

Tesis Doctoral

Estudios biológicos sobre los parasitoides, Mastrus ridens Horstman y Ascogaster quadridentata Wesmael, para evaluar su potencial como agentes de control biológico de *Cydia pomonella* (L.) plaga clave del manzano

Hernández, Carmen Marcela

2015-05-29

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Hernández, Carmen Marcela. (2015-05-29). Estudios biológicos sobre los parasitoides, *Mastrus ridens* Horstman y *Ascogaster quadridentata* Wesmael, para evaluar su potencial como agentes de control biológico de *Cydia pomonella* (L.) plaga clave del manzano. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Hernández, Carmen Marcela. "Estudios biológicos sobre los parasitoides, *Mastrus ridens* Horstman y *Ascogaster quadridentata* Wesmael, para evaluar su potencial como agentes de control biológico de *Cydia pomonella* (L.) plaga clave del manzano". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-05-29.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudios biológicos sobre los parasitoides, *Mastrus ridens* Horstman y *Ascogaster quadridentata* Wesmael, para evaluar su potencial como agentes de Control Biológico de *Cydia pomonella* (L.) plaga clave del manzano

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

Carmen Marcela Hernández

Director de Tesis: Dr. Eduardo N. Botto
Consejera de Estudios: Dra. Maria Busch

Lugar de trabajo: Laboratorio de Lucha Biológica- Instituto de Microbiología y Zootología Agrícola (IMyZA) INTA Castelar, Prov. de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2015

Fecha de defensa: 29/05/15

Estudios biológicos sobre los parasitoides, *Mastrus ridens* Horstman y *Ascogaster quadridentata* Wesmael para evaluar su potencial como agentes de Control Biológico de *Cydia pomonella* L. plaga clave del manzano

Resumen

La carpocapsa (*Cydia pomonella*) es una de las plagas clave del cultivo de pomáceas en todo el mundo. En la Argentina, si bien actualmente se están implementando medidas de control de bajo impacto ambiental, como la técnica de confusión sexual, la principal forma de control continúa siendo el empleo de productos químicos. El objetivo general de esta tesis fue estudiar aspectos básicos de la biología de *Mastrus ridens* y *Ascogaster quadridentata* a los efectos de evaluar su potencial como agentes de control de *Cydia pomonella* en nuestro país.

Los principales aportes de este trabajo son:

- Disponibilidad de un sistema de cría a nivel experimental para *M. ridens* y *A. quadridentata* en condiciones de laboratorio.
- Conocimiento de los principales atributos biológicos y poblacionales de *A. quadridentata* sobre *C. pomonella*.
- Estudio de la fecundidad y preferencia de *M. ridens* sobre dos especies de lepidópteros plaga presentes en nuestro país (*C. pomonella*- *Grapholita molesta*).
- Determinación de la selectividad de los principales insecticidas utilizados en la producción de pomáceas para *M. ridens*.
- Colonización y evaluación del establecimiento de *M. ridens* y *A. quadridentata* en el Alto Valle de Rio Negro.

Los estudios realizados proporcionaron información y herramientas para impulsar el empleo de estos parasitoides a través del desarrollo de una estrategia de control biológico clásico de *C. pomonella*.

Palabras clave: frutales pepita, carpocapsa, control biológico clásico, entomófagos.

Evaluation of *Mastrus ridens* Horstman (Hymenoptera: Incheumonidae) and *Ascogaster quadridentata* Wesmael (Hymenoptera: Braconidae) as biological control agents of *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae)

Abstract

The codling moth is a key pest of apple crops. In Argentina, pest management strategies mainly rely on chemical control, although recently the technique of sexual confusion has been implemented with success. The aim of this thesis was to study the potential of the parasitoids, *Mastrus ridens* and *Ascogaster quadridentata* as biological control agents of *Cydia pomonella* in our country.

The most important contributions from this thesis are:

- Better understanding of rearing methodologies for *M. ridens* y *A. quadridentata* in the laboratory.
- Knowledge of the reproductive biology and population parameters of *A. quadridentata* in *C. pomonella*.
- Knowledge of the biology and host preference by *M. ridens* for *C. pomonella* and *G. molesta*.
- Determination of the side effect of some pesticides use in apple crops on *M. ridens*.
- Colonization and evaluation of establishment of *M. ridens* y *A. quadridentata* in the field.

These results provided useful information to enhance the use of the parasitoids in classical biological control strategies against *C. pomonella* in Argentina.

Key words: apple crops, codling moth, classical biological control, entomophagous.

Agradecimientos

Fueron muchos los años que dediqué a la realización de esta tesis y han sido muchísimas las personas que han colaborado de una u otra manera. Seguramente pecaré de olvido involuntario, espero que los afectados sepan disculpar.

En primer lugar, quiero agradecerle a mi director, Eduardo Botto, por abrirme las puertas del laboratorio y darme una oportunidad fundamental para desarrollar esta investigación. Su disponibilidad, sus consejos, y su lectura contante de mis avances han sido de valiosísima ayuda.

A los jurados por mejorar mi trabajo con sus valiosas sugerencias.

