje de tiempo ($64 \pm 0,8\%$) en las ramas del olfatómetro conectadas con la fuente de olor de *P. contorta* sano (Figura 2.6).

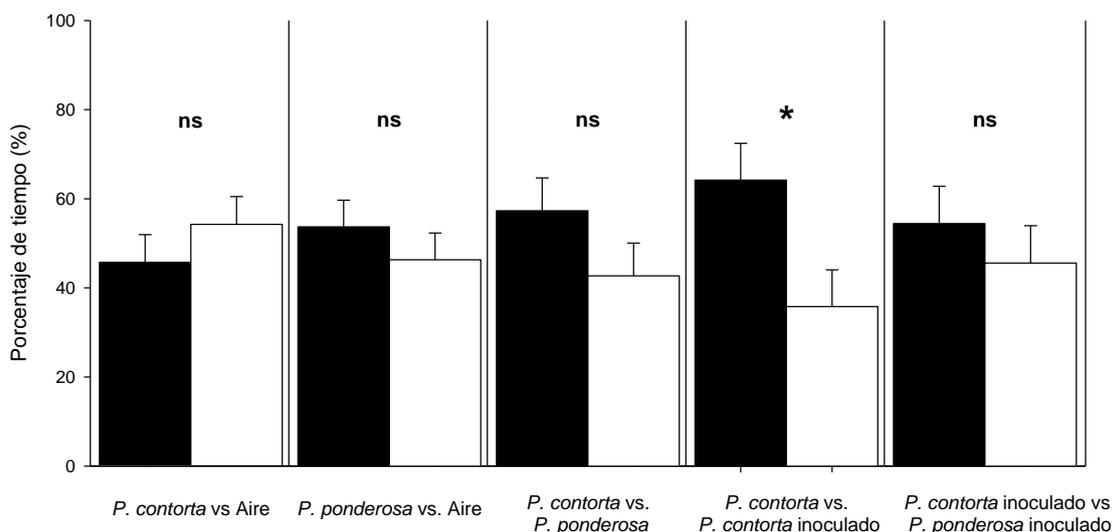


Figura 2.6. Porcentaje de tiempo (media \pm ES) que permanecen las hembras de *I. leucospoides* en los brazos con los distintos estímulos presentados, los mismos fueron ofrecidos al parasitoide de la siguiente manera: (i) *P. contorta* vs. aire; (ii) *P. ponderosa* vs. aire; (iii) *P. contorta* vs. *P. ponderosa*; (iv) *P. contorta* vs. *P. contorta* inoculado con hongo simbiote y (v) *P. contorta* inoculado con hongo simbiote vs. *P. ponderosa* con inoculado hongo simbiote (test de Wilcoxon, ns=no significativo ($p>0,05$), * = $p<0,05$).

Respuesta de *I. leucospoides* hacia extractos de *S. noctilio*

La mayoría de las hembras eligieron alguno de los brazos del olfatómetro (73,4%), un 26,5% no mostró preferencia por ninguno de los estímulos. Las hembras no mostraron preferencia por el extracto obtenido con hexano (test binomial: $p=0,28$; $n=22$ Figura 2.7), un 63,6% eligieron el extracto y un 36,4 el papel de filtro que contenía solvente. Tampoco mostraron preferencia por el extracto obtenido con etanol (test binomial: $p=1$; $n=14$ Figura 2.7), la misma cantidad de hembras eligieron tanto el extracto como el papel de filtro que contenía el solvente, particularmente en esta prueba pocos ejemplares pudieron ser testeados.

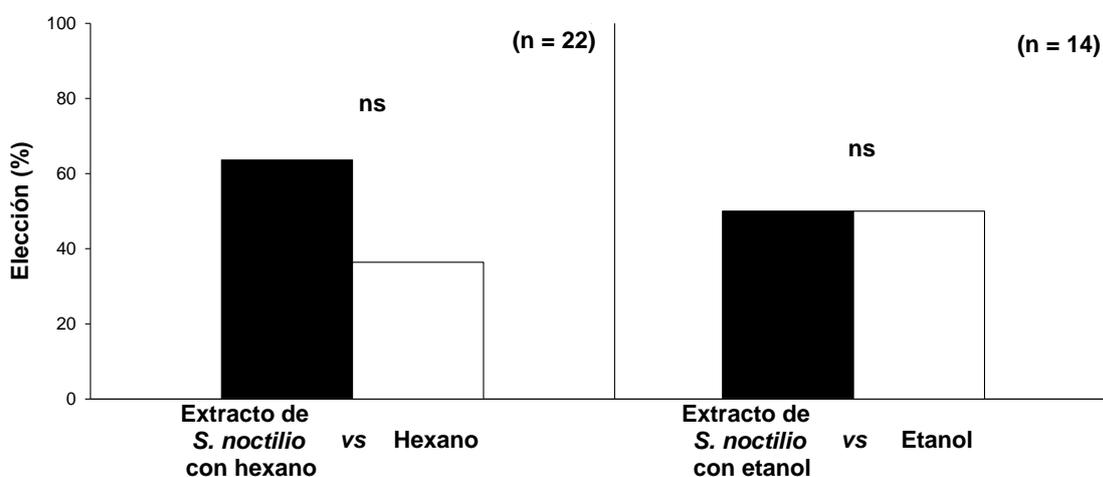


Figura 2.7. Porcentaje de hembras de *Ibalia leucospoides* respondiendo hacia los extractos de *S. noctilio* obtenidos con hexano o etanol. Las barras indican el porcentaje de elección, ns = no significativo ($p>0.05$; test binomial), entre paréntesis se indica el total de avispa testeadas para cada tratamiento.

Discusión

Uno de los objetivos de este capítulo fue evaluar si terpenos (α y β -pineno) que se liberan en mayor cantidad ante un ataque de la avispa de la madera modifican el comportamiento del parasitoide *I. leucospoides*. Los resultados indican que el parasitoide no modificó su nivel de actividad ante la presencia de dichos compuestos.

En este trabajo se utilizaron los terpenos puros. Las proporciones de los volátiles liberados varían en función de distintos factores (como por ejemplo la luz, el agua y los nutrientes) y dependiendo de la parte del árbol que se estudie (Latta et al. 2000; Manninen et al. 2002; Hakola et al. 2006; Thoss et al. 2007; Böröczky et al. 2008; Keefover-Ring & B 2010, entre otros). Más allá de esta variabilidad, el terpeno que liberan en más proporción en muchas especies de pino es el α -pineno (Pettersson et al., 2000; Manninen et al., 2002; Mumm et al., 2004; Santos et al., 2006; Fan et al., 2007; Böröczky et al., 2008). Se ha demostrado que dicho compuesto se libera en mayores cantidades en ciertas especies de pino en condiciones de estrés (Fan et al., 2007) y ante el ataque de la avispa de la madera *S. noctilio* (Böröczky et al., 2008). Se esperaba entonces que este compuesto esté involucrado en las interacciones entre los organismos relacionados a pinos, como se lo ha registrado participando en la atracción de escarabajos de la corteza y de sus depredadores, en sinergia con feromonas de agregación de los primeros o solo (Erbilgin & Raffa, 2000, 2001; Erbilgin et al., 2003), además de afectar el comportamiento de *Sirex noctilio* (Madden, 1988).

En este trabajo los terpenos fueron evaluados individualmente. Ciertos parasitoides modifican su comportamiento ante la presencia de un único compuesto (Greany et al., 1977; Dicke et al., 1984; Du et al., 1998), aunque en otros la presencia de algún compuesto en particular puede inducir un respuesta sinérgica junto con los volátiles provenientes del hábitat del hospedador (Dicke et al., 1984; Mumm & Hilker, 2005). Asimismo, en la arena estática sólo se puede observar una modificación en la actividad del parasitoide, pero no se puede observar si el estímulo produce una respuesta direccional.

Al evaluar el entorno donde se desarrolla y desenvuelve el parasitoide, no se encontró evidencia sobre la existencia de estímulos provenientes de la planta hospedadora con y sin hongo inoculado, que modifiquen el comportamiento del parasitoide. Las hembras no mostraron una respuesta sesgada cuando se presentaba pino sano de cualquiera de las dos especies vs. aire (*P. contorta* vs. aire; *P. ponderosa* vs. aire),

tampoco cuando se presentaban los volátiles de pino de las dos especies sano (*P. contorta* vs. *P. ponderosa*) o con el hongo inoculado de manera simultánea (*P. contorta* con hongo simbiote vs. *P. ponderosa* con hongo simbiote). Sólo se observaron diferencias significativas entre *P. contorta* vs. *P. contorta* con hongo simbiote, y a diferencia de lo esperado, el porcentaje de tiempo que las hembras pasan en las ramas del olfatómetro conectadas a la fuente de pino sano fue mayor que en las del pino atacado. Este resultado fue inesperado, debido a que en diversos estudios se ha demostrado la preferencia que presentan las hembras de *I. leucospoides* a los volátiles de *A. areolatum*, tanto en un medio de cultivo como en troncos (Madden, 1968; Martínez et al., 2006; Fischbein et al., 2012). Como las oviposiciones de *S. noctilio* fueron realizadas en el laboratorio en troncos de 30 cm aproximadamente, probablemente las condiciones para el desarrollo del hongo *A. areolatum* no hayan sido las favorables. Una de las posibles causas podría haber sido el contenido de humedad, este es importante para el establecimiento y el crecimiento del mismo, teniendo que ser este intermedio (Morgan 1968; Coutt & Dolezal 1965), algo que no se midió en el presente estudio. Durante el desarrollo larvario y la emergencia, este parasitoide parece no haber asociado olores relacionados con el complejo planta-hospedador, ya que no se observó una preferencia a los olores asociados al contexto donde emergió (*P. contorta* var. *murrayana*)

En tercer lugar, se realizaron estudios para establecer si extractos de hembras de *S. noctilio* enteras podrían proporcionar información relevante al parasitoide en la búsqueda de hospedadores. Si bien *I. leucospoides* parasita principalmente huevos maduros y larvas de los primeros estadios de la avispa de la madera, la agregación de su hospedador en condiciones endémicas lleva a que individuos en estadios inmaduros se desarrollen en un mismo árbol y que hembras de *S. noctilio* ovipongan en árboles que presenten estadios inmaduros atacados por este parasitoide, es por ello que claves provenientes de las hembras de la avispa de la madera, como feromonas sexuales o de marcado entre otras, podrían ser utilizadas por las hembras de *I. leucospoides* para localizar el hábitat del hospedador. En este trabajo se realizaron

extractos de la hembra de *S. noctilio* con solventes que extraen compuestos químicos de distinta polaridad.

Mediante el extracto realizado con hexano un 63,6% de las hembras parasitoides eligieron el brazo del olfatómetro conteniendo el extracto de *S. noctilio*, pero las diferencias no resultaron estadísticamente significativas, probablemente con un mayor número de avispas testeadas las diferencias resulten positivas. Lo mismo se obtuvo en las pruebas realizadas con extracto de etanol, la misma cantidad de las avispas testeadas eligió entre el brazo conteniendo el extracto de *S. noctilio* y el control (sólo el solvente), en este ensayo pocas avispas fueron testeadas. Con un mayor número de avispas testeadas se podría llegar a un resultado más contundente, lo cual no fue factible debido a la dificultad de criar a estas avispas en el laboratorio.

Mediante el hexano se extraen compuestos químicos no polares como ceras y aceites. Las ceras que forman una capa en la cutícula de los insectos les dan protección y previenen la desecación, siendo la primera barrera de penetración de químicos del ambiente, además juegan un rol importante en la comunicación en los insectos (Klowden, 2007). Los hidrocarburos de la cutícula juegan un rol importante en el reconocimiento a nivel compañera de nido, casta y sexo en los insectos sociales (Wagner et al., 2000; Lenoir et al., 2009; Campos et al., 2012). En el parasitoide de áfidos *Aphidius rhopalosiphi*, extractos epicuticulares desencadenan un comportamiento de ataque en las hembras (Muratori et al., 2006). Debido a su alto peso molecular (Klowden, 2007), y por ende su baja volatilidad, son detectados casi exclusivamente a través del contacto directo con la antena o con el ovipositor. Sin embargo, en el presente trabajo se evaluó el reconocimiento de claves provenientes del hospedador adulto sin tener contacto directo con la fuente. Otros estudios que involucren el contacto directo con la fuente deben llevarse a cabo a fin de conocer si la hembra de *S. noctilio* presenta en su cutícula claves que sean reconocidas por el parasitoide que le indiquen posibles parches con los estadios explotados.

Poco se conoce acerca de la comunicación en las avispas del sub-orden Symphyta, al cual la familia Siricidae pertenece. Particularmente en *S. noctilio*, Böröczky y colaboradores (2009) han detectado en la cutícula de la hembra una feromona sexual que induce en los machos intentos de cópula, tres mono-alquenos fueron identificados como responsables de esta respuesta. Dichos compuestos, extraídos con hexano, están constituidos por una larga cadena de carbonos, y debido a que son moléculas lo bastante grandes como para ser volátiles, sólo pueden ser detectadas a través del contacto directo. En los ensayos realizados en el presente capítulo, también se utilizó hexano en la preparación de extractos de la hembra de *S. noctilio*, sin embargo se realizó un extracto del insecto entero y no un lavado de su cutícula, además no se permitió el contacto directo de los parasitoides con el extracto. Para poder evaluar si las hembras parasitoides responden de manera diferenciada a la feromona sexual proveniente de la hembra de su hospedador, pruebas que permitan el contacto directo con el extracto deberían ser llevadas a cabo.

A continuación se detallan los resultados más relevantes de este capítulo:

- No se encontraron evidencias de una respuesta hacia el α y β pineno. Estos terpenos incrementan su emisión en árboles de ciertas especies de pino atacados por *S. noctilio*.
- No se encontraron evidencias de que las hembras de *Ibalia leucospoides* respondan diferencialmente a pinos de diferentes especies atacados con *S. Noctilio*, descartándose un efecto de condicionamiento en etapas larvales.
- No se encontraron evidencias de que *Ibalia leucospoides* utilice información proveniente del hospedador adulto. No obstante, este ensayo posee poca potencia y debería replicarse mejor.

Capítulo III - Variabilidad temporal en la emisión de volátiles de *Amylostereum areolatum* y su implicancia en la localización del hospedadores.

El presente capítulo dio origen a la siguiente publicación: Jofré N, Pildain MB, Cirigliano AM, Cabrera GM, Corley JC & Martínez AS, 2016. Host selection by *Ibalia leucospoides* based on temporal variations of volatiles from the hosts' fungal symbiont. *Journal of Applied Entomology*, Vol.140, 736-743 (Anexo 1).

Introducción

Es sabido que existe una variedad de claves químicas y físicas utilizadas por los parasitoides durante el proceso de búsqueda y localización de hospedadores (De Moraes et al., 1998; Morehead & Feener, 2000; Fischer et al., 2001; Gohole et al., 2003; Cournoyer & Boivin, 2004), entre estas, las claves químicas juegan un rol preponderante en la localización de hospedadores de estos insectos (Vet & Dicke, 1992; Powell & Poppy, 2001).

Como se mencionó en la introducción general, los parasitoides de insectos herbívoros se enfrentan con lo que se conoce como el problema de confiabilidad-detectabilidad (Vet & Dicke, 1992) y una de las maneras de enfrentar este problema es explotando estímulos producidos por la interacción del herbívoro con su planta hospedadora, en este sentido los parasitoides no sólo utilizan claves derivadas de la planta explotada sino que también pueden utilizar claves derivadas de organismos asociados a los hospedadores y a la actividad de los mismos.

Muchos insectos herbívoros presentan asociaciones estrechas con microorganismos, los cuales proliferan o se desarrollan durante las actividades de alimentación y oviposición del insecto (Coutts & Dolezal, 1965; Thibout et al., 1993; Paine et al., 1997; Adams & Six, 2008). Estos organismos pueden proveerle a los parasitoides una fuente de información confiable y detectable; ya que producen un rango de compuestos volátiles que pueden ser utilizados por el parasitoide para encontrar a su hospedador, y su crecimiento y desarrollo en el tejido de la planta favorecen su detección; además debido a su estrecha asociación con el hospedador en tiempo y espacio los hace indicadores confiables de la presencia de este último.

En varias especies fitófagas, debido a la actividad de alimentación del herbívoro, se producen semioquímicos derivados del tejido digerido de la planta (frass), los cuales son una fuente de información explotada por algunas especies de parasitoides (Thibout et al., 1993; Ngi-song & Overholt, 1997; Havill & Raffa, 2000; Rojas et al.,

2006). Thibout y colaboradores (1993) demostraron que el material digerido por la larva de la polilla *Acrolepiopsis assectella* contenía microorganismos responsables de la emisión de compuestos volátiles que atraían al parasitoide de la polilla, *Diadromus pulchellus*.

Otros grupos de insectos que se encuentran estrechamente asociados a microorganismos son los que se alimentan de madera muerta o en descomposición, producto de la actividad de hongos simbioses del herbívoro. El hongo asociado es llevado en estructuras especializadas o en la superficie corporal del insecto, y es introducido en el árbol durante la oviposición (Coutts & Dolezal, 1969; Spradbery, 1977; Paine et al., 1997). El mismo hongo o el árbol en respuesta al ataque del hongo puede producir un rango de compuestos volátiles (Brand et al., 1977; Leufvén et al., 1988; Thakeow et al., 2006), que pueden ser explotados por los parasitoides para localizar el hábitat de hospedador y al hospedador (Madden, 1968; Spradbery, 1974; Sullivan & Berisford, 2004; Adams & Six, 2008).