A mis compañeros del laboratorio del IILB presentes y pasados: Andrea Andorno, Silvia López, Mariana Viscarret, Cynthia Cagnotti, Diana Arias, Ana Cherino, Eliana Cuello, Sandra Sánchez, María Riquelme y César Lafalce, por su ayuda en las distintas tareas del laboratorio y por hacer mis días de trabajo más amenos. En particular a Andrea, Silvia y Mariana por las numerosas lecturas de mi trabajo y por sus sugerencias para mejorarlo; y a Andrea por apoyarme y ayudarme en la realización de los ensayos incluso los fines de semana.

A los integrantes del área de entomología de la EEA INTA Alto Valle y en particular a Silvina Garrido por ayudarme en las tareas de campo.

A Estela Favret y Lorena La Fuente por su predisposición para conseguirme muchas de “las figuritas difíciles”, los trabajos científicos, que necesité para elaborar esta tesis.

A mis amigas: Tania, Fernanda y Micaela por acompañarme en el camino, y en especial a Mica por no dejar que abandone y por ayudarme en todo.

A mi cuñada, Lucía por asistirme en las tareas de escritura.

A mis hermanos, Zelmira “Tati” y Camilo por estar a mi lado siempre.

A mi mamá, mi tía Conga, y mi papá por apoyarme incondicionalmente en este largo camino y en la vida...

A mis hijos, Felipe y Manuel, por alegrarme todos los días de mi vida.

A mi compañero, Fernando, por tenerme paciencia infinita, acompañarme y apoyarme en todo.

¡Gracias infinitas!

A las tres estrellas que iluminan mi vida:

A Manu que con sus travesuras me hace reír aun cuando estoy enojada.

A Feli que con su dulzura me hace emocionar y con sus preguntas pensar.

A Fer por bancarme siempre en los momentos difíciles y por ser mi compañero de ruta.

ÍNDICE

Resumen	2
Abstract	3
Agradecimientos	4
Introducción general	8
1. Aspectos generales.....	9
2. La plaga, <i>Cydia pomonella</i>	15
3. Los enemigos naturales.....	23
<i>Mastrus ridens</i>	23
<i>Ascogaster quadridentata</i>	27
Objetivos	33
Capítulo 1: Introducción y multiplicación de los enemigos naturales	34
Introducción.....	35
1. a) Cría del huésped, <i>Cydia pomonella</i> , y estimación de parámetros asociados a la calidad de la cría.....	37
1. b) Introducción y cría del ectoparásitoide: <i>Mastrus ridens</i>	51
1. c) Introducción y cría del endoparásitoide: <i>Ascogaster quadridentata</i>	55
Conclusiones del capítulo 1.....	59
Capítulo 2: Estudios biológicos sobre el parasitoide <i>Ascogaster quadridentata</i>	60
Introducción.....	61
2. a) Parasitismo en los primeros días de vida.....	62
2. b) Tiempo de desarrollo de los estados inmaduros.....	65
2. c) Longevidad, supervivencia y fecundidad del adulto.....	69
2. d) Parámetros poblacionales.....	78
Conclusiones del capítulo 2.....	83
Capítulo 3: Estudios biológicos sobre el parasitoide <i>Mastrus ridens</i>	84
3. a) Desempeño de <i>Mastrus ridens</i> en dos tipos de larvas de <i>Cydia pomonella</i> : larvas diapausantes de campo y no diapausantes de laboratorio y preferencia por ambos huéspedes.....	85
3. b) Desempeño de <i>Mastrus ridens</i> en dos especies de lepidópteros plaga: <i>Cydia pomonella</i> y <i>Grapholita molesta</i> y preferencia por estas especies de huéspedes..	93

Conclusiones del capítulo 3.....	99
Capítulo 4: Compatibilidad de uso de <i>Mastrus ridens</i> y la aplicación de insecticidas utilizados en la producción de pomáceas.....	100
Introducción.....	101
4. a) Toxicidad directa sobre el adulto.....	104
4. b) Persistencia de la acción de los productos.....	113
Conclusiones del capítulo 4.....	123
Capítulo 5: Colonización y establecimiento de los enemigos naturales en el campo.....	124
Introducción.....	125
5. a) Evaluación de la reproducción de <i>Mastrus ridens</i> y <i>Ascogaster quadridentata</i> en condiciones de semi-campo a través de liberaciones confinadas en parcelas de manzanos.....	127
5. b) Evaluación de la colonización y el establecimiento de <i>Mastrus ridens</i> y <i>Ascogaster quadridentata</i> en montes de pomáceas de la región del Alto Valle de Río Negro.....	135
Conclusiones del capítulo 5.....	158
Conclusiones finales.....	159
Bibliografía.....	161

INTRODUCCIÓN GENERAL



1. ASPECTOS GENERALES

El sector fruti-hortícola ocupa un lugar destacado en los complejos exportadores de la Argentina, y se posiciona en el sexto lugar. Nuestro país exporta quince especies frutales diferentes. Individualmente las exportaciones de frutas alcanzaron en 2008 un valor cercano a los U\$S 1.570 millones. Los cítricos y pomáceas abarcan conjuntamente más del 90% de ese valor, siendo exportados a la Unión Europea (U\$S 840 millones), el MERCOSUR (U\$S 650 millones) y el NAFTA (U\$S 305 millones). En la Argentina los valles irrigados de Río Negro y Neuquén son la principal región productora de pomáceas para exportación, entre las que se incluyen las manzanas y peras. La actividad productiva se concentra en cuatro zonas: el Alto Valle, el Valle medio, General Conesa y Río Colorado. En la región del Alto Valle la superficie destinada al cultivo de manzanos, *Malus domestica* Borkh, y perales, *Pyrus communis* L., es de 26 000 y 17 300 ha, respectivamente. Se estima que el total de mano de obra directa e indirecta relacionada con la actividad frutícola involucra a unas 90 000 personas (Villareal *et al.*, 2010). Las especies cultivadas de pomáceas son atacadas por distintos complejos de plagas¹ cuya composición varía de acuerdo a la ubicación geográfica y a las prácticas agrícolas usadas (Thacker, 2002). Las plagas más conocidas incluyen varias especies de lepidópteros, como *Cydia pomonella* (L.); homópteros, como *Pseudococcus affinis* (Maskel); coleópteros, como *Naupactus xanthographus* Germ. y ácaros, como *Panonychus ulmi* (Koch) (Giganti *et al.*, 2007).

Cydia pomonella (Lepidoptera: Tortricidae), conocida comúnmente como “carpocapsa”, es una de las principales plagas que afecta los cultivos de manzanas y peras en todo el mundo (Bloem *et al.*, 1998). Esta especie es originaria de Asia Central así como también lo es el manzano, su hospedero principal (Lloyd, 1960). En la Argentina la presencia de *C. pomonella* se ha registrado a partir de la década del cincuenta. Posteriormente, en 1964 se la ha declarado plaga nacional de la agricultura (por disposición N° 116/64 de la Dirección de Lucha Contra las Plagas de la Secretaría de Agricultura y Ganadería). Esta plaga ocasiona pérdidas en la producción superiores a los 30 millones de dólares al año, los frutos atacados pierden su valor comercial y no son aptos para su conservación en frío (figura 1). Además, su presencia afecta la

¹ Definición de plagas de las plantas: cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales (FAO, 1995)

comercialización de la fruta fresca en los mercados externos por razones cuarentenarias (SINAVIMO, 2010).

En la región del Alto Valle de Río Negro las manzanas son susceptibles al ataque de *C. pomonella* durante todo el período de crecimiento y maduración, siendo el daño causado mayor al 80-90% en ausencia de la aplicación de medidas de control contra esta plaga. A diferencia de las peras, las cuales presentan un período de baja susceptibilidad asociado a la composición de las células de la epidermis de los frutos. En los perales los daños cuando no se aplican medidas correctivas pueden alcanzar valores entre el 40 y el 60% (Cichón y Fernández, 2003).

Los métodos de control de *C. pomonella* se han basado tradicionalmente en la utilización de insecticidas de amplio espectro, como el organofosforado azifos-metil. El uso generalizado de este tipo de plaguicidas ha generado una serie de problemas como la selección de individuos plaga resistentes y el resurgimiento de plagas secundarias (Lacey y Unruh, 2005). También es importante considerar los distintos efectos adversos que provocan sobre el medio ambiente (Loewy *et al.*, 1999) y la salud humana. La necesidad de reducir el número de aplicaciones de agroquímicos ha favorecido el desarrollo y la implementación de métodos de control alternativos.

A fines de la década del sesenta surgió un nuevo enfoque en la protección vegetal, el Manejo Integrado de Plagas (MIP). De acuerdo al concepto propuesto por Thacker (2002) la esencia del MIP se basa en la integración de distintos métodos de control. Dicha integración debe comprender una disminución de la plaga por debajo del nivel en que causa perjuicio económico, un mínimo impacto adverso de los productos químicos utilizados en el ambiente (incluyendo el impacto en especies no blanco) y un sistema de producción sustentable a largo plazo. Las principales tácticas en las que se ha basado el MIP son: a) el control químico, mediante el uso racional de insecticidas selectivos, es decir insecticidas que controlan a la plaga pero no son tóxicos para la fauna benéfica, b) el control cultural, c) el control autocida, y d) el control biológico, siendo este último el que ha ido adquiriendo importancia en las recientes décadas (Van Driesche y Bellows, 1996; Walter, 2003; Guillebeau, 2004).

El manejo integrado en manzanos incluye el uso de reguladores de crecimiento, feromonas, bacterias (*Bacillus thuringiensis*) y virus para el control de lepidópteros plaga (Thacker, 2002). El control biológico en este cultivo tiene un rol importante en los programas de MIP (Gut, 1993). Los agentes de biocontrol de *C. pomonella* conjuntamente con otros componentes del MIP pueden proveer un control efectivo de

este insecto y otras plagas del cultivo (Lacey y Unruh, 2005). En Europa el manejo del ambiente para favorecer la actividad de los enemigos naturales presentes en el cultivo ha sido una parte importante en el establecimiento de estrategias MIP en manzanos, conjuntamente con una reducción en la aplicación de insecticidas de amplio espectro mediante el uso de insecticidas selectivos y el desarrollo de prácticas de control culturales (Blommers, 1994).