Como ya se mencionó, en el sistema pino-*Sirex noctilio*, las hembras de la avispa taladran orificios en la madera del tronco y ramas del árbol donde ponen sus huevos y junto con estos dejan micelio de un hongo simbiote, *Amylostereum areolatum* (Coutts & Dolezal, 1969; Spradbery, 1977). El hongo reduce el contenido de humedad de la madera favoreciendo la eclosión del huevo y facilitando la actividad perforadora de la larva (Coutts & Dolezal, 1965; Gilmour, 1965; Neumann & Minko, 1981). Se ha demostrado que la información química, metabolitos secundarios, derivada del hongo *A. areolatum* es utilizada por *I. leucospoides* para localizar huevos y larvas del hospedador dentro del árbol (Madden, 1968; Spradbery, 1974; Martínez et al., 2006; Bryant, 2010). Los metabolitos secundarios son producidos por todos los hongos e incluyen compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés), toxinas, pigmentos y antibióticos. En particular, los compuestos orgánicos volátiles han sido registrados mediando interacciones biológicas (Herrmann, 2010b).

Continuando con el comportamiento del parasitoide *I. leucospoides*, este, además de detectar los semioquímicos derivados del hongo, es capaz de detectar concentraciones diferentes de los volátiles derivados de *A. areolatum*, y así reconocer densidades relativas de hospedador disponible para parasitar (Martínez et al., 2006; Corley et al., 2010). Un trabajo reciente demostró que *I. leucospoides* es capaz de responder a diferencias en la calidad del parche sin la necesidad de tener contacto directo con el árbol atacado por *S. noctilio*, sugiriendo que el crecimiento del hongo ayuda a las avispas a optimizar las decisiones en la elección del parche a explotar (Fischbein et al., 2012).

Los estudios relacionados con los semioquímicos producidos por *A. areolatum* son escasos, entre ellos Madden (1968) hizo referencia al acetaldehído como un VOC involucrado en el proceso de reconocimiento de *I. leucospoides*. Asimismo, Bryant (2010) identificó a los compuestos p-anisaldehído, (3-etilfenil)etanona y 1-(4-etilfenil)etanona como atractantes de *I. leucospoides ensiger* Norton.

El objetivo de este capítulo es investigar en mayor profundidad la respuesta de hembras adultas hacia los compuestos químicos producidos por el hongo *A. areolatum* en diferentes momentos del crecimiento de este último. Asimismo, se desea determinar los compuestos volátiles liberados por el hongo en dicho periodo, responsables de la atracción reportada en estudios anteriores.

Materiales y Métodos

Cultivo de Amylostereum areolatum

Las esporas del hongo *Amylostereum areolatum* fueron extraídas de las micangias (Figura 3.1a) de la hembra de *S. noctilio* siguiendo el protocolo descrito en Thomsen and Harding (2011) y adaptado por Martínez et al. (2006), y fueron transferidas a una caja de Petri conteniendo un medio de cultivo artificial elaborado con agar-agar, levadura, malta y extracto de pino. Los cultivos del hongo (Figura 3.1b) fueron mantenidos en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$).

También se prepararon cajas de Petri conteniendo sólo el medio de cultivo, que fueron mantenidas en las mismas condiciones que los cultivos de hongo, para ser utilizadas como controles olfativos y de humedad (Martínez & Hardie, 2009). El micelio y el medio de cultivo (control) usados en los bioensayos fueron obtenidos de sus medios respectivos a través de la remoción de un disco de 170 mm de diámetro con un sacabocados.

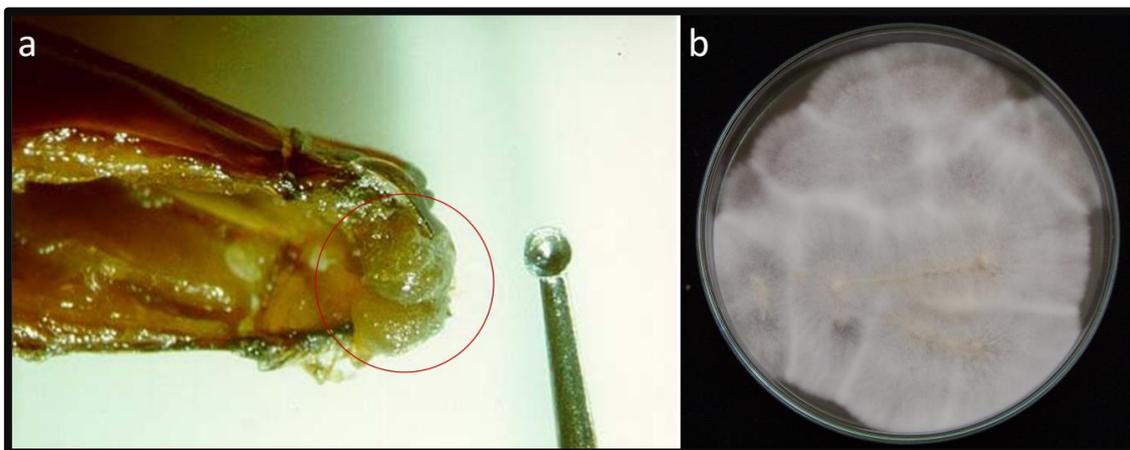


Figura 3.1. Micangias (indicadas dentro del círculo rojo) donde se alojan las esporas de *A. areolatum* (a, foto de Andrés S. Martínez). Cultivo de *A. areolatum* de dos semanas de desarrollo (b, foto de la autora).

Ensayos comportamentales

Los ensayos de preferencias a hongo de diferentes edades de desarrollo se llevaron a cabo en el olfatómetro en forma de “Y” descrito en el Capítulo II. Se evaluó la preferencia a los volátiles emanados por cultivos de *A. areolatum* de 5, 10, 14, 17, 21, 24 y 28 días de desarrollo. En una de las cajas estímulo se colocó un disco de 17mm de diámetro con cultivo de hongo de edad determinada y en la otra caja un disco de medio de cultivo sin hongo de la misma edad. Luego de cada prueba el disco con cultivo y el control eran reemplazados por nuevos. Las pruebas fueron realizadas a humedad ($47\pm 7\%$) y temperatura ($23\pm 1^\circ\text{C}$) ambiente y en condiciones naturales de luz. Para las pruebas de preferencia se usaron hembras de 24 a 48 hs de emergidas. La metodología utilizada también se describe en el Capítulo II (se registró la elección de cada hembra y luego se calculó el porcentaje elegido para cada una de las alternativas

ofrecidas). Los datos obtenidos para cada edad de desarrollo del hongo fueron analizados mediante una prueba binomial.

Identificación de los volátiles emitidos por Amylostereum areolatum

La identificación de los volátiles fue llevada a cabo en el laboratorio UMYMFOR (FCEN-UBA; CONICET) con la ayuda de la Dra. María Belén Pildain (CIEFAP; CONICET). Para esta determinación se utilizó una cepa aislada J10 de *A. areolatum* del genotipo fúngico presente en las plantaciones de pino en Argentina. Discos de micelio en crecimiento fueron inoculados en frascos de 100 ml conteniendo 2ml de un caldo con 2% (v/v) de extracto de malta (Difco) y 2% (v/v) de extracto de levadura (Britania), e incubado a 24 °C en oscuridad por 30 días. La colección de los volátiles se realizó directamente de los frascos conteniendo el cultivo de hongo de 5, 10, 14, 17, 21, 24 y 30 días de desarrollo, utilizando la técnica de microextracción en fase sólida (SPME), un método exitosamente utilizado en la colección de compuestos volátiles producidos por los hongos (Evans et al., 2008). Para la captura se usó una fibra revestida con el polímero Carboxeno/Polydimetilsiloxano (CAR/PDMS) (Supelco, Poole, Dorset, UK), la fibra fue expuesta sobre la apertura del frasco durante 20 minutos a temperatura ambiente (20°). Tres recolecciones (i.e. réplicas) de frascos diferentes fueron realizadas para cada día.

La determinación de los volátiles fue llevada a cabo en un cromatógrafo gaseoso (CG; Shimadzu GC-17A, Kyoto, Japan) acoplado a un espectrómetro de masas (MS; Shimadzu QP-5000, Kyoto, Japan). El cromatógrafo gaseoso se acopló a una columna capilar de sílica (30m x 0.25mm I.D. TR-5MS) de 0,25 µm de espesor (Thermo Fisher Corporation, Waltham, MA, USA). La temperatura del horno fue mantenida a 45°C por un minuto y elevada 20°C por minuto hasta los 300°C. La temperatura del inyector fue mantenida constante a 250°C y operada en un modo “splitless”. La ionización para el análisis de masas fue mediante una ionización electrónica a 70 eV y una interface a 280°C. El gas transportador fue helio.

Inmediatamente luego del muestreo, las fibras fueron introducidas en el inyector del cromatógrafo gaseoso. Los compuestos volátiles fueron identificados en base a los tiempos de retención y/o al espectro de masa en comparación con los compuestos de referencia bajo las mismas condiciones de GC-MS con espectros de masa del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST por sus siglas en inglés) y la librería espectral de Wiley. Para poder realizar comparaciones, los compuestos individuales en cada corrida cromatográfica fueron normalizados relativamente al compuesto menos abundante.

Resultados

Ensayos comportamentales

Las hembras de *I. leucospoides* mostraron una preferencia hacia el cultivo de hongo de 14 días de desarrollo, el 80% de las hembras eligieron el brazo de donde provenían los volátiles del hongo (test binomial: $p=0,003$, Figura 3.2). El cultivo de hongo de 17 días de desarrollo provocó una respuesta en el 70% de los insectos testeados aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($n=20$, test binomial: $p=0.1$). Los cultivos de 5, 10, 21, 24 y 30 días de desarrollo no indujeron una respuesta diferencial frente al control.

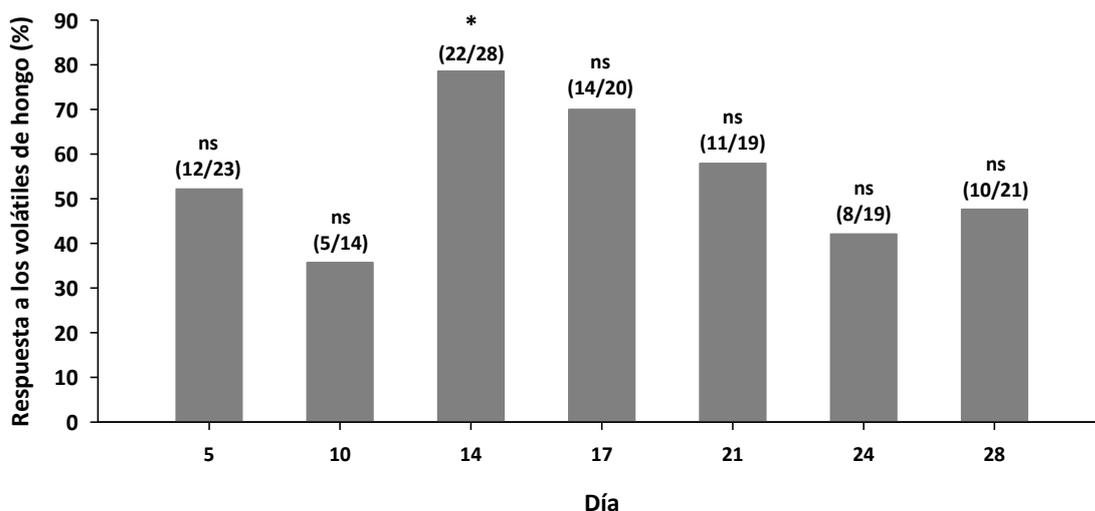


Figura 3.2. Porcentaje de hembras de *Ibalia leucospoides* respondiendo hacia los volátiles de *Amylostereum areolatum* de diferentes edades de desarrollo (5, 10, 14, 17, 21, 24 y 28 días) versus el medio de cultivo sin hongo. Las barras indican el porcentaje de elección, ns = no significativo ($p > 0.05$), * = $p < 0.01$, los números entre paréntesis arriba de las barras indican la cantidad de hembras respondiendo a los volátiles de *A. areolatum* y el total de las avispas testeadas.

Identificación de los volátiles emitidos por Amylostereum areolatum

El análisis de los compuestos orgánicos volátiles mediante la técnica SPME acoplada a GC-MS permitió establecer la identidad y la abundancia relativa de los compuestos volátiles emitidos por el hongo *A. areolatum*. Cuatro VOCs fueron identificados a lo largo de los 30 días de muestreo en base a sus espectros de masa y comparándolos con datos de una librería (Figura 3.3): acetaldehído, etanol, acetona and 2,2,8-trimetiltriciclo[6.2.2.01,6]dodec-5-eno (TMTD). La identificación absoluta de este último compuesto requiere de la preparación del compuesto como referencia, lo cual escapa de este trabajo. El acetaldehído fue registrado en niveles similares los días 5 y 10. La acetona y el etanol fueron registrados con mayor abundancia los días 5, 10 y en menor concentración los días 14 y 17, después de este periodo no fueron detectados. TMDT presentó un perfil diferente de emisión, siendo detectado en bajas cantidades los días 5, 10 y 14 y en grandes concentraciones a partir del día 17.

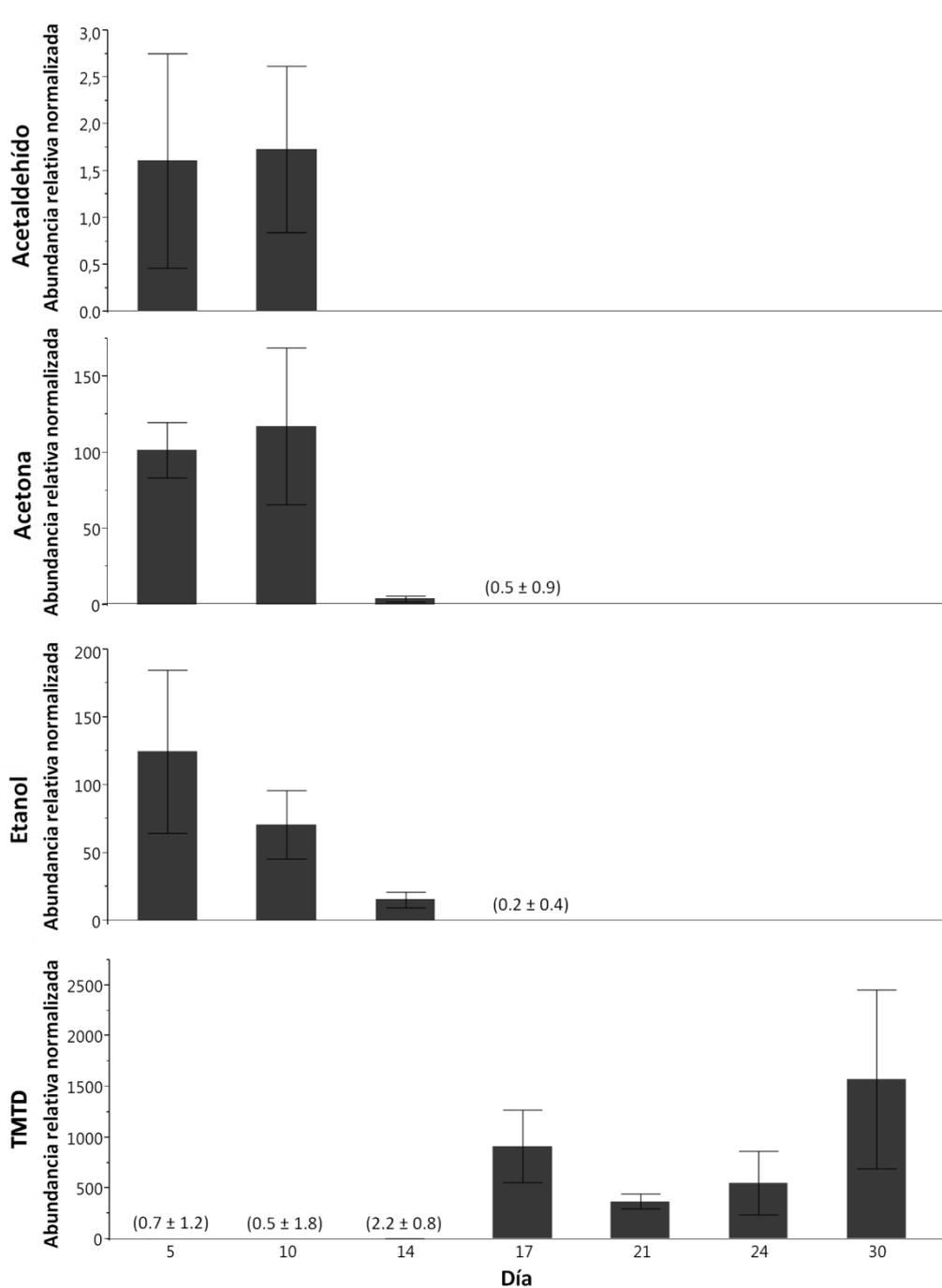


Figura 3.3. Volátiles liberados por *Amylostereum areolatum* colectados mediante una fibra SPME y analizados con GC-MS en diversos momentos a lo largo de un periodo de 30 días. A efectos comparativos, la normalización de un compuesto se realizó en relación a la mínima cantidad detectada del mismo compuesto. Tres replicas se realizaron para cada ventana temporal. Las barras indican el valor medio y las barras de error el error estándar. Los números entre paréntesis arriba de los días que no presentan barras indican las cantidades (media ± ES) detectadas que eran demasiado pequeñas como para representarlas gráficamente.

Discusión

En las pruebas donde se evaluó la preferencia de *I. leucospoides* hacia cultivos de hongo de diferentes edades de desarrollo contra medio de cultivo limpio, la respuesta de las hembras parasitoide mostró un claro sesgo hacia los volátiles emitidos por el cultivo de 14 días de desarrollo, donde el 80% de las hembras se dirigieron al brazo con el cultivo del hongo, y sólo un 20% la rama con el medio de cultivo limpio. Tal preferencia no fue registrada para los cultivos de hongo de las otras edades analizadas (5, 10, 17, 21, 24 y 28 días de desarrollo). Además, se observó una clara variación en la emisión de los volátiles del hongo dependiente de la edad del mismo.

El análisis de la emisión de volátiles de *A. areolatum* mostró que los compuestos acetona, acetaldehído, etanol y TMTD fueron producidos en diferentes cantidades a lo largo del periodo muestreado. Este resultado confirma parcialmente un trabajo previo que sugirió al acetaldehído como un compuesto emitido por cultivos del hongo durante el periodo de atracción (Madden, 1968). Sin embargo, en nuestro estudio este compuesto no es emitido por el hongo durante la ventana de atracción sino que es emitido antes de esta. Bryant (2010) identificó al linalol, p-anisaldehído, (3-etil fenil) etanona y 1-(4-etil fenil) etanona como los VOCs producidos por un cultivo de *A. areolatum* de 21 días de desarrollo. El hecho de que estos compuestos no fueron detectados por nuestro muestreo puede deberse a las diferencias en los métodos de captura de los volátiles; Bryant (2010) utilizó una columna Porapak Q mientras que en el presente estudio una fibra SPME. Las fibras SPME CAR-PDMS proveen la mejor sensibilidad para capturar pequeñas moléculas tales como compuestos ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas y sesquiterpenos (Wercinski, 1999; Mills & Walker, 2000, 2001), mientras que con el método que utiliza la columna Porapak Q extrae grandes cantidades de compuestos semi-volátiles tal como terpenos y fuertemente interactúan con el ion hidrógeno (Zado & Fabecic, 1970).

Tres de los compuestos detectados; acetona, etanol y acetaldahído, han sido mostrados que actúan como semioquímicos en diferentes organismos. La acetona, la

cetona más sencilla, es emitida por varias especies de hongos y plantas. Es conocido que esta cetona regula el comportamiento del gorgojo *Pissodes strobi* (Sahota et al., 1998). El etanol también es producido por especies de hongos y plantas (Kelsey & Joseph, 2001; Kenealy & Dietrich, 2004; Okamoto et al., 2010) y se lo ha registrado actuando como un atrayente en los escarabajos de la corteza (Joseph et al., 2001; Kelsey & Joseph, 2001). Por su parte, el acetaldehído es normalmente producto de procesos de fermentación como el de la fruta en pudrición, y es conocido que actúa como un atrayente en especies de *Drosophila* y en algunos parasitoides de moscas de la fruta como *Biosteres longicaudatus* y *Leptopilina heterotoma* (Greany et al., 1977; Dicke et al., 1984; Hoffmann & Parsons, 1984). TMTD, por otro lado, es un sesquiterpeno hidrocarbonado, el cuál ha sido escasamente reportado como un constituyente natural (Urzúa et al., 2007) y nunca se los ha registrado con función infoquímica. Estudios previos identificaron a este compuesto en las flores de la especie *Haplopappus berterii*, normalmente visitadas por una entomofauna variada, pero no se ha llegado a resultados concluyentes en relación a su función como infoquímico (Urzúa et al., 2007).

El periodo de tiempo en el cual el hongo fue atractivo para *I. leucospoides*, acetona, etanol y TMDT fueron detectados. En cultivos más jóvenes en desarrollo (< 14 días), mientras el hongo no inducía respuesta alguna en la atracción del parasitoide, acetona, etanol y acetaldehído fueron constantemente producidos pero las concentraciones de TMDT fueron relativamente bajas. Ninguno de los cuatro compuestos fue determinado únicamente en el periodo de atracción. Las cantidades variables de los compuestos registradas a través del estudio sugieren que probablemente una mezcla más que la presencia de cualquiera de los compuestos está asociada con la respuesta del parasitoide y las cantidades de cada uno de los compuestos volátiles podrían jugar un rol importante en la atracción de *I. leucospoides*. Varios trabajos (ver Bruce & Pickett 2011 para una revisión) han demostrado que las mezclas inducen respuestas comportamentales más fuertes que los compuestos individuales.

El hecho de que un solo árbol puede ser susceptible al ataque de *S. noctilio* durante varios meses, implica que dentro de este se encuentran ocultas en el xilema larvas de un amplio rango de edades, muchas de las cuales no son aprovechadas, ya que las larvas de los estadios mayores taladran más profundo en la madera y no pueden ser alcanzadas por el ovipositor, relativamente corto, de *I. leucospoides* ($23 \pm 0,2$ mm; observación personal). La existencia de un semioquímico indicando hospedadores aptos (aprovechables temporalmente) podría significar una importante ventaja a nivel del *fitness* para la hembra parasitoide. Proponemos que una clave así puede ser ofrecida por el hecho de que las hembras de *S. noctilio* en el momento de la oviposición depositan también el hongo *A. areolatum*, dando una ventana de tiempo (“time stamp”) entre la oviposición y el desarrollo de la larva apta, proveyéndole a la hembra parasitoide un medio rápido de identificación de los sitios de oviposición aptos (con larvas de estadios tempranos). Considerando que las hembras de *S. noctilio* oviponen a 8-20 mm de profundidad en la madera, lo cual es la longitud total del ovipositor (Coutts, 1965), y que los huevos eclosionan (a 25°C) dentro de los 10-12 días después de la oviposición (Madden, 1981), *I. leucospoides* parasita principalmente huevos maduros y larvas de estadios tempranos. La estrecha ventana de tiempo para la oviposición, los experimentos comportamentales y la variabilidad en el perfil de los volátiles del hongo indicarían que este juega un rol preponderante tanto a gran escala como a corta, aunque otras claves probablemente provistas por las larvas sean utilizadas para la localización final y la aceptación del hospedador.

Debido a que los semioquímicos pueden ser utilizados por los enemigos naturales para localizar a sus hospedadores, establecer la identidad de los compuestos que intervienen en el proceso de localización es importante para diseñar sustentables y efectivos programas de control. Tales compuestos pueden ser utilizados en planes de manejo de plagas para mejorar la eficiencia de los enemigos naturales a través del control de su abundancia y distribución (Cook et al., 2007). En los últimos años, una atención especial se le ha dado al desarrollo de dispositivos para atraer enemigos

naturales a un área determinada o blanco (Mallinger et al., 2011; Rodríguez-Saona et al., 2012; Heuskin et al., 2012).

El análisis de las emisiones de VOCs se limitó a la técnica de SPME, sin embargo es probable que otros compuestos (esteroles, ácidos grasos, entre otros) pudieran haber sido detectados con otras técnicas. Dichos compuestos podrían ser claves importantes en el proceso de localización de hospedadores en *I. leucospoides*. En este sentido, consideramos que más estudios deben llevarse a cabo para determinar cuáles de estos compuestos son relevantes desde el punto de vista comportamental.

A continuación se detallan los resultados más relevantes de este capítulo:

- Las hembras de *I. leucospoides* presentan preferencia por los volátiles del cultivo de *A. areolatum* de dos semanas de desarrollo, coincidente con la ventana de parasitismo.
- Se determinó que *A. areolatum* libera los siguientes compuestos químicos: acetaldehído, etanol, acetona and 2,2,8-trimetiltriciclo[6.2.2.01,6]dodec-5-eno.
- La abundancia relativa de los compuestos liberados por *A. areolatum* varió a lo largo del periodo analizado, estableciendo un “*time-stamp*” que puede ser explotado por el parasitoide.

Capítulo IV - La influencia de los conoespecíficos (el tercer nivel trófico) y del estado nutricional en el comportamiento de búsqueda de hospedadores.

Parte de los resultados del presente capítulo (*Preferencia hacia el hongo en función del estado de alimentación*) fueron publicados en: Pietrantuono A.L, Fernández Arhex V. Jofré N & Corley J.C, 2012. Food and host searching decisions made by *Ibalia leucospoides* (Hymenoptera: Ibalidae), a parasitoid of *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae). Journal of Insect Behavior, Vol. 25: 320-327 (Anexo 2).

Introducción

Los hospedadores de los insectos parasitoides, al igual que la mayoría de los animales que habitan ambientes heterogéneos, se encuentran frecuentemente distribuidos en parches. La detección y los criterios de selección de los parches de hospedadores por los parasitoides están determinados por claves ambientales, el estado fisiológico y la experiencia de la hembra (Vet & Dicke, 1992; Godfray, 1994). Durante la búsqueda de los recursos los parasitoides pueden encontrarse frecuentemente con conespecíficos, debido a que los individuos de la misma especie tienen requerimientos muy similares para la supervivencia, crecimiento y reproducción. La explotación de los mismos recursos pueden conducir a competencia intraespecífica, que dependiendo de cómo sea la interacción entre los individuos puede ser una competencia por explotación donde los individuos no interactúan directamente e implica una disminución del recurso mediante la presencia y actividad de los conespecíficos, o puede ser una competencia por interferencia donde los individuos interactúan directamente previniéndole uno de ellos la explotación del recurso al otro (Begon et al., 2006).

En los parasitoides solitarios, donde un sólo adulto emerge de un hospedador, la presencia de conespecíficos puede disminuir la calidad del parche a través de un agotamiento del recurso o a través de encuentros agonísticos, estos últimos pueden llevar a un comportamiento de evitación o abandono del parche por parte del parasitoide (Janssen et al., 1995; Castelo et al., 2003). Tanto estímulos visuales, interacciones físicas, como la combinación de kairomonas del hospedador con hembras de la misma especie median estos comportamientos (Hugues et al., 1994; Castelo et al., 2003).

La presencia de conespecíficos puede influenciar el comportamiento de evitación del parche (Castelo et al., 2003) y el tamaño corporal de la hembra competidora puede modificar el tiempo de residencia en el parche del parasitoide (Fernández-Arhex & Corley, 2010).

Particularmente, en el contexto de baja densidad poblacional en la que se encuentra mayormente la avispa *S. noctilio* (ver Introducción Capítulo II), los conespecíficos pueden proveerle a la hembra de *I. leucospoides* que se encuentra buscando hospedadores información de relevancia para encontrarlos. Esto es, al presentar el hospedador una densidad poblacional fuertemente agregada en condiciones endémicas (Corley et al., 2007), la presencia de conespecíficos le podría estar indicando a la hembra parasitoide un parche con hospedador.

Por su parte, el estado fisiológico de los parasitoides también afecta el comportamiento de búsqueda de hospedadores (Lewis & Takasu, 1990; Wäckers, 1994; Siekmann et al., 2004; Desouhant et al., 2005). La mayoría de los parasitoides se alimentan de néctar, polen, secreciones de áfidos y otros exudados de plantas pero algunos lo hacen depredando los hospedadores (Jervis & Kidd, 1986; Bernstein & Jervis, 2008). En el ámbito del control biológico clásico, en donde parasitoides que no se alimentan del hospedador, son liberados en hábitats dominados por un cultivo, las fuentes de alimento naturales y los hospedadores se encuentran espacialmente distanciados. Esto implica que las hembras parasitoide deberán optar con frecuencia, por buscar hospedadores en donde descargar sus huevos o alimento. Generalmente, cuando eligen alimentarse pueden perder oportunidades de oviposición inmediatas, pero las posibilidades de puestas futuras pueden incrementarse por el aumento en la expectativa de vida que se asocia con las ingestas de alimento. Por el contrario, si optan por oviponer, hay una ganancia inmediata en su éxito reproductivo la cual puede ocurrir a costa de ganancias futuras (Bernstein & Jervis, 2008). Según el modelo propuesto por Sirot y Bernstein (1996), bajo condiciones de muy baja disponibilidad de alimento los parasitoides nunca buscarán alimento y cuando el alimento es muy abundante buscarán hospedadores hasta que se agoten sus reservas.

Como se mencionó en el párrafo anterior, la mayoría de los parasitoides se alimentan de néctar floral, secreciones de áfidos y otros exudados de plantas, y algunos de su hospedador ("*host-feeders*"), más precisamente de la hemolinfa o de los tejidos (Jervis

& Kidd, 1986; Jervis, 1998; Bernstein & Jervis, 2008). La composición nutricional entre ambos tipos de alimentación difiere sustancialmente. Mientras que el hospedador es rico en proteínas, aminoácidos, lípidos, vitaminas esenciales y sales, además de que la hemolinfa puede ser también rica en azúcares, los exudados de las plantas son pobres en proteínas aunque ricos en carbohidratos. Debido a la naturaleza de los distintos nutrientes, los mismos son utilizados en distintos procesos biológicos en el insecto (Rivero & Casas, 1999; Giron et al., 2002, 2004; Jervis et al., 2008). En un análisis realizado por Fischbein y colaboradores (2016; ver Anexo 3), en donde la autora de esta tesis participó, se observó que el tipo de alimentación (alimentarse del hospedador o no) se correlaciona positivamente con la esperanza de vida, con el número máximo de huevos, negativamente con el índice de ovigenia (OI: la relación entre la carga inicial de huevos maduros y el potencial de fecundidad a lo largo de la vida), y no muestra correlación con la fecundidad potencial. En el mismo estudio se registró una correlación positiva de la fecundidad potencial con la esperanza de vida. En base a esto, se sugiere que los parasitoides que se alimentan de su hospedador pueden disponer de más recursos para el mantenimiento de sus reservas energéticas. *Ibalia leucospoides* es un parasitoide que no se alimenta de su hospedador, sino que se alimenta de soluciones azucaradas. Según el análisis de Fischbein y colaboradores (2016), esto se relaciona con otros rasgos de historia de vida que posicionan a la especie en un contexto que permite evaluar sus influencias en la toma de decisiones. Esta información es un paso fundamental para el planteo de algunos de los objetivos del presente capítulo.

Por un lado, uno de los objetivos del presente capítulo es analizar los semioquímicos y señales visuales provistas por los conespecíficos en la búsqueda de hospedadores. Dicha información le podría indicar la existencia de parches con hospedador aunque también implica una potencial competencia. Teniendo en cuenta el contexto donde *I. leucospoides* se desenvuelve, se esperaría que se verifique la hipótesis que *I. leucospoides* explote información provista por los conespecíficos para encontrar parches con hospedador. Por otro lado, dado que la especie posee un alto índice de

ovigenia y no se alimenta de su hospedador, se espera establecer si el estado nutricional de las hembras -alimentadas vs. no alimentadas previamente- afecta las decisiones que toman. Este objetivo tiene enorme relevancia práctica dado que *I. leucospoides* es liberado en extensas plantaciones densas de pinos, donde el cierre de copas no permite el ingreso de luz y por lo tanto no existe oferta de néctar alguna dentro del bosque. La posibilidad de alimentar a los parasitoides previo a su liberación, pueden extender su longevidad pero es importante saber en qué medida afecta su tendencia a localizar hospedadores.

Materiales y métodos

Evaluación de la información provista por los conespecíficos

A fin de evaluar la respuesta del parasitoide *I. leucospoides* ante la presencia de conespecíficos en parches con hongo se realizó por un lado ensayos de olfatometría y por otro, ensayos que permitieron establecer la relevancia adicional de claves visuales.

Ensayos de olfatometría

Los ensayos de olfatometría fueron llevados a cabo en un olfatómetro en forma de “Y” (ver descripción del dispositivo en los materiales y métodos del Capítulo II). En una de las cajas de acrílico adosadas al extremo del olfatómetro se colocó un disco de 17 mm de diámetro de cultivo de hongo *A. areolatum* de 2 semanas de desarrollo con ejemplares hembras de *I. leucospoides* y en la otra caja se colocó solamente un disco de 17 mm de diámetro de cultivo de hongo de 2 semanas de desarrollo. El hongo fue cultivado según las especificaciones descriptas en los materiales y métodos del Capítulo III. Dos cantidades de conespecíficos fueron examinadas a fin de evaluar una respuesta densodependiente (3 y 10 hembras). Una hembra de *I. leucospoides* era introducida en la base del olfatómetro, se la dejó un minuto para que se adapte antes de permitirle el acceso a los brazos del olfatómetro y un máximo de 15 minutos para su elección. Luego de cada prueba el tubo en Y era lavado y ventilado y las cajas de los estímulos eran rotadas. El hongo y los conespecíficos fueron renovados cada 5 réplicas. Se evaluó la preferencia de 43 hembras a hongo + 3 conespecíficos y de 37 hembras a

hongo + 10 conespecíficos. Los datos fueron analizados mediante una prueba binomial.

Ensayos olfativo-visual

Los ensayos para evaluar la respuesta olfativa en combinación con la visual, se realizaron en una caja de acrílico blanco de 10,5 x 10,5 x 100cm, en la cual a cada uno de sus lados se colocaron cajas de acrílico transparente de 10 x 10 x 10 cm separadas por 45 cm, uno de los lados de estas cajas presentaba un malla metálica con una trama de 2 x 2 mm la cual se la colocaba mirando al interior de la caja blanca (Figura 4.1). La caja era cubierta por una tapa desmontable de acrílico de color roja translúcida. En una de las cajas se colocaba un disco de 17 mm de diámetro de cultivo de hongo *A. areolatum* de 2 semanas de desarrollo con seis conespecíficos (seis hembras de *I. leucospoides*) y en la otra de las cajas un disco de 17 mm de diámetro de cultivo de hongo de 2 semanas de desarrollo sin hembras del parasitoide. El hongo fue cultivado según especificaciones descritas en los materiales y métodos del Capítulo III. Un papel color madera de 10,5 x 100cm era colocado en el piso de la caja y renovado entre cada réplica, para evitar que el parasitoide deje trazas químicas. Un hembra de *I. leucospoides* era liberada en el centro de la caja experimental y se registraba el tiempo (s) acumulado que la avispa permanecía en cada zona de la caja (zona con conespecíficos y zona sin conespecíficos) durante 15 minutos. La caja fue limpiada con alcohol y ventilada entre cada réplica y las cajas estímulos eran rotadas, el hongo y los conespecíficos fueron renovados cada 5 réplicas. Un total de veintitrés hembras fueron evaluadas. A partir de los registros de los tiempos se calcularon los porcentajes de tiempo que la avispa pasa en cada brazo, los cuales fueron comparados mediante el test no paramétrico Wilcoxon Rank.