Figura 1. Daño en frutos producido por la larva de *C. pomonella*. A. vista externa de una manzana con un orificio por donde penetró la larva, B. corte transversal de una manzana con el túnel producido por la larva, C. vista interna del fruto de nogal con una larva. Tomadas de la página web de la Universidad de California: www.ipm.ucdavis.edu

Control biológico

El control biológico forma parte del fenómeno del control natural. Este último puede definirse como la regulación de las poblaciones de insectos plaga, producida por determinados factores bióticos y abióticos, entre límites más o menos uniformes, elevados o bajos y durante un cierto período de tiempo. Los factores más importantes en el control natural son: los enemigos naturales (parasitoides, predadores y patógenos), el clima y los factores físicos, la alimentación (calidad y cantidad), la competencia intraespecífica, y las necesidades espaciales y territoriales. El control biológico puede definirse como la regulación de la densidad de la población de un organismo por medio de los enemigos naturales a un nivel más bajo del que de otra forma alcanzaría (De Bach, 1977). Otras definiciones incorporan el concepto económico, y de acuerdo a la definición de Van Driesche y Bellows (1996) el control biológico constituye una

estrategia en donde se utiliza a los enemigos naturales de las plagas con el propósito de reducir la abundancia de sus poblaciones por debajo del nivel en que causan perjuicios económicos. Se describen 3 tipos de control biológico:

- 1- Clásico: consiste en la importación y colonización de enemigos naturales exóticos contra plagas también exóticas, aunque en algunos casos se lo emplea contra plagas nativas, creando una nueva asociación entre los enemigos naturales introducidos y la plaga.
- 2- Aumentativo: se refiere a la cría y liberación periódica de enemigos naturales, en grandes cantidades (inundativo) o de unos pocos individuos que sobrevivirán por varias generaciones (inoculativo).
- 3- Conservación: se basa en el aumento de las poblaciones de enemigos naturales presentes en el agroecosistema por manipulación de su ambiente, tornándolo más favorable para ellos. El objetivo de este tipo de control biológico es disminuir al máximo los riesgos de provocar efectos adversos sobre los enemigos naturales, e incluye el uso de hospederas alternativas, el uso selectivo de agroquímicos, etc. (Van Driesche y Bellows, 1996).

El control biológico clásico (CBC) implica que los enemigos naturales exóticos liberados en el nuevo ambiente se establezcan y regulen a la población de la plaga a largo plazo sin la necesidad de posteriores intervenciones (Hajek, 2004). Este tipo de control posee una ventaja sobre las demás formas de control biológico, la de automantenerse en el tiempo por lo cual resulta menos costoso a largo plazo (Van Driesche y Bellows, 1996). Se plantean una serie de etapas operativas que deben llevarse a cabo para implementar un programa de CBC:

1. selección de la especie plaga,
2. búsqueda y selección de los potenciales agentes de control biológico,
3. colección e investigación de los enemigos naturales en el lugar de origen de la plaga,
4. importación y cuarentena de los enemigos naturales,
5. cría y experimentación de los enemigos naturales en el laboratorio,
6. liberación y evaluación del establecimiento de los enemigos naturales en el campo,
7. evaluación de la eficiencia alcanzada en el control de la plaga (Van Driesche y Bellows 1996)

La selección de los agentes de control biológico es un punto sumamente importante. Hay una serie de características biológicas y ecológicas deseables en los enemigos naturales: especificidad de huésped; sincronización estacional con la población plaga; alta capacidad de búsqueda y dispersión; alta tasa de crecimiento, habilidad para sobrevivir períodos de escasez o ausencia del huésped, adaptabilidad a una amplia variedad de condiciones ambientales, y facilidad de manejo y cría (Sweetman, 1936; Messenger *et al.*, 1976; Van Driesche y Bellows, 1996; Botto, 2002; Hajek, 2004).

Respecto de la liberación en el campo de los agentes de biocontrol, un aspecto controvertido es si debe liberarse una única especie o un grupo de enemigos naturales. Hoy en día, una práctica normalmente usada es la introducción de varias especies de enemigos naturales para el control de una plaga (Hajek, 2004). El conocimiento teórico y la experiencia práctica proveen poca evidencia acerca de si un orden, en particular en la secuencia en la que se realizan las introducciones de los enemigos naturales puede llevar a un menor o mayor grado de control (Van Driesche y Bellows, 1996). Además, el enemigo natural más eficiente puede diferir entre los diversos hábitats de una región, por lo cual generalmente no existe una sola especie capaz de controlar a la plaga en toda su distribución (De Bach, 1977). En el caso de especies de parasitoides que utilicen el recurso de forma diferente, es decir que no compitan como homólogos ecológicos, por ejemplo un parasitoide de huevos y otro de larvas, se espera que su introducción conjunta incremente la acción de cada uno por separado (Speight *et al.*, 1999).

Control biológico de *Cydia pomonella*

Hay varios aspectos que sitúan a *C. pomonella* como un huésped potencial para la implementación de programas de CBC en montes productivos de pomáceas en Argentina. Por un lado, en el lugar de origen de esta especie, en Asia central, su densidad poblacional es baja, y se trata de una especie esporádica y poco abundante en los montes de manzanos silvestres y comerciales (Mills, 2005b). Asimismo, si bien *C. pomonella* actualmente está presente en todas las áreas donde se producen manzanos en el mundo, a excepción de Japón y el este de China, al tratarse de una especie invasora está desprovista de sus enemigos naturales, especialistas en la mayor parte de su rango de distribución expandido (Kuhlmann y Mills, 1999). Por otro lado, el cultivo de pomáceas es un sistema estable con pocos disturbios en comparación con un cultivo

anual, lo que posibilita el desarrollo de poblaciones de parasitoides que persistan en el tiempo (Thacker, 2002). Además, es pertinente tener en cuenta la importancia económica que tiene la producción de pomáceas en la región y el beneficio potencial sobre el medio ambiente que se obtendría al reducir la aplicación de insecticidas para el control de esta plaga.

En nuestro país los entomófagos citados para *C. pomonella* se limitan a una mención aislada de especies generalistas u oportunistas (no específicos), entre los parasitoides se encuentran: *Coccigomymus fuscipes* (Brètes) (Hymenoptera: Ichneumonidae) y *Basileucus tetraleucus* De Santis (Hymenoptera: Ichneumonidae); y entre los predadores, *Crysoperna externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) (Botto, 2003). También se menciona a *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethyilidae) como parasitoide gregario generalista endémico de Uruguay y centro de la Argentina (Laumann, 2000). Esta especie está naturalmente establecida como parasitoide de *C. pomonella* en algunas áreas productoras de nogales de la provincia de Catamarca y también fue hallada en la región del Alto Valle de Río Negro parasitando larvas de *C. pomonella* en montes comerciales (Laumann, 2000; Garrido *et al.*, 2005). Además, se cita la presencia de *Dibrachys boarmiae* De Santis (Hymenoptera: Pteromalidae), parasitoide polífago de larvas de *C. pomonella* en Mendoza (Espul y Troilo, 1986).

La región más promisoría para buscar enemigos naturales especialistas de *C. pomonella* en manzanos silvestres y domésticos es el centro evolutivo donde se originaron los manzanos, en Asia central. Estudios realizados en la región, específicamente en el área de Alma Ata, en Kazakstán, mencionan un rico complejo de parasitoides de esta plaga, que incluye a diversas especies que atacan distintos estados de desarrollo de su ciclo de vida. El complejo de parasitoides incluye a los braconidos, *Ascogaster quadridentata* Wesmael (parasitoide ovo-larval) y *Bassus rufipes* Nees (parasitoide de larvas del 1^{er} y 2^{do} estadio), y los icteumónidos *Lyotryphon caudatus* (Ratzeburg), *Mastrus ridens* (Gravenhorst) (ambos parasitoides del último estadio larval) y *Pristomerus vulneartor* (Panzer) (parasitoide de larvas del 1^{er} y 2^{do} estadio) (Kuhlman y Mills, 1999).

Mastrus ridens y *A. quadridentata* son agentes de control que presentan un excelente potencial para ser utilizados en estrategias de CBC de *C. pomonella* (Kuhlman y Mills, 1999; Lacey y Unruh, 2005; Mill, 2005a y b). Al comparar el complejo de parasitoides de esta plaga en Asia Central (Kazakstán y Xinjiang) y en Europa (Suiza y Austria) se observó que en Europa los máximos niveles de parasitismo

registrados fueron de *A. quadridentata* (42,6%), mientras que en Asia Central fueron de *M. ridens* (43,9%) y *B. rufipes* (33,3) (Mills, 2005b). Asimismo, al evaluar el impacto potencial de diferentes parasitoides a través de modelos de crecimiento se observó que los mayores cambios en los niveles poblacionales de *C. pomonella* se obtenían al incorporar en el sistema parasitoides de larvas desarrolladas y de prepupa, como *M. ridens*, y, en menor medida, al agregar parasitoides de los huevos, como *A. quadridentata* (Mills, 2005b).

En la Argentina no existen antecedentes del empleo del control biológico de *C. pomonella* mediante la utilización de parasitoides exóticos como *M. ridens* y *A. quadridentata*. Existe un solo registro de una introducción accidental de *A. quadridentata* en 1936 en un envío de larvas de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) parasitadas. El material recibido contenía varias especies de himenópteros parasitoides de la familia de los braconidos, de las cuales solo *Macrocentrus ancylivorus* Rohw y *M. delicatus* Cresson se criaron y liberaron en el campo para el control de *G. molesta* (Crouzel, 1963).

2. LA PLAGA, *Cydia pomonella*

Posición sistemática

Este insecto fue descrito por Linnaeus en 1758. Desde su descripción original con el nombre de *Phalaena Tinea pomonella* de Linnaeus en 1758, pasando por *Laspeyresia pomonana* Hubner en 1825, *Carpocapsa pomonana* Treitschke en 1830 y *Carpocapsa pomonella* Harris en 1862, hasta la actualidad que la conocemos con el nombre de *Cydia pomonella* impuesto por Walsingham en 1897 (Brown 1979).

1. Orden: Lepidoptera
2. Familia: Tortricidae
3. Subfamilia: Olethreutinae
4. Tribu: Laspeyresiini
5. Género: *Cydia*
6. Especie: *Cydia pomonella* (L.)