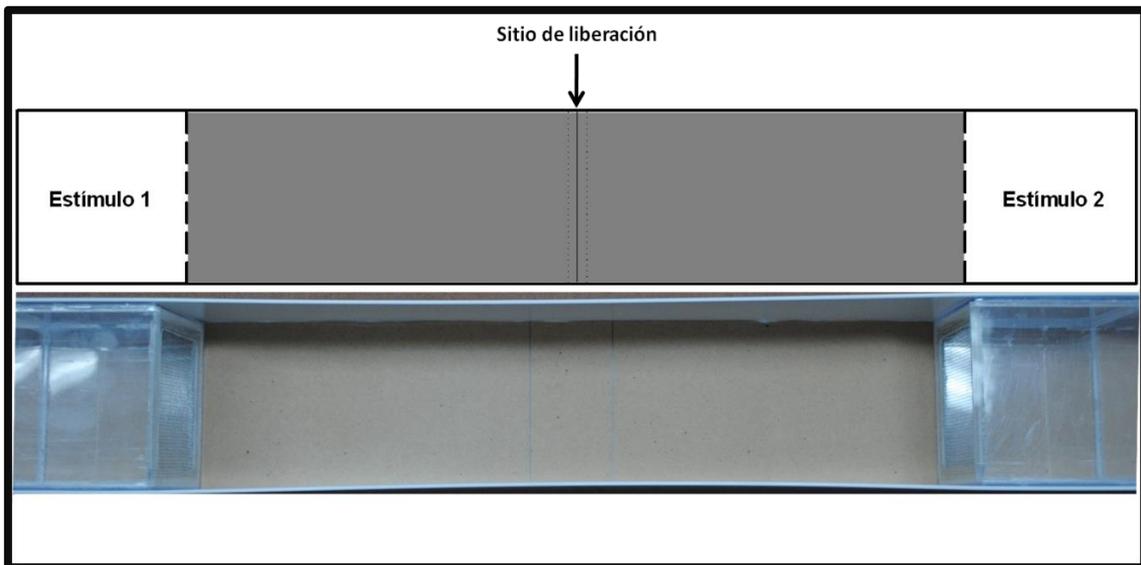


Figura 4.1. Esquema y fotografía del dispositivo utilizado en los ensayos olfativo-visual. Foto de la autora

Preferencia hacia el hongo en función del estado de alimentación

Los ensayos de preferencia hacia el hongo en relación al estado alimenticio de las hembras del parasitoide se realizaron con hongo de dos semanas de desarrollo. Los bioensayos fueron llevados a cabo también en el olfatómetro en forma de “Y” descrito en el Capítulo II. Las hembras alimentadas fueron provistas durante 8 días con solución azucarada (30% v/v) *ad libitum*, mientras que a las no alimentadas se le ofreció solamente agua destilada durante el mismo período. Tanto la solución azucarada como el agua se embebían en algodones que se renovaban cada dos días. Las hembras parasitoides fueron mantenidas individualmente bajo las siguientes condiciones: temperatura: $21 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, humedad: $54 \pm 5\%$ y en un régimen de luz-oscuridad de 16:6 h. Como estímulo se utilizó un disco de 17mm de diámetro de cultivo de *A. areolatum* de dos semanas de desarrollo, el cual fue colocado en una de las cajas estímulo, y en la segunda caja se colocó, a manera de control, un disco de medio de cultivo de la misma edad sin crecimiento del hongo. El hongo fue cultivado según especificaciones descritas en los materiales y métodos del Capítulo III.

Resultados

Ensayos de olfatometría

La mayoría de las hembras eligieron un brazo del olfatómetro (70%), mientras un 30% de las hembras no mostraron preferencia por ningún de los estímulos presentados. Para ninguno de los dos tratamientos (con 3 o 10 conespecíficos) las hembras de *I. leucospoides* mostraron preferencia por el cultivo del hongo sólo o con la presencia de conespecíficos (Figura. 4.2). Cuando se colocaron 3 conespecíficos, el 62,5% de las avispas eligieron la fuente que tenía el hongo y los conespecíficos y el 37,5% la que tenía sólo el hongo (test binomial: $p=0,21$; $n=32$), mientras que cuando se colocaron 10 conespecíficos el 52,2% de las hembras eligió la que tenía el hongo más los conespecíficos y el 47,8% la que sólo tenía el hongo (test binomial: $p=1$, $n=23$).

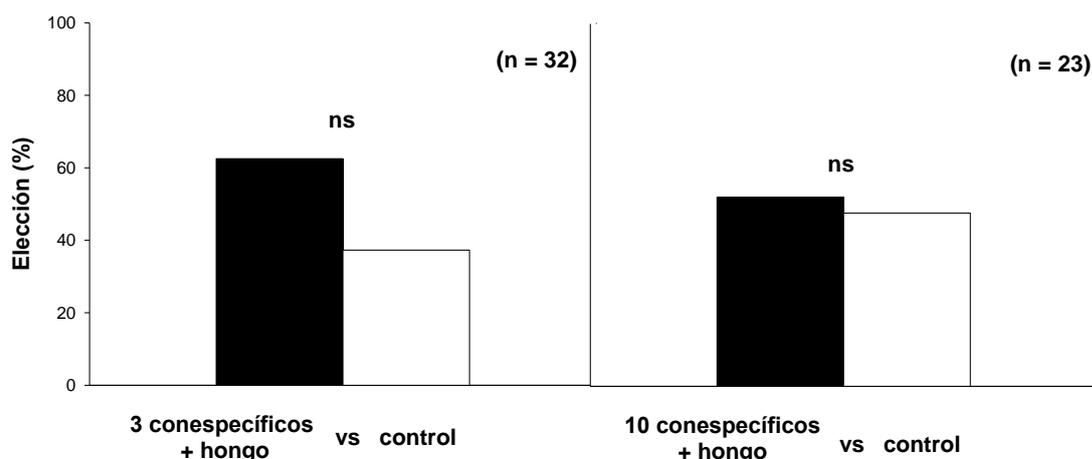


Figura 4.2. Porcentaje (%) de elección de hembras de *I. leucospoides* a hongo vs hongo + conespecíficos (3 y 10). Las barras indican el porcentaje de elección, ns = no significativo ($p>0.05$; test binomial), entre paréntesis se indica el total de avispas testeadas para cada tratamiento.

Ensayos olfativo-visual

En este ensayo la mayoría de las hembras presentaron actividad dentro de la caja experimental, sólo cuatro hembras se quedaron en un solo lado de la caja o directamente no presentaron actividad. Al igual que en ensayo anterior, las hembras

no presentaron preferencia por ninguno de los estímulos presentados, permanecieron el mismo porcentaje de tiempo en ambas zonas ($P=0,11$, $\chi^2=0,73$, $n=23$). La permanencia en la zona con conespecíficos fue de $51,21 \pm 5,8\%$ y $48,75 \pm 5,8\%$ en la zona sin conespecíficos (Figura 4.3).

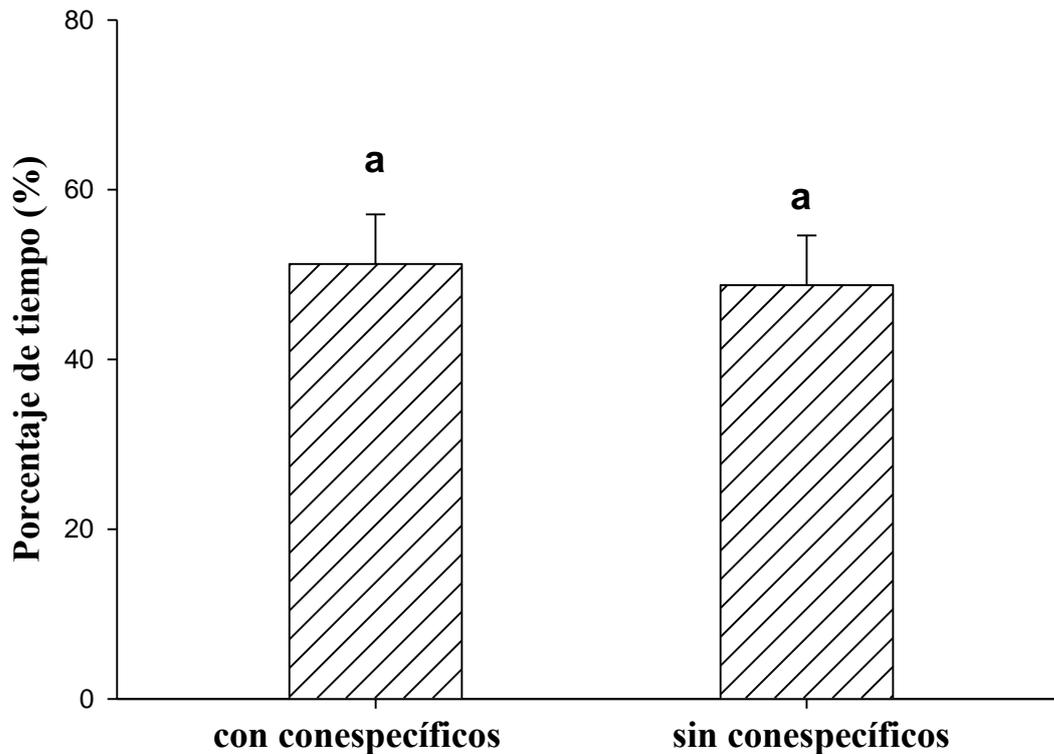


Figura 4.3. Porcentaje de tiempo (media \pm ES) que permanecen las hembras de *I. leucospoides* en el lado de la caja que contiene sólo hongo o en el lado que contiene hongo + conespecíficos (test no paramétrico Wilcoxon; $P=0,11$, $\chi^2=0,73$, $n=23$, las mismas letras por encima de las barras indican que no hay diferencias entre los tratamientos).

Preferencia hacia el hongo en función del estado de alimentación

La preferencia a cultivo de hongo de dos semanas de desarrollo fue diferente entre las hembras alimentadas y no alimentadas. Los parasitoides alimentados ($n=38$) no mostraron preferencia entre el hongo y el control, mientras que las no alimentadas ($n=33$) preferían significativamente el cultivo de hongo (GLM; $\chi^2=4.15$, $df=1$, $p=0.042$, $n=71$, Figura 4.4).

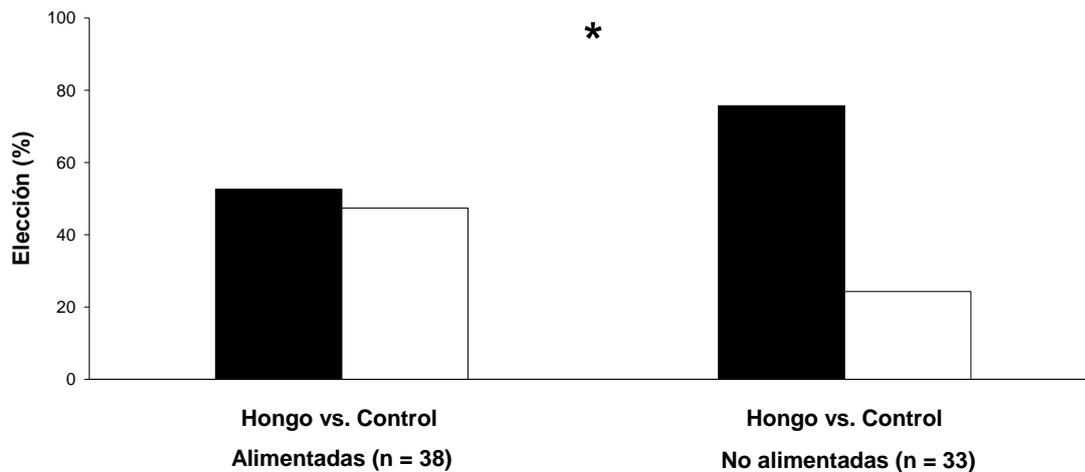


Figura 4.4. Porcentaje (%) de elección de hembras de *I. leucospoides* alimentadas y no alimentadas a hongo vs control. Las barras indican el porcentaje de elección a cada estímulo (* = $p < 0.05$, GLM).

Discusión

En el presente trabajo se evaluó si la presencia de conespecíficos influye en el comportamiento de búsqueda del parasitoide de la avispa de la madera *I. leucospoides*. En las condiciones en que su hospedador *S. noctilio* se distribuye a baja densidad poblacional (una concentración de ataques fuertemente agregada) la presencia de conespecíficos podría proveerle información confiable acerca de la presencia de parches con hospedador, aunque también implicaría una potencial competencia. Tanto en las pruebas en donde se presentaban solamente claves olfativas (con tres o 10 conespecíficos) como en las que se presentaba claves olfativas junto con claves visuales no se observó una atracción o una evitación del parche con conespecíficos. En el tratamiento en que se colocaron 3 conespecíficos junto con un disco de cultivo del hongo *A. areolatum*, un 62,5% de avispas eligieron el brazo del olfatómetro que contenía a los conespecíficos más el hongo y un 37,5% al que sólo tenía el cultivo del hongo, estadísticamente las diferencias no fueron significativas, probablemente con un número mayor de pruebas las diferencias hubiesen resultado significativas.

En algunos parasitoides, la evitación del parche se da a partir del contacto con el parche con conespecíficos o con marcas dejadas por estos, como se mencionó en la introducción de este capítulo la avispa *V. canescens* deposita una marca química en la superficie del parche durante su búsqueda que modifica el comportamiento de la próxima avispa que visite el parche llevando a una evitación de la competencia con los conespecíficos dentro del parche (Bernstein & Driessen, 1996), un trabajo anterior ha revelado que esta avispa deposita alguna marca individual específica, originada en la glándula de Dufour, que principalmente le permite identificar hospedadores en los que ya ha ovipuesto (Hubbard et al., 1987). En el presente trabajo sólo se evaluó el comportamiento a distancia de la fuente de emisión del estímulo, probablemente el contacto directo del parasitoide con el parche con conespecíficos o marcas dejadas por la actividad de éstos, produzca alguna modificación en el comportamiento de búsqueda de hospedadores de la avispa.

Evitar parches previamente visitados por conespecíficos puede prevenir el superparasitismo, el cual ha sido registrado en numerosos parasitoides (Bográn & Heinz 2002; Ueno 2002; De Vis et al. 2003; Lim & Hoy 2005; Ho & Ueno 2008; Foelkel et al. 2009; entre otros). Este comportamiento se da en los parasitoides solitarios cuando la hembra pone más de un huevo en un mismo hospedador u otra hembra de la misma especie pone huevos en un hospedador ya parasitado (Godfray, 1994). Para los parasitoides solitarios, donde una sola larva se desarrolla en el hospedador, el superparasitismo resulta contraproducente desechando huevos debido a una competencia letal, causando la emergencia de un solo individuo (Ueno, 1997, 2002; De Vis et al., 2003; Lim & Hoy, 2005; Foelkel et al., 2009) por una competencia por interferencia que puede finalizar en canibalismo (Ueno, 1997, 2002; Goubault et al., 2003), o la disminución en el porcentaje de supervivencia del segundo huevo ovipuesto (Lebreton et al., 2009).

La competencia intra-específica ha sido estudiada en el parasitoide *I. leucospoides* en un trabajo anterior (Fernández-Arhex & Corley, 2010). El comportamiento de

competencia fue evaluado como de interferencia debido a que una de las hembras modificaba su estrategia de explotación del hospedador ante la presencia de la otra. En dicho trabajo dos hembras parasitoides de distintos tamaños corporales fueron liberadas en troncos con distintas densidades de hospedador, se registró que una de las hembras nunca atacaba al hospedador mientras que la otra si, particularmente la hembra que no atacaba era de menor tamaño corporal que la que si lo hacía. Además, el tiempo de permanencia en el parche de la hembra que nunca ataca al hospedador se modifica ante la presencia de una hembra de mayor tamaño, dejando el parche antes que si estuviera sola en el tronco y antes que su competidora. Contrariamente, el tiempo de permanencia de la hembra que si ataca hospedadores no se modifica ante la presencia de una hembra de menor tamaño. Esta competencia registrada no está mediada por combates físicos. En un segundo estudio (Corley et al., 2010), se ha mostrado que *I. leucospoides* no modifica su tiempo de residencia en el parche con la cantidad de conespecíficos en los parches con hospedador, sugiriendo que la competencia por interferencia es mínima en las condiciones de agregación en la que se encuentra naturalmente su hospedador. Al parecer, los conespecíficos no modifican el comportamiento del parasitoide en la localización de parches con hospedador, más bien una competencia intra-específica es observada una vez que el parasitoide se encuentra en el parche, la cual es afectada por la agregación del hospedador.

En el presente estudio, la respuesta de las hembras de *I. leucospoides* mostró ser estado-dependiente. Cuando las hembras eran privadas de alimento, prefirieron significativamente el cultivo de *A. areolatum* de dos semanas de desarrollo, mientras que las alimentadas no mostraron preferencia hacia claves que indican la presencia de hospedador. Los resultados sugieren que las hembras al estar hambreadas, priorizan la descarga de sus huevos. Según lo propuesto por el modelo de Sirot & Bernstein (1996), la predicción para condiciones de baja disponibilidad de alimento se cumplen para este parasitoide. La respuesta registrada en las hembras alimentadas, que según el modelo de Sirot & Bernstein (1996) también deberían ir por la búsqueda de hospedadores, podría explicarse por una modificación en su expectativa de vida ya que las hembras

alimentadas viven en promedio 10 días más que las no alimentadas (Fischbein et al., 2013). Estos resultados están en concordancia con estudios realizados en otros parasitoides, donde el estado nutricional de los mismos influye en el comportamiento de búsqueda (Wäckers, 1994; Desouhant et al., 2005), como en el parasitoide *Cotesia rubecula* donde la hembra privada de alimento elige olores asociados al alimento mientras que las alimentadas prefieren los olores asociados al olor (Wäckers 1994).

En *I. leucospoides* se ha demostrado que el estado nutricional no afecta el rendimiento en la capacidad de vuelo en condiciones de laboratorio, indicando que las características morfológicas tienen un mayor efecto (Fischbein et al., 2011). Tampoco influye en la elección de parches con hospedador y el tiempo de residencia en los mismos en un arreglo experimental en donde se expuso a las hembras a troncos de pino atacados por la plaga (Corley et al., 2010). Por otro lado, la alimentación de las hembras adultas modifica su longevidad, aunque no tiene efecto en la maduración de los huevos, las mismas emergen con la mayoría de los huevos maduros (Fischbein et al., 2013).