Hospederos

Además de cumplir su ciclo biológico en el manzano, *Malus domestica* Borkh (Rosales: Rosaceae), puede desarrollarse en otras pomáceas como el peral, *Pyrus communis* L. (Rosales: Rosaceae); el membrillero, *Cydonia oblonga* Mill. (Rosales: Rosaceae) y el nogal, *Juglans regia* L. (Fagales: Juglandaceae). Si bien, según citas bibliográficas internacionales, esta plaga ataca también frutales de carozo, como el damasco, *Prunus armeniaca* Blanco (Rosales: Rosaceae), y en menor medida, el duraznero, *Prunus persica* (Rosales: Rosaceae), en la región del Alto Valle de Río Negro hasta el momento no se han registrado ataques en estos hospederos (Cichón y Fernández, 2003; Giganti *et al.*, 2007).

Características morfológicas

Los caracteres morfológicos de los estados de desarrollo de *C. pomonella* se recopilaron de los trabajos de Quintana *et al.* (1997) y Cichón y Fernández (2003).

Huevo (figura 2 A): es de forma oval, blanco-perlado, aplanado en los bordes y algo elevado en el centro. Tiene un tamaño aproximado de 1,2-1,3 mm de diámetro. Al momento de la oviposición, el interior del huevo es opaco. A los 3 ó 4 días, comienza la formación de distintas capas internas y del embrión y aparece una aureola roja que recorre toda la circunferencia del huevo. Por último, empiezan a ser visibles las partes esclerotizadas del embrión, especialmente la cabeza.

Larva (figura 2 B y C): la larva recién eclosionada es de color blanco cremoso con la cápsula cefálica negra y de 1,8-2 mm de largo. Durante el ciclo de desarrollo pasa por cinco estadios larvales, antes de transformarse en pupa. El largo total del cuerpo alcanzado por el quinto estadio larval es de 14 a 18 mm y tiene un color rosa pálido, con la cápsula cefálica negra o marrón.

Pupa (figura 2 D): es de color marrón con bordes y espinas negras. El tamaño de la pupa varía entre 8 y 11 mm. En este estado el sexo se diferencia por los últimos segmentos del abdomen: en la hembra se observan ventralmente dos depresiones genitales en los dos últimos segmentos, que no se observan en el macho (figura 3).

Adulto (figura 2 E): son típicas polillas de color gris, de 8 a 10,3 mm de largo. Las alas posteriores en reposo caen en forma de techo a dos aguas. Los ojos compuestos son grandes y esféricos, y las antenas, filiformes. El abdomen tiene diez segmentos y, entre el octavo y el noveno, la hembra posee una glándula para la liberación de feromonas. El extremo del abdomen de la hembra (figura 2 F) posee una papila anal, circular, de color marrón y un punto oscuro sobre ésta, que es el orificio de cópula. El macho (figura 2 G) presenta un extremo abdominal cerrado, con un par de valvas que utiliza para sujetar a la hembra durante la cópula.



Figura 2. Estados de desarrollo de *C. pomonella*. A. huevos depositados sobre hojas, B. larva inmadura alimentándose de las semillas, C. larvas del último estadio tejiendo su capullo en la corteza del árbol, D. pupa dentro del capullo, E. polilla adulta de color gris con alas en reposo, F. detalle del extremo del abdomen de la hembra adulta donde se observa la papila anal y el orificio de cópula, y G extremo del macho adulto con el detalle de las valvas que utiliza para sujetar a la hembra en la cópula. Tomadas de <http://www.ukmoths.org.uk> y <http://www.inta.gov.ar/altovalle>.

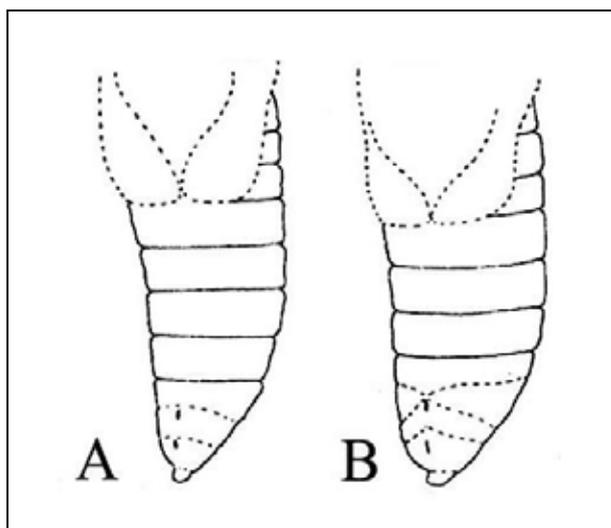


Figura 3. Esquema del abdomen de la pupa de *C. pomonella*. A. detalle del extremo abdominal del macho y B, detalle del extremo del abdomen de la hembra donde se observan las depresiones genitales en los últimos segmentos (Cichón y Fernández, 2003).