El estudio realizado por Fischbein y colaboradores (2016) mostró una correlación negativa entre el hábito alimenticio y el índice de ovigenia (OI), las especies que no se alimentan de su hospedador están asociadas con un OI alto. Efectivamente, *I. leucospoides* que es un parasitoide que no se alimenta de su hospedador presenta un $OI=0,77$ (Fischbein et al., 2013), indicando que no necesita de ciertos recursos alimenticios para madurar sus huevos luego de la emergencia, habiendo invertido gran cantidad de recursos para esto durante los estadios larvales. Un alto OI indica que las hembras no son capaces de ajustar su producción reproductiva a las variaciones en la disponibilidad de hospedadores (Eilers et al 2000), *I. leucospoides* podría haber evolucionado a este alto OI en función a distribución espacial que presenta su hospedador en condiciones endémicas la cual es fuertemente agregada. También, según Fischbein y colaboradores (2016), los parasitoides que no se alimentan de hospedador presentan una esperanza de vida menor que los que si lo hacen, por lo

que *I. leucospoides* estaría limitada por el tiempo para poner la mayor cantidad de huevos posibles. Más allá de que *I. leucospoides* no se alimenta de su hospedador, se ha registrado a campo un bajo porcentaje de hembras silvestres con altos niveles de azúcares, indicando que la ingestión de alimento en el campo puede no ser frecuente en este parasitoide (Fischbein et al., 2013). Estos resultados sugerirían que la hembra de *I. leucospoides* emerge, con su alta carga de huevos madura, y comienza a buscar hospedadores donde descargar sus huevos rápidamente. Siguiendo en esta línea, las plantaciones de pino en la Patagonia Argentina no presentan prácticamente recursos alimenticios (i.e.: néctar floral) para este parasitoide (Pietrantuono, 2007), reforzando la idea que la alimentación de estas avispas en el campo es escasa. En base a todo lo mencionado anteriormente se espera que las hembras de *I. leucospoides* se encuentren dentro de las plantaciones de pino buscando hospedadores donde oviponer.

Que las hembras alimentadas no hayan preferido los volátiles del hongo tiene importantes implicancias para el control biológico aplicado al manejo de la plaga. En base a estos resultados se recomienda que las hembras liberadas para mitigar la plaga no sean alimentadas previo a su liberación, y tampoco fuentes de alimento sean colocadas en las plantaciones donde se emplea el control biológico con *I. leucospoides*.

A continuación se detallan los resultados más relevantes de este capítulo:

- No se encontró evidencia acerca de que los conoespecíficos emitan claves olfativas y visuales que pudieran ser explotadas por hembras del parasitoide durante la búsqueda de hospedadores. No obstante, estos estudios merecen mayor replicación.
- La respuesta de la hembra mostró ser estado-dependiente, teniendo el estado nutricional del parasitoide un efecto en las decisiones tomadas durante la búsqueda de hospedares. Este resultado es esperado en el contexto ecológico-evolutivo en que se desempeña la especie y puede tener importantes implicancias para el control biológico.

Capítulo V - Discusión general

En esta tesis se estudió la información provista por el entorno del parasitoide *I. leucospoides*, a fin de conocer cuáles son las claves explotadas en el proceso de localización del hospedador, la avispa de la madera *S. noctilio*. Se evaluaron distintos estímulos provenientes del hábitat de *S. noctilio* como compuestos químicos liberados por la planta hospedadora, compuestos químicos extraídos de la hembra de *S. noctilio*, volátiles provenientes del hongo simbiote *A. areolatum* e información provista por los conespecíficos. También se evaluó si el estado nutricional de la avispa influye en el comportamiento de búsqueda. Los resultados principales se encuentran resumidos en la figura 5.1.

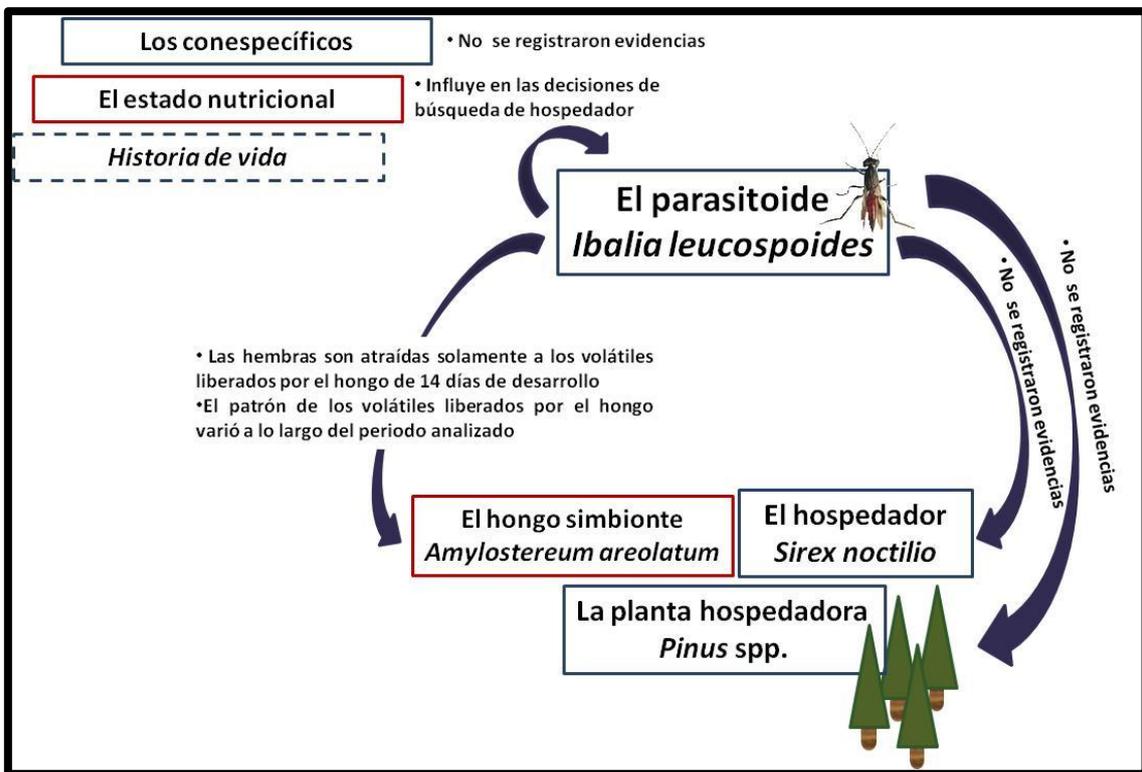


Figura 5.1. Esquema mostrando los principales resultados de este trabajo de tesis.

La relevancia de la información proveniente del pino (Capítulo II)

La actividad de oviposición y alimentación de la avispa de la madera, y la inoculación y crecimiento del hongo producen una respuesta en el árbol modificando la liberación de metabolitos secundarios. En las pruebas comportamentales donde se evaluó el nivel de actividad de las hembras de *I. leucospoides* en una arena estática ante la

presencia de terpenos (α y β -pineno, compuestos químicos que incrementan su liberación en ciertas especies de pino cuando son atacadas por la avispa de la madera), no se registraron cambios en el comportamiento del parasitoide. Las pruebas de preferencia a volátiles liberados por pinos de especies presentes en la Patagonia Argentina, realizadas en un olfatómetro de cuatro vías, sólo mostraron diferencias significativas cuando los estímulos presentados simultáneamente fueron *P. contorta* sano vs. *P. contorta* con hongo simbiote, pero no cuando se presentó el pino sano de cualquiera de las especies vs aire. A diferencia de lo que se esperaba, en el bioensayo *P. contorta* sano vs. *P. contorta* con hongo simbiote, las hembras pasaron mayor porcentaje tiempo en los brazos con pino sano, probablemente el hongo inoculado en los troncos no se desarrolló de manera favorable. En diversos trabajos se ha demostrado que los volátiles liberados por el hongo simbiote atraen a este parasitoide.

En el contexto donde *I. leucospoides* se desarrolla, en las plantaciones de pino, siendo los volátiles liberados por las plantas de pino los más abundantes, se hubiese esperado que estos jueguen un papel fundamental en la interacción entre el parasitoide y su hospedador. Experimentos que contemplen los volátiles liberados por otros sectores del árbol, como las acículas, las ramas o la corteza, y claves físicas como las visuales pueden ser llevados a cabo a fin de seguir explorando si la planta hospedadora afecta el comportamiento de búsqueda del parasitoide.

Respuesta hacia *S. noctilio* (Capítulo II)

En los ensayos realizados con extractos de hembra de *S. noctilio*, se observó una tendencia en la preferencia hacia el extracto realizado con hexano (mediante el cual se obtienen compuestos no polares) contra el solvente sólo, aunque las diferencias no fueron significativamente diferente. Probablemente se debió a que una baja cantidad de ejemplares fueron testeados por la poca disponibilidad de estos, debido a la complejidad del sistema es difícil criarlos. Si con más réplicas del análisis realizado en este trabajo se muestra que la hembra de *S. noctilio* presenta alguna clave que atraiga

al parasitoide a cierta distancia, debería analizarse posteriormente de qué parte de la avispa proviene esa posible clave ya que para realizar el extracto se machacó la avispa completa.

El hongo (Capítulo III)

Quizás el resultado más relevante de esta tesis es la variabilidad registrada en la liberación de volátiles del hongo simbiote *Amylostereum areolatum* de distintos días de desarrollo. Los compuestos volátiles detectados fueron acetona, acetaldehído, etanol y TMTD, los tres primeros han sido registrados actuando como semioquímicos en la interacción entre diferentes organismos (ver Capítulo III de la tesis). Los resultados demuestran que tanto los compuestos liberados por este hongo como la abundancia relativa de los mismos varían durante el periodo estudiado. Asimismo, los estudios comportamentales realizados sobre hembras de *I. leucospoides* demostraron que el hongo de 14 días de desarrollo resulta en una atracción hacia las avispas. Durante esta ventana de tiempo, la abundancia relativa de los compuestos volátiles no es la misma que en el periodo anterior y el posterior, y ninguno de los compuestos es liberado solamente en este periodo. Estos resultados sugieren que más bien una mezcla de compuestos volátiles y no un solo compuesto es responsable de la respuesta del parasitoide.

Esta variabilidad temporal en la liberación de compuestos volátiles por parte del hongo, que continuamente va creciendo por el árbol infestado, genera dentro del mismo parches de olor que le permiten al parasitoide distinguir entre hongos de distintos días de desarrollo. Esto le facilitaría a *I. leucospoides* localizar agujeros de oviposición donde se encuentran los estadios aprovechables que aún no se han adentrado en el árbol, por su estado de desarrollo, y son alcanzables por su ovipositor. De esta manera evitaría visitar agujeros de oviposición más viejos donde los estadios más avanzados, que ya se alimentan de la madera, forman túneles por esta actividad, alejándose del sitio de oviposición y siendo no alcanzables por el ovipositor del parasitoide.

Recordemos que *I. leucospoides* puede discriminar entre diferentes concentraciones de volátiles de *A. areolatum* y entre diferentes densidades de hospedadores en parches, desde una distancia sin la necesidad de hacer contacto directo. Sugiriendo esto, que el hongo puede proveerle además información sobre las densidades relativas de hospedadores disponibles para la oviposición.

Siendo *I. leucospoides* un parasitoide limitado por el tiempo para oviponer (ya que el número de huevos no es una limitante y que la alimentación de la avispa en estadio adulto no afecta la maduración de los huevos), la utilización de estos semioquímicos, resultado de la coevolución entre ambas avispas, optimiza el tiempo de búsqueda de sus hospedadores, facilitando el encuentro con los estadios aprovechables.

Cabe destacar que en no todos los agujeros de oviposición de *S. noctilio* las hembras de esta avispa dejan huevos, pero si en la mayoría de estos inoculan el hongo simbiote, siendo la información provista por el hongo confiable para el parasitoide pero no siempre este va a encontrar hospedadores en los agujeros, por lo que la localización final y la aceptación del hospedador probablemente sea mediante receptores (tanto químicos como mecánicos) en su ovipositor. Muchos parasitoides utilizan claves provenientes del estadio parasitado para detectarlos a ciertas distancias sin tener contacto físico con ellos, pero en el caso de *I. leucospoides* esto parece poco probable debido a que el hospedador se encuentra oculto en la madera del pino dificultando su detección visual, y cualquier compuesto químico volátil que pueda emanar el estadio inmaduro a parasitar sería difícil de detectar a cierta distancia debido a que se hallaría inmerso entre los volátiles liberados por el pino y del hongo simbiote. En función al contexto, otra posibilidad es que claves físicas como las vibraciones producidas por la larva sean detectadas por el parasitoide una vez que se encuentre en el árbol atacado.

La captura de volátiles liberados por el hongo se realizó mediante la técnica SPME, cuya fibra captura compuestos químicos de alta volatilidad, no detectándose una gran cantidad de compuestos de mediana volatilidad que si se pueden capturar mediante

otras técnicas, los cuales podrían tener un rol relevante en la localización del hospedador a pequeña escala.

En conclusión, la información provista por el hongo simbiote parece de gran relevancia para este parasitoide en la búsqueda de su hospedador; tanto a gran escala, debido a que el hongo crece dentro del árbol luego de su inoculación siendo detectable a cierta distancia; como a escala más pequeña, dicho esto en función a la variabilidad temporal registrada en este trabajo en la emanación de distintos compuestos volátiles por *A. areolatum*.

Los conespecíficos (Capítulo IV)

En relación a la información provista por los conespecíficos, no se ha detectado en este trabajo diferencias en la respuesta del parasitoide a la presencia simultánea de conespecíficos y el cultivo del hongo simbiote *A. areolatum* contra un parche sólo con hongo. Si bien en los bioensayos de 3 conespecíficos + hongo vs. hongo, un 62,5% de las hembras parasitoides prefirió el estímulo con conespecíficos, las diferencias no fueron significativas estadísticamente, probablemente con un número más grande de hembras testeadas las diferencias resulten significativas. Tampoco los conespecíficos evocaron en las hembras parasitoides un comportamiento de evitación. En el contexto de agregación de *S. noctilio* en condiciones endémicas, se hubiese esperado que los conespecíficos jueguen un rol en la búsqueda de hospedadores, indicando la presencia de parche con hospedador.

Los conespecíficos parecen no modificar la localización de parches con hospedador, sino que una competencia intra-específica es observada en este parasitoide a nivel del parche. En los programas de control biológico, una liberación masiva de *I. leucospoides* no impediría que todos los parasitoides liberados encuentren un parche con hospedadores donde oviponer, pero el desempeño individual (i.e.: el número de ataques) si se vería afectado por la presencia de conespecíficos en el parche.

La influencia del estado nutricional y los rasgos de historia de vida (Capítulo IV)

El estado nutricional de la hembra parasitoide influye en las decisiones de búsqueda de hospedador. Las hembras hambreadas mostraron preferencia por los volátiles del hongo, mientras que las alimentadas no. Este resultado indicaría una urgencia por parte de las hembras hambreadas en descargar los huevos. Además, *I. leucospoides* emerge con gran parte de sus huevos maduros (OI=0,77), por lo que no requeriría de la alimentación para madurar sus huevos. Como este parasitoide tiene un alto OI, su limitante para descargar sus huevos es posiblemente el tiempo, entonces lo optimizaría buscando hospedadores. Por otra parte, las hembras alimentadas no mostraron preferencia por los volátiles del hongo simbionte *A. areolatum*, contrario a lo que se hubiera esperado, ya que una vez alimentada la prioridad sería la búsqueda de huéspedes, al igual que en el tratamiento sin alimentación. Es probable que esta respuesta se trate de un error en el diseño experimental, por ejemplo fueron ocho días de alimentación *ad libitum*, periodo quizás demasiado prolongado. Sería interesante a futuro realizar el mismo experimento con periodos de alimentación más cortos (i.e. 1 día).

Teniendo en cuenta las estrategias aplicadas al manejo de plagas, este resultado es fundamental, ya que la alimentación por un periodo prolongado no favorece el encuentro del parasitoide con su hospedador.

Debido a que *S. noctilio* es una de las principales amenazas para las forestaciones de pinos a nivel mundial e *I. leucospoides* es uno de los parasitoides que son utilizados como parte de un programa de MIP de la plaga, la información reportada en este trabajo puede contribuir para mejorar las acciones de intervención. Como por ejemplo, podría desarrollarse estrategias tipo *push-pull*, basadas en la atracción específica de determinados volátiles emanados por el hongo *A. areolatum*. Asimismo, una combinación de volátiles (*blend*) puede aplicarse al desarrollo de métodos de seguimiento poblacional post-liberación de los enemigos naturales (i.e.: monitoreo) y a su detección temprana en áreas de reciente dispersión.

Siguiendo en línea con el control biológico como componente central de programas de MIP para el manejo de *S. noctilio*, la información aquí obtenida sugiere que quizás la cría y liberación masiva de hembras parasitoides en plantaciones forestales no tendrá implicancias negativas sobre el parasitismo (mortalidad) obtenido. Esto es porque no se observan evidencia de interferencia durante el proceso de la localización de los parches con hospedador por parte de *I. leucospoides*. Por otro lado, considerando investigaciones previas, es posible que liberaciones masivas tampoco conduzcan a mayores niveles de parasitismo debido a la competencia intra-específica a nivel del parche.

Finalmente, la información obtenida puede ser útil durante el proceso de cría de esta especie de enemigo natural. Por ejemplo, se observó que el contexto de especie de pino hospedera donde se desarrolla las larvas y finalmente donde emerge el adulto del parasitoide (una u otra especies forestal de las cultivadas en Patagonia), no afectan sus decisiones o preferencias respecto a que especie forestal explorar, al menos en primer término, como se ha observado en otras especies de parasitoides (aprendizaje asociativo). También se sugiere que no es necesario alimentar a las hembras previo a su liberación o incluso colocar fuentes de alimento en las plantaciones en donde el control biológico es aplicado, ya que este no contribuye fuertemente a mejorar la eficiencia de búsqueda en esta especie.

No se conocen muchas especies de insectos parasitoides que presenten la complejidad en la interacción con su hospedador y la planta hospedadora como se ha descrito para *I. leucospoides*; donde el hongo *A. areolatum*, necesario para el desarrollo de los estadios inmaduros de la avispa de la madera dentro del pino, es partícipe necesario de la misma mediante los volátiles que libera. Aprovechando la estrecha relación entre *A. areolatum* y la avispa de la madera, *Ibalia leucospoides* parece haber afinado sus estrategias de búsqueda utilizando los volátiles del hongo. Este último es imprescindible para la supervivencia de *S. noctilio*, ya que sus larvas no podrían desarrollarse sin la acción que este provoca en la madera del pino. Asimismo,

explotando los volátiles liberados por el hongo simbiote de *S. noctilio*, este parasitoide podría haber resuelto el dilema de la confiabilidad y de la detectabilidad, debido a que, a medida que el hongo va creciendo en el árbol atacado, más cantidad de volátiles son liberados, siendo esta información confiable, ya que la presencia del hongo representa una alta probabilidad de encontrar hospedadores apropiados (dentro de la ventana de parasitismo) en donde oviponer. En función a esto, nuevos estudios que profundicen en el conocimiento de esta interacción serían de gran importancia no solo para seguir mejorando los planes de manejo de la más importante plaga forestal de pinos del hemisferio sur, sino también para avanzar sobre el conocimiento de los procesos ecológico-evolutivos que modelan la conducta de los insectos parasitoides.

Bibliografía

- Adams AS & Six DL (2008). Detection of host habitat by parasitoids using cues associated with mycangial fungi of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae*. *The Canadian Entomologist* 140:124–127.
- Agrawal AA (2000). Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 3:329–335.
- Alderete M, Liljestrom G & Fidalgo P (2010). Bio-ecología y perspectivas para el manejo de la avispa sierra del sauce, *Nematus oligospilus*. Serie Técnica: Manejo Integrado de Plagas Forestales, vol. 10, p 12.
- Amman GD & Lindgren BS (1995). Semiochemicals for management of mountain pine beetle: Status of research and application. Annual Meeting of the Entomological Society of America 1993. (ed. by SM Salom & KR Hobson) USDA, Forest Service, Intermountain Research Station, Indianapolis, pp 14–22.
- Arakawa R, Miura M & Fujita M (2004). Effects of host species on the body size, fecundity, and longevity of *Trissolcus mitsukurii* (Hymenoptera: Scelionidae), a solitary egg parasitoid of stink bugs. *Applied Entomology and Zoology* 39:177–181.
- Baalen M van & Hemerik L (2008). Parasitoid fitness: from a simple idea to an intricate concept. In: Behavioral ecology of insect parasitoids: From theoretical approaches to field applications (ed. by É Wajnberg, C Bernstein & J van Alphen), First edition. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp 31–50.
- Bain J (2005). *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae) - The New Zealand experience. Proceedings 16th U.S. Department of Agriculture interagency research forum on gypsy moth and other invasive species 2005. p 2.
- Baker TC (2009). Use of pheromones in IPM. In: Integrated pest management. concepts, tactics, strategies and case studies (ed. by EB Radcliffe, WD Hutchison & RE Cancelado), First edition. Cambridge University Press, Cambridge, pp 273–285.
- Begon M, Townsend CR & Harper JL (2006). Ecology: From individuals to ecosystems (Ed. by M Begon, CR Townsend, & JL Harper). Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, p 738.
- Berenbaum MR (1995). The chemistry of defense: Theory and practice. In: Chemical ecology: The chemistry of biotic interaction (ed. by T Eisner & J Meinwald), First edition. National Academy Press, Washington, USA, pp 1–16.
- Bergström G (2007). Chemical ecology = chemistry + ecology! *Pure and Applied Chemistry* 79:2305–2323.

- Bernier UR, Kline DL, Barnard DR, Schreck CE & Yost RA (2000). Analysis of human skin emanations by gas chromatography/mass spectrometry. 2. Identification of volatile compounds that are candidate attractants for the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *Analytical Chemistry* 72:747–756.
- Bernstein C & Driessen G (1996). Patch-marking and optimal search patterns in the parasitoid *Venturia canescens*. *Journal of Animal Ecology* 65:211–219.
- Bernstein C & Jervis M (2008). Food-searching in parasitoids: the dilemma of choosing between “immediate” or future fitness gains. In: *Behavioral ecology of insect parasitoids: From theoretical approaches to field applications* (ed. by É Wajnberg, C Bernstein & JJM van Alphen), First edition. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp 129–171.
- Berryman A (1986). *Forest insects. Principles and practice of population management*. Plenum Press, New York, p 279.
- Berryman A (1987). The theory and classification of outbreaks. In: *Insect outbreaks* (ed. by P Barbosa & JC Schultz). Academic Press, San Diego, pp 3–30.
- Blanco-Metzler H (1996). Los semioquímicos y su papel en el manejo integrado de plagas. X Congreso Nacional Agronómico. CIPROC-EEFBM, Universidad de Costa Rica, pp 93–95.
- Blassioli Moraes MC, Laumann R, Sujii ER, Pires C & Borges M (2005). Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115:227–237.
- Bográn CE & Heinz KM (2002). Host selection by the heteronomous hyperparasitoid *Encarsia pergandiella*: multiple-choice tests using *Bemisia argentifolii* as primary host. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 103:11–21.
- Borges M, Colazza S, Ramirez-Lucas P, Chauhan KR & Blassioli Moraes MC (2003). Kairomonal effect of walking traces from *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) on two strains of *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae). *Physiological Entomology* 28:349–355.
- Böröczky K, Crook D, Francese J, Mastro V & Tumlinson JH (2008). Chemical ecology of *Sirex noctilio*. *Proceedings 19th U.S. Department of Agriculture interagency research forum on invasive species 2008*. (ed by KA McManus & KW Gottschalk) Annapolis, pp 8–9.
- Böröczky K, Crook DJ, Jones TH, Kenny JC, Zylstra KE, Mastro VC & Tumlinson JH (2009). Monoalkenes as contact sex pheromone components of the woodwasp *Sirex noctilio*. *Journal of chemical ecology* 35:1202–11.
- Brand JM, Schultz J, Barras SJ, Edson LJ, Payne TL & Hedden RL (1977). Enhancement of

- Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae) aggregation pheromone by yeast metabolites in laboratory bioassays. *Journal of Chemical Ecology* 3:657–666.
- Bruce TJA (2010). Exploiting plant signals in sustainable agriculture. In: *Plant communication from an ecological perspective, signaling and communication in plants*, (ed. by BF & V Ninkovic) Springer-Verlag, Berlin, pp 215–227.
- Bruce TJA & Pickett JA (2011). Perception of plant volatile blends by herbivorous insects - Finding the right mix. *Phytochemistry* 72:1605–1611.
- Bruzzone OA, Villacide JM, Bernstein C & Corley JC (2009). Flight variability in the woodwasp *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae): an analysis of flight data using wavelets. *The Journal of Experimental Biology* 212:731–737.
- Bryant PW (2010). Kairomonal attraction of the parasitoid *Ibalia leucospoides* (Hymenoptera: Ibalidae) to volatiles of the fungus *Amylostereum areolatum*, an obligate symbiont of the European woodwasp, *Sirex noctilio*. Tesis de maestría, College of Environmental Science and Forestry, State University of New York.
- Campos MCG, Campos MLG, Turatti I & Nascimento FS (2012). Cuticular hydrocarbon variation of castes and sex in the weaver ant *Camponotus textor* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 59:1025–1036.
- Carnegie AJ, Eldridge RH & Waterson DG (2005). History and management of *Sirex* wood wasp in pine plantations in New South Wales, Australia. *New Zealand Journal of Forestry Science* 35:3–24.
- Castelo MK & Lazzari CR (2004). Host-seeking behavior in larvae of the robber fly *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). *Journal of Insect Physiology* 50:331–336.
- Castelo MK, Corley JC & Desouhant E (2003). Conspecific avoidance during foraging in *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae): The roles of host presence and conspecific densities. *Journal of Insect Behavior* 16:307–318.
- Chrystal RN (1930). *Studies of the Sirex parasites*. Oxford Univ. Press, London. p 63.
- Cock MJW, Murphy ST, Kairo MTK, Thompson E, Murphy RJ & Francis AW (2016). Trends in the classical biological control of insect pests by insects: an update of the BIOCAT database. *BioControl* 61:349–363.
- Colazza S, Salerno G & Wajnberg É (1999). Volatile and contact chemicals released by *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae) have a kairomonal effect on the egg parasitoid *Trissolcus basalis* (Hymenoptera: Scelionidae). *Biological Control* 16:310–317.
- Coll M & Wajnberg E (2017). *Environmental pest management: Challenges for agronomists*,

- ecologists, economists and policymakers (Ed. by M Coll & E Wajnberg). Wiley, Oxford, p 448.
- Cook SM, Khan ZR & Pickett JA (2007). The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annual Review of Entomology* 52:375–400.
- Cordero Rivera A, Santolamazza Carbone S & Andrés JA (1999). Life cycle and biological control of the *Eucalyptus* snout beetle (Coleoptera, Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera, Mymaridae) in north-west Spain. *Agricultural and Forest Entomology* 1:103–109.
- Corley JC & Jervis MA (2012). Forest pest management: A global challenge. *International Journal of Pest Management* 58:193–194.
- Corley JC & Villacide JM (2005). Una visión dinámica del manejo de la plaga forestal *Sirex noctilio*. *Idia*:132–134.
- Corley JC, Villacide JM & Bettinelli J (2002). Dinámica poblacional de la plaga *Sirex noctilio*: endemias y epidemias. *SAGPyA Forestal* 23:1–9.
- Corley JC, Villacide JM & Bruzzone OA (2007). Spatial dynamics of a *Sirex noctilio* woodwasp population within a pine plantation in Patagonia, Argentina. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 125:231–236.
- Corley JC, Villacide JM & van Nouhuys S (2010). Patch time allocation by a parasitoid: The influence of con-specifics, host abundance and distance to the patch. *Journal of Insect Behavior* 23:431–440.
- Corley JC, Villacide JM & Liebhold AM (2014). Can entomophagous nematodes slow the spread of invasive pest population? The case study of *Beddingia siricidicola* released for the management of *Sirex noctilio*. *Journal of Pest Science* 87:551–557.
- Cournoyer M & Boivin G (2004). Infochemical-mediated preference behavior of the parasitoid *Microctonus hyperodae* when searching for its adult weevil hosts. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 112:117–124.
- Coutts MP (1965). *Sirex noctilio* and the physiology of *Pinus radiata*. Some studies of interactions between the insect, the fungus, and the tree in Tasmania. Forestry Research Institute Canberra. Bulletin Nro. 41, 79pp.
- Coutts MP (1969). The mechanism of pathogenicity of *Sirex noctilio* on *Pinus radiata*. I. Effects of the symbiotic fungus *Amylostereum* sp. *Australian Journal of Biological Sciences* 22:915–924.
- Coutts MP & Dolezal JE (1965). *Sirex noctilio*, its associated fungus, and some aspects of wood

- moisture content. *Australian Forestry Research* 1:3–13.
- Coutts MP & Dolezal JE (1969). Emplacement of fungal spores by the woodwasp, *Sirex noctilio*, during oviposition. *Forest Science* 15:412–416.
- Crespo JE (2011). Ecología y fisiología del comportamiento de localización del hospedador en el parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Tesis doctoral FCEyN, UBA.
- Da Rocha L, Kolberg R, De Mendonça MS & Redaelli LR (2007). Body size variation in *Gryon gallardoi* related to age and size of the host. *BioControl* 52:161–173.
- Desouhant E, Driessen G, Amat I & Bernstein C (2005). Host and food searching in a parasitic wasp *Venturia canescens*: a trade-off between current and future reproduction? *Animal Behaviour* 70:145–152.
- De Vis RMJ, Mendez H & van Lenteren JC (2003). Comparison of foraging behavior, interspecific host discrimination, and competition of *Encarsia formosa* and *Amitus fuscipennis*. *Journal of Insect Behavior* 16:117–152.
- Dicke M (1999). Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 91:131–142.
- Dicke M & van Loon JJA (2000). Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 97:237–249.
- Dicke M, Van Lenteren JC, Boskamp GJF & van Dongen-van Leeuwen E (1984). Chemical stimuli in host-habitat location by *Leptopilina heterotoma* (Thomson) (Hymenoptera: Eucoilidae), a parasite of *Drosophila*. *Journal of Chemical Ecology* 10:695–712.
- DPF (2014). Argentina: Plantaciones forestales y gestión sostenible. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación.
- Du Y, Poppy GM, Powell W, Pickett JA, Wadhams L J & Woodcock CM (1998). Identification of semiochemicals released during aphid feeding that attract parasitoid *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology* 24:1355–1368.
- Dukas R (2008). Evolutionary biology of insect learning. *Annual Review of Entomology* 53:145–160.
- Eisner T & Meinwald J (1995). *Chemical ecology: The chemistry of biotic interaction* (Ed. by T Eisner & J Meinwald). National Academy Press, Washington, USA.
- Ellers J, Sevenster JG & Driessen G (2000) Egg load evolution in parasitoids. *American Naturalist* 156: 650–665.

- Erbilgin N & Raffa KF (2000). Opposing effects of host monoterpenes on response by two sympatric species of bark beetles to their aggregation pheromones. *Journal of Chemical Ecology* 26:2527–2548.
- Erbilgin N & Raffa KF (2001). Modulation of predator attraction to pheromones of two prey species by stereochemistry of plant volatiles. *Oecologia* 127:444–453.
- Erbilgin N, Powell JS & Raffa KF (2003). Effect of varying monoterpene concentrations on the response of *Ips pini* (Coleoptera: Scolytidae) to its aggregation pheromone: implications for pest management and ecology of bark beetles. *Agricultural and Forest Entomology* 5:269–274.
- Eskiviski ER, Núñez Cresto M, Olmedo D & de Coll O del R (2004). Aspectos biológicos de *Sirex noctilio* F. y el Parasitismo de *Ibalia leucospoides* H. en plantaciones de *Pinus* sp. en Santo Tomé, Corrientes. XI Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales - FCF, UNaM - EEA Montecarlo, INTA.
- Espinosa Zúñiga HA, Lavanderos V & Lobos C (1986). Reconocimiento de la plaga *Sirex noctilio* en plantaciones de pinos de Uruguay y Argentina. Proyecto FAO: Prevención y control de plagas en plantaciones de pino insigne, s/p.
- Evans JA, Eyre CA, Rogers HJ, Boddy L & Müller CT (2008). Changes in volatile production during interspecific interactions between four wood rotting fungi growing in artificial media. *Fungal Ecology* 1:57–68.
- Fan J, Sun J & Shi J (2007). Attraction of the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, to volatiles from stressed host in China. *Annals of Forest Science* 64:67–71.
- FAO (2010). Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010: Informe principal. Roma.
- Fatouros NE, Dicke M, Mumm R, Meiners T & Hilker M (2008). Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. *Behavioral Ecology* 19:677–689.
- Fatouros NE, Bukovinszky Kiss G, Kalkers LA, Soler Gamborena R, Dicke M & Hilker M (2005). Oviposition-induced plant cues: do they arrest *Trichogramma* wasps during host location? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115:207–215.
- Fernández Ajó AA, Martínez AS, Villacide JM & Corley JC (2015). Behavioural response of the woodwasp *Sirex noctilio* to volatile emissions of its fungal symbiont. *Journal of Applied Entomology* 139: 654-659.
- Fernández-Arhex V & Corley JC (2010). The effects of patch richness on con-specific interference in the parasitoid *Ibalia leucospoides* (Hymenoptera: Ibalidae). *Insect Science* 17:379–385.