Monitoreo

El monitoreo constituye la principal herramienta para evaluar el nivel de infestación de la plaga en el campo, realizar el seguimiento de su dinámica poblacional y adoptar las medidas de control necesarias. Las acciones pueden incluir (Cucchi y Becerra, 2007):

- a) trampeo de adultos. Existen 2 tipos de trampas: 1- con feromonas para capturar machos y 2- combinadas de feromonas y kairomonas para capturar machos y hembras. Las feromonas son sustancias volátiles que intervienen en la comunicación entre individuos de la misma especie, en el caso de las feromonas sexuales éstas son producidas por las hembras para atraer a los machos y favorecer la cópula. Mientras que, las kairomonas, son compuestos volátiles que actúan en la comunicación entre especies (interespecíficos) y en las trampas se utilizan compuestos emitidos por las plantas, los cuales orientan a las hembras de carpocapsa en la búsqueda de sitios para la oviposición. Ambos tipos de trampa se basan en una cierta cantidad de los compuestos volátiles colocada en cápsulas de caucho o plástico de liberación lenta, ubicadas en trampas adhesivas,
- b) identificación de posturas. Se realiza un recuento de los huevos a través de la visión directa,

- c) captura de larvas del quinto estadio. Se colocan fajas de cartón corrugado en el tronco o ramas principales de los árboles y se contabiliza el número de larvas capturadas por árbol. En la fajas se intercepta el último estadio larval, que sale del fruto en busca de lugares protegidos para pupar en la corteza de los árboles o la hojarasca. También se realizan muestreos de frutos, y se registra el porcentaje de frutos dañados. Hay 3 momentos importantes para realizar los muestreos: al final de la primera generación (diciembre), en la segunda generación (enero) y en el momento de la cosecha.

Ciclo de vida y comportamiento

Por ser un microlepidóptero de hábitos crepusculares la carpocapsa presenta una actividad diaria limitada a unas pocas horas durante la tarde e inicio de la noche y en la madrugada. Los machos vuelan con temperaturas mayores a 13°C y las hembras con temperaturas superiores a 15°C, pero la cópula recién se produce con temperaturas crepusculares superiores a 17°C (Borden, 1931). Las hembras pueden oviponer ante la ausencia de machos pero todos estos huevos serán infértiles y no habrá desarrollo embrionario (Chichón y Fernández, 2003).

Los huevos son depositados por la hembra sobre hojas y frutos (figura 3A). La larva busca los frutos, perfora la epidermis, penetra en el fruto y construye una cámara en espiral donde muda del primero al segundo estadio. A continuación, desarrolla una galería en la pulpa que generalmente se dirige en forma recta hacia las semillas, en el corazón del fruto (figura 1B). Una vez completado el desarrollo larval, la larva madura abandona el fruto por el mismo orificio de entrada o por otro construido *ad hoc*, se descuelga con un hilo de seda hasta encontrar un refugio debajo de la corteza del tronco o en el suelo, donde teje un capullo de seda (figura 3C). Posteriormente, la larva se transforma en pupa (figura 3D) y finalmente emergen los adultos (figura 3E) (Chichón y Fernández, 2003; Giganti *et al.*, 2007).

El número de generaciones anuales de *C. pomonella* varía dependiendo del clima, el año y la planta hospedera donde se desarrolle (Audemard, 1991). En la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén se observan 3 generaciones completas por año, y en algunas temporadas hasta una cuarta generación (Chichón y Fernández, 1993). El desarrollo estacional de esta plaga está influenciado mayormente por la temperatura

ambiente. Las temperaturas a las que los insectos están sometidos en su medio y el tiempo de exposición constituyen una combinación tiempo-temperatura, conocida como “tiempo fisiológico”, que se mide en unidades denominadas grados-día (°D), para *C. pomonella* estas unidades se denominan carpogrados. La unidad de grados-día se define como el lapso dentro de las 24 horas en que el promedio de temperatura se mantiene por lo menos 1 °C por encima del umbral mínimo de desarrollo del insecto, siendo entonces que cada grado centígrado adicional al cero biológico significará un aumento de un grado-día. Para *C. pomonella* el umbral térmico mínimo es de 10 °C y marca la temperatura mínima para el desarrollo del insecto. Cuando la temperatura media diaria supera este valor, el excedente de 10 °C se computa como grados día (°D). Cada etapa de desarrollo o unidad fisiológica implica la suma de determinada cantidad de grados día (tabla 1).

Tabla 1. Grados día que insume cada etapa de desarrollo de *C. pomonella*

Etapa de desarrollo	Requerimientos térmicos (°D promedio)
Periodo embrionario	72
Desarrollo de la larva	356
Desarrollo de la pupa	116
Desarrollo de una generación	544

Su ciclo de vida está perfectamente sincronizado con la fenología de su hospedero principal, el manzano. Esta especie pasa el invierno como larva en diapausa en su capullo. A fines de agosto o principios de septiembre, con los primeros calores, las larvas invernantes reanudan su desarrollo a pupa y posteriormente a adulto. Las primeras polillas vuelan en coincidencia con la floración del manzano, cuando se suman unos 70°D. La totalidad de las larvas invernantes no desarrollana a pupa en ese momento sino que este fenómeno se prolonga hasta diciembre. Esto determina que haya una superposición de generaciones. Las larvas neonatas eclosionan, dependiendo de la temperatura, entre 6 y 14 días luego de haber sido depositados. El nacimiento de las larvas de la primera generación, y con ellas la aparición de los primeros daños, ocurre a los 250 °D, aproximadamente a mediados de octubre. El desarrollo de la larva dura entre 20 y 25 días. El estado de pupa requiere entre 10 y 20 días, según el momento de la temporada (figura 4). El desarrollo de una generación completa se cumple

aproximadamente en 48-56 días. No todas las larvas de una generación evolucionan a pupas. Para el Alto Valle de Río Negro y Neuquén se determinó que el 20% de la primera generación, el 70 % de la segunda y el 100% de la tercera quedan como larvas invernantes (Giganti *et al.*, 2007).