- Fischbein D & Corley JC (2014). Classical biological control of an invasive forest pest: a world perspective of the management of *Sirex noctilio* using the parasitoid *Ibalia leucospoides* (Hymenoptera: Ibalidae). *Bulletin of Entomological Research* 105:1-12.
- Fischbein D, Bernstein C & Corley JC (2013). Linking reproductive and feeding strategies in the parasitoid *Ibalia leucospoides*: does feeding always imply profit? *Evolutionary Ecology* 27:619–634.
- Fischbein D, Corley JC, Villacide JM & Bernstein C (2011). The influence of food and conspecifics on the flight potential of the parasitoid *Ibalia leucospoides*. *Journal of Insect Behavior* 24:456–467.
- Fischbein D, Bettinelli J, Bernstein C & Corley JC (2012). Patch choice from a distance and use of habitat information during foraging by the parasitoid *Ibalia leucospoides*. *Ecological Entomology* 37:161–168.
- Fischer S, Samietz J, Wäckers FL & Dorn S (2001). Interaction of vibrational and visual cues in parasitoid host location. *Journal of Comparative Physiology A* 187:785–791.
- Foelkel E, Redaelli LR, Jahnke SM & Losekann PB (2009). Predation and parasitism of *Cirrospilus neotropicus* (Hymenoptera: Eulophidae) on *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) in laboratory. *Revista Colombiana de Entomología* 35:156–162.
- Fritz G (1993). *Sirex noctilio*, su presencia en Dina Huapi y el impacto sobre el recurso forestal de la región. Informe Dirección General de Bosques y Fauna de Río Negro - Servivio Forestal Andino. Bariloche, p 8.
- Gilmour JW (1965). The life cycle of the fungal symbiont of *Sirex noctilio*. *New Zealand Journal of Forestry* 10:80–89.
- Giron D, Pincebourde S & Casas J (2004). Lifetime gains of host feeding in a synovigenic parasitic wasp. *Physiological Entomology* 29:436–442.
- Giron D, Rivero A, Mandon N, Darrouzet E & Casas J (2002). The physiology of host feeding in parasitic wasps: Implications for survival. *Functional Ecology* 16:750–757.
- Giunti G, Canale A, Messing RH, Donati E, Stefanini C, Michaud JP & Benelli G (2015) Parasitoid learning: Current knowledge and implications for biological control. *Biological Control* 90:208–219.
- Godfray HCJ (1994). *Parasitoids: Behavioral and evolutionary ecology* (Ed. by HCJ Godfray). Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA, p 473.
- Gohole LS, Overholt WA, Khan ZR & Vet LEM (2003). Role of volatiles emitted by host and non-host plants in the foraging behaviour of *Dentichasmias busseolae*, a pupal parasitoid of

- the spotted stemborer *Chilo partellus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 107:1–9.
- Gomez CA (2003). Relación entre la acumulación de días grado y el vuelo estacional de la mariposa europea del brote. *Bosque* 24:57–63.
- Goubault M, Plantegenest M, Poinso D & Cortesero AM (2003). Effect of expected offspring survival probability on host selection in a solitary parasitoid. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 109:123–131.
- Greany PD, Tumlinson JH, Chambers DL & Boush GM (1977). Chemically mediated host finding by *Biosteres (Opus) longicaudatus*, a parasitoid of tephritid fruit fly larvae. *Journal of Chemical Ecology* 3:189–195.
- Guerrieri E, Pennacchio F & Tremblay E (1997). Effect of adult experience on in-flight orientation to plant and plant-host complex volatiles in *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera, Braconidae). *Biological Control* 10:159–165.
- Gullan PJ & Cranston PS (2000). Pest management: biological control. In: *The insects: an outline of entomology*. Second edition. Blackwell Science LTD, pp 385–395.
- Gut L J, Stelinski LL, Thomson DR & Miller JR (2004). Behaviour-modifying chemicals: prospects and constraints in IPM. In: *Integrated pest management. Potential, constraints and challenges* (ed. by O Koul, GS Dhaliwal & GW Cuperus), First edition. CABI Publishing, Wallingford, pp 73–122.
- Gutiérrez-Ibáñez C, Villagra CA & Niemeyer HM (2007). Pre-pupation behaviour of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Haliday) and its consequences for pre-imaginal learning. *Naturwissenschaften* 94:595–600.
- Häckermann J, Rott AS & Dorn S (2007). How two different host species influence the performance of a gregarious parasitoid: host size is not equal to host quality. *Journal of Animal Ecology* 76:376–383.
- Hajek AE (2004). *Natural enemies. An introduction to biological control*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 378.
- Hajek AE, McManus ML & Delalibera I (2007). A review of introductions of pathogens and nematodes for classical biological control of insects and mites. *Biological Control* 41:1–13.
- Hakola H, Tarvainen V, Bäck J, Ranta H, Bonn B, Rinne J & Kulmala M (2006). Seasonal variation of mono- and sesquiterpene emission rates of Scots pine. *Biogeosciences* 3:93–101.
- Haugen DA (1990). Control procedures for *Sirex noctilio* in the Green Triangle: Review from detection to severe outbreak (1977-1987). *Australian Forestry* 53:24–32.

- Havill NP & Raffa KF (2000). Compound effects of induced plant responses on insect herbivores and parasitoids: implications for tritrophic interactions. *Ecological Entomology* 25:171–179.
- Hawkins BA (1994). *Pattern and process in host-parasitoid interactions*. Cambridge University Press, Cambridge, p 190.
- Hawkins BA & Cornell H V (1999). *Theoretical approaches to biological control* (Ed. by BA Hawkins & H V Cornell). Cambridge University Press, Cambridge, UK, p 412.
- Hawkins BA, Mills NJ, Jervis MA & Price PW (1999). Is the biological control of insects a natural phenomenon? *Oikos* 86:493–506.
- Herrmann A (2010a). Volatiles – An interdisciplinary approach. In: *The chemistry and biology of volatiles* (ed. by A Herrmann), First edition. John Wiley & Sons Ltd., Geneva, Switzerland, pp 1–10.
- Herrmann A (2010b). *The chemistry and biology of volatiles* (Ed. by A Herrmann), First edition. John Wiley & Sons Ltd., Geneva, Switzerland, p 402.
- Heuskin S, Verheggen FJ, Haubruge E, Wathelet J & Lognay G (2011). The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 15:459–470.
- Heuskin S, Lorge S, Godin B, Leroy P, Frère I, Verheggen FJ, Haubruge E, Wathelet J-P, Mestdagh M, Hance T & Lognay G (2012). Optimisation of a semiochemical slow-release alginate formulation attractive towards *Aphidius ervi* Haliday parasitoids. *Pest Management Science* 68:127–136.
- Hilker M & Meiners T (2006). Early herbivore alert: insect eggs induce plant defense. *Journal of Chemical Ecology* 32:1379–1397.
- Hilker M & McNeil J (2008). Chemical and behavioral ecology in insect parasitoids: how to behave optimally in a complex odorous environment. In: *Behavioral ecology of insect parasitoids: From theoretical approaches to field applications* (ed. by É Wajnberg, C Bernstein & J van Alphen), First edition. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp 92–112.
- Hilker M, Kobs C, Varama M & Schrank K (2002). Insect egg deposition induces *Pinus sylvestris* to attract egg parasitoids. *The Journal of Experimental Biology* 205:455–561.
- Ho TTG & Ueno T (2008). Host discrimination and factors affecting incidence of superparasitism in *Hemiptarsenus varicornis* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University* 53:447–452.

- Hoffmann AA & Parsons PA (1984). Olfactory response and resource utilization in *Drosophila*: interspecific comparisons. *Biological Journal of the Linnean Society* 22:43–53.
- Hoffmeister TS & Gienapp P (1999). Exploitation of the host's chemical communication in a parasitoid searching for concealed host larvae. *Ethology* 105:223–232.
- Hubbard ASF, Marris G, Reynolds A & Rowe GW (1987). Adaptive patterns in the avoidance of superparasitism by solitary parasitic wasps. *Journal of Animal Ecology* 56:387–401.
- Hugues JP, Harvey IF & Hubbard SF (1994). Host-searching behavior of *Venturia canescens* (Grav.) (Hymenoptera: Ichneumonidae): Interference - The effect of mature egg load and prior behavior. *Journal of Insect Behavior* 7:433–453.
- Hurley BP, Slippers B & Wingfield MJ (2007). A comparison of control results for the alien invasive woodwasp, *Sirex noctilio*, in the southern hemisphere. *Agricultural and Forest Entomology* 9:159–171.
- Iede ET, Penteadó SRC & Filho WR (2010). *Sirex* research and management in South America. Proceedings 21st U.S. Department of Agriculture interagency research forum on invasive species 2010 (ed. by KA McManus & KW Gottschalk), USDA, Forest Service, Annapolis, pp 32–34.
- Iede ET, Penteadó SRC, Gaida DCM & da Siva SMS (1992). Panorama a nível mundial da ocorrência de *Sirex noctilio* F. (Hymenoptera: Siricidae). Conferência Regional da Vespa da Madeira, *Sirex noctilio*. Anais (EMBRAPA), p 23–33.
- Iede ET, Penteadó SRC, Filho WR & Schaitza EG (2000). Updated situation of *Sirex noctilio* integrated management program in Brazil. *Serie Técnica IPEF*, **13**, 11-20.
- Ioriatti C, Anfora G, Tasin M, De Cristofaro A, Witzgall P & Lucchi A (2011). Chemical ecology and management of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology* 104:1125–1137.
- Janssen A, Alphen JJM Van, Sabelis MW & Bakker K (1995). Odour-mediated avoidance of competition in *Drosophila* parasitoids: the ghost of competition. *Oikos* 73:356–366.
- Jayashankar M, Prasad S & Kandakoor S (2016). Conservation of arthropod parasites: Restoring crucial ecological linkages. In: *Arthropod diversity and conservation in the tropics and sub-tropics* (ed. by A Chakravarty & S Sridhara), First edition. Springer, Singapore, pp 33–56.
- Jervis M (1998). Functional and evolutionary aspects of mouthpart structure in parasitoid wasps. *Biological Journal of the Linnean Society* 63:461–493.
- Jervis MA & Kidd NAC (1986). Host-feeding strategies in Hymenopteran parasitoids. *Biological*

Review 61:395–434.

Jervis MA, Ellers J & Harvey JA (2008). Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. *Annual Review of Entomology* 53:361–385.

Joseph G, Kelsey RG, Peck RW & Niwa CG (2001). Response of some Scolytids and their predators to ethanol and 4-allylanisole in pine forests of central Oregon. *Journal of Chemical Ecology* 27:697–715.

Kaplan I (2012). Trophic complexity and the adaptive value of damage-induced plant volatiles. *PLoS Biology* 10:e1001437.

Keefover-Ring K & B LY (2010). Variable chemistry and herbivory of ponderosa pine cones. *International Journal of Plant Sciences* 171:293–302.

Kelsey RG & Joseph G (2001) Attraction of *Scolytus unispinosus* bark beetles to ethanol in water-stressed Douglas-fir branches. *Forest Ecology and Management* 144:229–238.

Kenealy WR & Dietrich DM (2004). Growth and fermentation responses of *Phanerochaete chrysosporium* to O₂ limitation. *Enzyme and Microbial Technology* 34:490–498.

Khan ZR & Pickett JA (2004). The “push-pull” strategy for stemborer management: a case study in exploiting biodiversity and chemical ecology. In: *Ecological engineering for pest management: Advances in habitat manipulation for arthropods* (ed. by MG Gurr, SD Wratten & MA Altieri). CSIRO and CABI publishing, Wallington, Oxon, UK, pp 155–164.

Khan ZR, Pickett JA, van den Berg J, Wadhams LJ & Woodcock CM (2000). Exploiting chemical ecology and species diversity: stem borer and striga control for maize and sorghum in Africa. *Pest Management Science* 56:957–962.

Khan ZR, Hassanali A, Pickett JA, Wadhams LJ & Muyekho F (2003). Strategies for control of cereal stemborers and striga weed in maize-based farming systems in eastern africa involving “ push-pull” and allelopathic tactics, respectively. *African Crop Science Conference Proceeding*. African Crop Science Society, Kampala, Uganda, pp 602–608.

Klasmer P, Corley JC & Botto E (1997). Presencia de la avispa barrenadora de los pinos *Sirex noctilio* F. (Hymenoptera: Siricidae) en la región andino-patagónica de Argentina. Estado actual de las investigaciones para su control biológico. *Congreso Internacional de Plagas Forestales*, Pucón, Chile.

Klowden MJ (2007). Communication systems. In: *Physiological systems in insects* (ed. by MJ Klowden), Second edition. Elsevier Inc., San Diego, USA, p 688.

Kugimiya S, Shimoda T, Tabata J & Takabayashi J (2010). Present or past herbivory: a screening of volatiles released from *Brassica rapa* under caterpillar attacks as attractants for the

- solitary parasitoid, *Cotesia vestalis*. *Journal of Chemical Ecology* 36:620–628.
- Lanfranco D & Ide S (2000). Establecimiento de *Orgilus obscurator* y niveles de parasitismo sobre *Rhyacionia buoliana* entre la Séptima y Décima Regiones de Chile. *Bosque* 21:111–126.
- Langley SA, Tilmon KJ, Cardinale BJ & Ives AR (2006). Learning by the parasitoid wasp, *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae), alters individual fixed preferences for pea aphid color morphs. *Oecologia* 150:172–179.
- Lantschner M & Corley J (2015). Spatial pattern of attacks of the invasive woodwasp *Sirex noctilio*, at landscape and stand scales. *PLoS One* 10:e0127099.
- Larsson MC & Svensson GP (2005). Methods in insect sensory ecology. In: *Methods in insect sensory neuroscience* (ed. by TA Christensen), First edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 27–58.
- Latta RG, Linhart YB, Lundquist L & Snyder MA (2000). Patterns of monoterpene variation within individual trees in ponderosa pine. *Journal of Chemical Ecology* 26:1341–1357.
- Lebreton S, Labarussias M, Chevrier C & Darrouzet E (2009). Discrimination of the age of conspecific eggs by an ovipositing ectoparasitic wasp. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 130:28–34.
- Lenoir A, Depickère S, Devers S, Christidès J-P & Detrain C (2009). Hydrocarbons in the ant *Lasius niger*: from the cuticle to the nest and home range marking. *Journal of Chemical Ecology* 35:913–921.
- Leufvén A, Bergström G & Falsen E (1988). Oxygenated monoterpenes produced by yeasts, isolated from, *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) and grown in phloem medium. *Journal of Chemical Ecology* 14:353–362.
- Lewis WJ & Takasu K (1990). Use of learned odours by a parasitic wasp in accordance with host and food needs. *Nature* 348:635–636.
- Lewis WJ, Vet LEM, Tumlinson JH, Van Lenteren JC & Papaj DR (1990). Variations in parasitoid foraging behavior: Essential element of a sound biological control theory. *Environmental Entomology* 19:1183–1193.
- Li X, Zhu L, Meng L & Li B (2017). Brood size and sex ratio in response to host quality and wasp traits in the gregarious parasitoid *Oomyzus sokolowskii* (Hymenoptera: Eulophidae). *PeerJ* 5:e2919.
- Liebhold AM (2012). Forest pest management in a changing world. *International Journal of Pest Management* 58:289–295.

- Lim UT & Hoy MA (2005). Biological assessment in quarantine of *Semielacher petiolatus* (Hymenoptera: Eulophidae) as a potential classical biological control agent of citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae), in Florida. *Biological Control* 33:87–95.
- Lindgren BS & Borden JH (1993). Displacement and aggregation of mountain pine beetles, *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae), in response to their antiaggregation and aggregation pheromones. *Canadian Journal of Forest Research* 23:286–290.
- Loch AD (2008). Parasitism of the Eucalyptus weevil, *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal, by the egg parasitoid, *Anaphes nitens* Girault, in *Eucalyptus globulus* plantations in southwestern Australia. *Biological Control* 47:1–7.
- Logan JG & Birkett MA (2007). Semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. *Pest Management Science* 63:647–657.
- Madden JL (1968). Behavioural responses of parasites to the symbiotic fungus associated with *Sirex noctilio* F. *Nature* 218:189–190.
- Madden JL (1974). Oviposition behaviour of the woodwasp, *Sirex noctilio* F. *Australian Journal of Zoology* 22:341–351.
- Madden JL (1981). Egg and larval development in the woodwasp, *Sirex noctilio* F. *Australian Journal of Zoology* 29:493–506.
- Madden JL (1988). *Sirex* in Australasia. In: *Dynamics of forest insect populations. Patterns: causes, implications* (ed. by AA Berryman). Plenum Press, New York and London, pp 407–429.
- Mallinger RE, Hogg DB & Gratton C (2011). Methyl salicylate attracts natural enemies and reduces populations of soybean aphids (Hemiptera: Aphididae) in soybean agroecosystems. *Journal of Economic Entomology* 104:115–124.
- Manninen AM, Tarhanen S, Vuorinen M & Kainulainen P (2002). Comparing the variation of needle and wood terpenoids in Scots pine provenances. *Journal of Chemical Ecology* 28:211–228.
- Maredia KM (2003). Introduction and overview. In: *Integrated pest management in the global arena* (ed. by KM Maredia, D Dakouo & D Mota-Sanchez), CABI publishing, Cambridge, UK, pp 1-8.
- Mareggiani G (2001). Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 60:22–30.
- Marrone PG (2009). Barriers to adoption of biological control agents and biological pesticides.

- In: Integrated pest management. Concepts, tactics, strategies and case studies (ed. by EB Radcliffe, WD Hutchison & RE Cancelado), First edition. Cambridge University Press, Cambridge, pp 163–178.
- Martínez AS & Hardie J (2009). Hygroreception in olfactometer studies. *Physiological Entomology* 34:211–216.
- Martínez AS, Fernández-Arhex V & Corley JC (2006). Chemical information from the fungus *Amylostereum areolatum* and host-foraging behaviour in the parasitoid *Ibalia leucospoides*. *Physiological Entomology* 31:336–340.
- Meiners T & Hilker M (1997). Host location in *Oomyzus gallerucae* (Hymenoptera: Eulophidae), an egg parasitoid of the elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Oecologia* 112:87–93.
- Midega CAO, Jonsson M, Khan ZR & Ekbom B (2014). Effects of landscape complexity and habitat management on stemborer colonization, parasitism and damage to maize. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 188:289–293.
- Millar JC & Haynes KF (1998). *Methods in chemical ecology. Volume 1: Chemical methods* (Ed. by JG Millar & KF Haynes). Kluwer Academic Publishers, Boston, USA.
- Mills GA & Walker V (2000). Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *Journal of Chromatography A* 902:267–287.
- Mills GA & Walker V (2001). Headspace solid-phase microextraction profiling of volatile compounds in urine: application to metabolic investigations. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 753:259–268.
- Mills NJ & Wajnberg É (2008). Optimal foraging behavior and efficient biological control methods. In: *Behavioral ecology of insect parasitoids: From theoretical approaches to field applications* (ed. by É Wajnberg, C Bernstein & JJM van Alphen), First edition. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp 3–30.
- De Moraes CM, Lewis WJ, Pare PW, Alborn HT & Tumlinson JH (1998). Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* 393:570–573.
- Morehead SA & Feener DH (2000). Visual and chemical cues used in host location and acceptance by a dipteran parasitoid. *Journal of Insect Behavior* 13:613–625.
- Morgan FD (1968). Bionomics of Siricidae. *Annual Review of Entomology* 13:239–256.
- Mori K (2010). Pheromones in chemical communication. In: *The chemistry and biology of volatiles* (ed. by A Herrmann), First edition. John Wiley & Sons Ltd., Geneva, Switzerland,

pp 123–149.

Mumm R & Hilker M (2005). The significance of background odour for an egg parasitoid to detect plants with host eggs. *Chemical Senses* 30:337–343.

Mumm R, Tiemann T, Schulz S & Hilker M (2004). Analysis of volatiles from black pine (*Pinus nigra*): significance of wounding and egg deposition by a herbivorous sawfly. *Phytochemistry* 65:3221–3230.

Mumm R & Hilker M (2006) Direct and indirect chemical defence of pine against folivorous insects. *Trends in Plant Science* 11:351–358.

Mumm R, Schrank K, Wegener R, Schulz S & Hilker M (2003). Chemical analysis of volatiles emitted by *Pinus sylvestris* after induction by insect oviposition. *Journal of Chemical Ecology* 29:1235–1252.

Muratori F, Le Ralec A, Lognay G & Hance T (2006). Epicuticular factors involved in host recognition for the aphid parasitoid *Aphidius rhopalosiphi*. *Journal of Chemical Ecology* 32:579–593.

Neumann FG & Minko G (1981). The sirex wood wasp in Australian radiata pine plantations. *Australian Forestry* 44:46–63.

Neumann FG & Morey JL (1984). Influence of natural enemies on the *Sirex wood* wasp in herbicide-treated trap trees of radiata pine in north-eastern Victoria. *Australian Forestry* 47:218–224.

Neumann FG, Morey JL & McKimm RJ (1987) The sirex wasp in Victoria. Bulletin No. 29, Department of Conservation, Forests and Lands Victoria, Australia. 41 pp.

Ngi-song AJ & Overholt WA (1997). Host location and acceptance by *Cotesia flavipes* Cameron and *C. sesamiae* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of african gramineous stemborers: Role of frass and other host cues. *Biological Control* 142:136–142.

Noldus LPJJ (1989). Semiochemicals, foraging behaviour and quality of entomophagous insects for biological control. *Journal of Applied Entomology* 108:425–451.

Noldus LPJJ, Potting RPJ & Barendregt HE (1991). Moth sex pheromone adsorption to leaf surface: bridge in time for chemical spies. *Physiological Entomology* 16:329–344.

Nordlander G, Liu Z & Ronquist F (1996). Phylogeny and historical biogeography of the cynipoid wasp family Ibalidae (Hymenoptera). *Systematic Entomology* 21:151–166.

Nordlund DA & Lewis WJ (1976). Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and

- interspecific interactions. *Journal of Chemical Ecology* 2:211–220.
- Nussbaum-Krammer CI, Neto MF, Brielmann RM, Pedersen JS & Morimoto RI (2015). Investigating the spreading and toxicity of prion-like proteins using the metazoan model organism *C. elegans*. *Journal of Visualized Experiments* (95):52321.
- Nuttall MJ (1980). Insect parasites of sirex. *Forest and Timber Insects in New Zealand* No. 47, New Zealand Forest Service. 12 pp.
- Nuttall MJ (1989). *Sirex noctilio* F., sirex wood wasp (Hymenoptera: Siricidae). In: A review of biological control of pests and weeds in New Zealand from 1984 To 1987 (ed. by PJ Cameron, RL Hill, J Bain & WP Thomas). Tech. Communication No. 10, C.A.B. International & DSIR, Wallingford, UK, pp 299–306.
- Okamoto K, Imashiro K, Akizawa Y, Onimura A, Yoneda M, Nitta Y, Maekawa N & Yanase H (2010). Production of ethanol by the white-rot basidiomycetes *Peniophora cinerea* and *Trametes suaveolens*. *Biotechnology Letters* 32:909–913.
- Omkar BK (2016). Biocontrol of insect pests. In: *Ecofriendly pest management for food security* (ed. by BK Omkar), First edition. Academic Press, USA, pp 25–62.
- Paine TD, Raffa KF & Harrington TC (1997). Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annual Review of Entomology* 42:179–206.
- Pélozuelo L & Frérot B (2007). Monitoring of european corn borer with pheromone-baited traps: Review of trapping system basics and remaining problems. *Journal of Economic Entomology* 100:1797–1807.
- Peng S (1983). Biological control - one of the fine traditions of ancient Chinese agricultural techniques. *Scientia Agricultura Sinica* 1:92–98.
- Pettersson J (1970). An aphid sex attractant. I. Biological studies. *Entomologica Scandinavica* 1:63–73.
- Pettersson EM, Sullivan BT, Anderson P, Berisford CW & Birgersson G (2000). Odor perception in the baek beetle parasitoid *Roptrocerus xylophagorum* exposed to host associated volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 26:2507–2525.
- Pietrantuono AL (2007) Apectos de la nutrición del parasitoide *Ibalia leucopsoides* Hochenwarth (Himenoptera: Ibaliiidae). Tesis de grado CRUB, Universidad Nacional del Comahue.
- Pimentel D (2002). *Encyclopedia of pest management* (Ed. by D Pimentel). Marcel Dekker, New York, p 931.

- Powell W & Poppy G (2001). Host location by parasitoids. In: Insect movement mechanisms and consequences. Proceedings of the Royal Entomological Society's 20th Symposium. (ed. by I Woiwood, D Reynolds & C Thomas). CABI Publisher, Wallingford, UK, pp 111–128.
- Powell W, Pennacchio F, Poppy GM & Tremblay E (1998). Strategies involved in the location of hosts by the parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Biological Control* 112:104–112.
- Ramírez CC, Fuentes-Contreras E, Rodríguez LC & Niemeyer HM (2000). Pseudoreplication and its frequency in olfactometric laboratory studies. *Journal of Chemical Ecology* 26:1423–1431.
- Ramos Sanz M & Lanfranco D (2010). El complejo de parasitoides de la polilla del brote del pino en Chile: pasado, presente y posible escenario futuro. *Bosque* 31:100–108.
- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.
- Reddy GVP, Holopainen JK & Guerrero A (2002). Olfactory responses of *Plutella xylostella* natural enemies to host pheromone, larval frass, and green leaf cabbage volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 28:131–143.
- Rhoades DF (1985). Offensive–defensive interactions between herbivores and plants: their relevance in herbivore population communities. *Ecological Monographs* 58:39–55.
- Rivero A & Casas J (1999). Incorporating physiology into parasitoid behavioral ecology: the allocation of nutritional resources. *Researches on Population Ecology* 41:39–45.
- Rodriguez-Saona C, Blaauw BR & Isaacs R (2012). Manipulation of natural enemies in agroecosystems: habitat and semiochemicals for sustainable insect pest control. In: *Integrated pest management and pest control – Current and future tactics*, (ed. by ML Larramendy & S Soloneski), First edition. InTech, Rijeka, Croatia, pp 89–126.
- Rojas JC, Castillo A & Virgen A (2006). Chemical cues used in host location by *Phymastichus coffea*, a parasitoid of coffee berry borer adults, *Hypothenemus hampei*. *Biological Control* 37:141–147.
- Sahota TS, Leal I, White E, Manville JF, Ibaraki A & Hollmann J (1998) Acetone affects flight behaviour and expression of the vitellogenin gene of *Pissodes strobi*. *The Canadian Entomologist* 130:383–384.
- Salerno G, Conti E, Peri E, Colazza S & Bin F (2006). Kairomone involvement in the host specificity of the egg parasitoid *Trissolcus basalus* (Hymenoptera: Scelionidae). *European Journal of Entomology* 103:311–318.

- Santos AM, Vasconcelos T, Mateus E, Farrall MH, Gomes da Silva MDR, Paiva MR & Branco M (2006). Characterization of the volatile fraction emitted by phloems of four pinus species by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1105:191–198.
- Schoonhoven LM, van Loon JJA & Dicke M (2005). *Insect–Plant Biology* (Ed. by LM Schoonhoven, JJA van Loon, & M Dicke). Oxford University Press, Oxford.
- Schowalter T (2007). Resource allocation. In: *Insect ecology. An ecosystem approach* (ed. by T Schowalter), Second edition. Elsevier, pp 95–122.
- Siekmann G, Keller MA, Tenhumberg B, Siekmann G, Keller MA & Tenhumberg B (2004). The sweet tooth of adult parasitoid *Cotesia rubecula*: ignoring nests for nectar? *Journal of Insect Behavior* 17:459–476.
- Sirost E & Bernstein C (1996). Time sharing between host searching and food searching in parasitoids: state-dependent optimal strategies. *Behavioral Ecology* 7:189–194.
- Sithanantham S, Chandish RB, Jalali SK & Bakthavatsalam N (2013). Biological control of insect pests using egg parasitoids (Ed. by S Sithanantham, RB Chandish, SK Jalali, & N Bakthavatsalam). Springer, New Delhi, India, p 424.
- Slippers B, de Groot P & Wingfield MJ (2012). The sirex woodwasp and its fungal symbiont. Research and management of a worldwide invasive pest (Ed. by B Slippers, P de Groot, & MJ Wingfield). Springer, London, p 301.
- Smith DR & Schiff NM (2002). A review of the siricid woodwasps and their Ibalid parasitoids (Hymenoptera: Siricidae, Ibalidae) in the eastern United States, with emphasis on the Mid-Atlantic region. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 104:174–194.
- Spradbery JP (1974). The responses of *Ibalia* species (Hymenoptera: Ibalidae) to the fungal symbionts of siricid woodwasp hosts. *Journal of Entomology (A)* 48:217–222.
- Spradbery JP (1977). The oviposition biology of siricid woodwasps in Europe. *Ecological Entomology* 2:225–230.
- Steidle JLM, Steppuhn A & Reinhard J (2001). Volatile cues from different host complexes used for host location by the generalist parasitoid *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Basic and Applied Ecology* 2:45–51.
- Stowe MK, Turlings TCJ, Loughrin JH, Lewis WJ & Tumlinson JH (1995). The chemistry of eavesdropping, alarm, and deceit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:23–8.

- Sullivan BT & Berisford CW (2004). Semiochemicals from fungal associates of bark beetles may mediate host location behavior of parasitoids. *Journal of Chemical Ecology* 30:703–17.
- Sullivan BT, Pettersson EM, Seltmann KC & Berisford CW (2000). Attraction of the bark beetle parasitoid *Roptrocerus xylophagorum* (Hymenoptera: Pteromalidae) to host-associated olfactory cues. *Environmental Entomology* 29:1136–1151.
- Taiz L & Zeiger E (2002). Secondary metabolites and plant defense. In: *Plant physiology* (ed. by L Taiz & E Zeiger), Third edition. Sinauer Associates, Sunderland, pp 283–308.
- Takabayashi J, Sato Y, Horikoshi M, Yamaoka R, Yano S, Ohsaki N & Dicke M (1998). Plant effects on parasitoid foraging: differences between two tritrophic systems. *Biological Control* 11:97–103.
- Takasu K & Lewis WJ (2003). Learning of host searching cues by the larval parasitoid *Microplitis croceipes*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 108:77–86.
- Takemoto H, Powell W, Pickett J, Kainoh Y & Takabayashi J (2009). Learning is involved in the response of parasitic wasps *Aphidius ervi* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae) to volatiles from a broad bean plant, *Vicia faba* (Fabaceae), infested by aphids *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera: Aphidid. *Applied Entomology and Zoology* 44:23–28.
- Taylor KL (1967). The introduction, culture, liberation, and recovery of parasites of *Sirex noctilio* in Tasmania, 1962-67. Technical Paper No. 8, CSIRO Division of Entomology. Melbourne, Australia. 19 pp.
- Taylor KL (1976). The introduction and establishment of insect parasitoids to control *Sirex noctilio* in Australia. *Entomophaga* 21:429–440.
- Taylor KL (1978). Evaluation of the insect parasitoids of *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae) in Tasmania. *Oecologia* 10:1–10.
- Taylor KL (1981). The sirex woodwasp: Ecology and control of an introduced forest insect. In: *The ecology of pests - Some Australian case histories* (ed. by RL Kitching & RE Jones). CSIRO, Melbourne, Australia, pp 231–248.
- Thacker JRM & Train MR (2010). Use of volatiles in pest control. In: *The chemistry and biology of volatiles* (ed. by A Herrmann), First edition. John Wiley & Sons Ltd., Geneva, Switzerland, pp 151–172.
- Thakeow P, Weißbecker B & Schütz S (2006). Volatile organic compounds emitted from fungal-rotting beech (*Fagus sylvatica*). *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie* 15:157–160.

- Thibout E, Guillot F & Auger J (1993). Microorganisms are involved in the production of volatile kairomones affecting the host seeking behaviour of *Diadromus pulchellus*, a parasitoid of *Acrolepiopsis assectella*. *Physiological Entomology* 18:176–182.
- Thompson BM, Bodart J, McEwen C & Gruner DS (2014). Adaptations for symbiont-mediated external digestion in *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae). *Annals of the Entomological Society of America* 107:453–460.
- Thomsen IM & Harding S (2011). Fungal symbionts of siricid woodwasps: isolation techniques and identification. *Forest Pathology* 41:325–333.
- Thoss V, O'Reilly-Wapstra J & Iason GR (2007). Assessment and implications of intraspecific and phenological variability in monoterpenes of Scots pine (*Pinus sylvestris*) foliage. *Journal of Chemical Ecology* 33:477–491.
- Tkaczuk CE, Shah PAA, Clark SUJ & Pell JUK (2007). Influence of host plant on susceptibility of the aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) to the fungal pathogen *Pandora neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales). *European Journal of Entomology* 104:205–210.
- Tobin PC, Bai BB, Eggen DA & Leonard DS (2012). The ecology, geopolitics, and economics of managing *Lymantria dispar* in the United States. *International Journal of Pest Management* 58:195–210.
- Tribe GD & Cillié JJ (2004). The spread of *Sirex noctilio* Fabricius (Hymenoptera: Siricidae) in South African pine plantations and the introduction and establishment of its biological control agents. *African Entomology* 12:9–17.
- Turlings TCJ, Loughrin JH, McCall PJ, Röse USR, Lewis WJ & Tumlinson JH (1995). How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:4169–4174.
- Ueno T (1997). Effects of superparasitism, larval competition, and host feeding on offspring fitness in the parasitoid *Pimpla nipponica* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Annals of the Entomological Society of America* 90:682–688.
- Ueno T (2002). Biology of the ectoparasitoid wasp *Agrothereutes lanceolatus* (Hymenoptera: Ichneumonidae): Host acceptance and larval development on a laboratory host. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University* 47:37–43.
- Urzúa A, Santander R, Echeverría J & Rezende MC (2007). Secondary metabolites in the flower heads of *Haplopappus berterii* (Asteraceae) and its relation with insect-attracting mechanisms. *Journal of the Chilean Chemical Society* 52:1142–1144.
- Van Driesche RG, Hoddle MS & Center TD (2007). Control de plagas y malezas por enemigos

- naturales. Traducción al español por Enrique Ruiz Cancino y Juanita Coronada Blanca. USDA FHTET, Washington, USA, 751.
- Vet LEM (1985). Olfactory microhabitat location in some eucoilid and alysiine species (Hymenoptera), larval parasitoids of diptera. *Netherlands Journal of Zoology* 35:720–730.
- Vet LEM & Dicke M (1992). Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology* 37:141–172.
- Vet LEM, van Lenteren JC, Heymans M & Meelis E (1983). An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects. *Physiological Entomology* 8:97–106.
- Vet LEM, Lewis WJ, Papaj DR & Van Lenteren JC (1990). A variable response model for parasitoid foraging behaviour. *Journal of Insect Behavior* 3:471–491.
- Villacide JM & Corley JC (2012). Ecology of the woodwasp *Sirex noctilio*: Tackling the challenge of successful pest management. *International Journal of Pest Management* 58:249–256.
- Villalba N & Eskiviski E (2014). Detección y seguimiento poblacional de la chincha del eucalipto *Thaumastocoris peregrinus* (Carpintero y Dellape) en las provincias de Corrientes y Misiones. II Jornadas Argentinas de Sanidad Forestal. Montecarlo, Misiones, Argentina.
- Vinson SB (1981). Habitat location. In: *Semiochemicals: Their role in pest control* (ed. by EDA Nordlund, RL Jones & WJ Lewis). Wiley, New York., pp 51–77.
- Vinson SB (1984). How parasitoids locate their hosts: A case of insect espionage. In: *Insect Communication* (ed. by T Lewis). Academic Press, London, pp 325–348.
- Wäckers FL (1994). The effect of food deprivation on the innate visual and olfactory preferences in the parasitoid *Cotesia rubecula*. *Journal of Insect Physiology* 40:641–649.
- Wagner D, Tissot M, Cuevas W & Gordon DM (2000). Harvester ants utilize cuticular hydrocarbons in nestmate recognition. *Journal of Chemical Ecology* 26:2245–2257.
- Wercinski SA (1999). *Solid Phase Microextraction: a practical guide* (Ed. by SAS Wercinski). CRC Press, p 257.
- Wermelinger B & Thomsen IM (2012). The woodwasp *Sirex noctilio* and its associated fungus *Amylostereum areolatum* in Europe. In: *The sirex woodwasp and its fungal symbiont* (ed. by B Slippers, P de Groot & MJ Wingfield), First edition. Springer, London, pp 65–80.
- Whitfield JB (1998). Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in hymenoptera. *Annual Review of Entomology* 43:129–152.

- Witzgall P, Kirsch P & Cork A (2010). Sex pheromones and their impact on pest management. *Journal of Chemical Ecology* 36:80–100.
- Witzgall P, Stelinski L, Gut L & Thomson D (2008). Codling moth management and chemical ecology. *Annual Review of Entomology* 53:503–522.
- Wooding AL, Wingfield MJ, Hurley BP, Garnas JR, Groot P De & Slippers B (2013). Lack of fidelity revealed in an insect-fungal mutualism after invasion. *Biology Letters* 9:20130342.
- Zado FM & Fabecic J (1970). The physio-chemical fundamentals of gas chromatographic retention on porous polymer columns: Porapak Q and T. *Journal of Chromatography* 51:37–44.
- Zondag R (1959). Progress report on the establishment in New Zealand of *Ibalia leucospoides*, a parasite of *Sirex noctilio*. *New Zealand Forestry Research Notes* Nro 20, 10 pp.
- Zondag R (1969). A nematode infection of *Sirex noctilio* (F.) in New Zealand. *New Zealand Journal of Science* 12:732–747.
- Zondag R (1979). Control of *Sirex noctilio* (F.) with *Deladenus siricidicola* Bedding. Part II. Introductions and establishments in the South Island 1968–75. *New Zealand Journal of Forestry Science* 9:68–76.