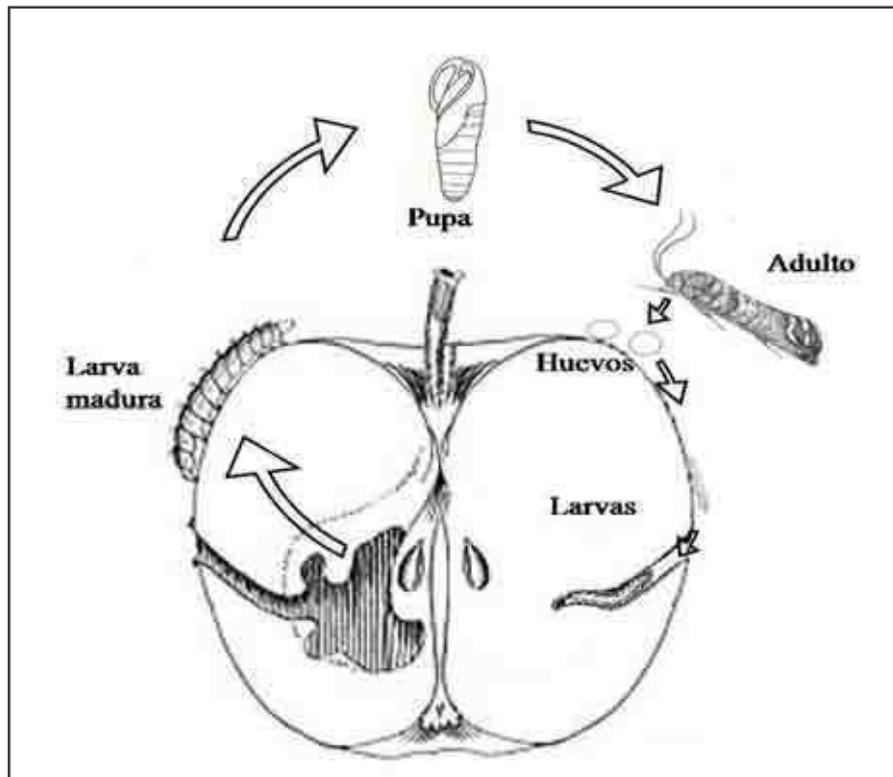


Figura 4. Esquema del ciclo de vida de *C. pomonella* en manzana con el detalle de los estados de desarrollo. Los huevos son depositados por las hembras, la larva perfora y penetra el fruto, completando los 5 estadios larvales en su interior. Luego, la larva madura sale del fruto y teje un capullo transformándose en pupa y posteriormente emerge la polilla adulta.

3. LOS ENEMIGOS NATURALES

Mastrus ridens

El género *Mastrus* Förster es de distribución Holártica con un gran número de especies (Towns, 1969). *M. ridens* es una especie exclusiva de la región Paleártica (Yu y Horstmann, 1997). Su rango de huéspedes incluye a *Cydia pomonella* y otras especies del mismo género (Kulmann y Mills, 1999). En pruebas de laboratorio para evaluar el rango de posibles hospedadores de *M. ridens* en América del Norte se determinó que esta especie puede parasitar a *C. pomonella* y *Grapholita prunivora* (Walsh) (Lepidoptera: Tortricidae), pero que en el caso de esta última no se desarrolla normalmente (Hennessey *et al.*, 1995).

Posición sistemática

Esta especie es originaria de Kazajistán y fue encontrada asociada a *C. pomonella* en la década del 90 del siglo pasado. En un principio fue identificada como *M. ridibundus* por Horstman, pero posteriormente este autor hizo una revisión del material y los ejemplares estudiados fueron renombrados como una especie nueva, *M. ridens* (Horstman, 2009).

1. Orden: Hymenoptera
2. Superfamilia: Ichneumonoidea
3. Familia: Ichneumonidae
4. Subfamilia: Cryptinae
5. Tribu: Phygadeuontini
6. Género: *Mastrus*
7. Especie: *Mastrus ridens* Horstman (syn. *M. ridibundus* auct.)

Características morfológicas

El conocimiento referido a los estados inmaduros en esta especie es aún escaso. Abdullaev (1972) menciona el tiempo de desarrollo de los estados inmaduros (huevo-larva-pupa) para el género *Mastrus* sp. En particular, para *M. carpocapsae*, se describen 5 estadios larvales (Llyod, 1960). Se presentan imágenes de los estados de desarrollo (huevo-larva-pupa-adulto) de la especie *M. ridens* (figura 5). El adulto de esta especie es una avispa mediana de aproximadamente 5 mm. de largo con antenas largas y simples, siendo la cabeza negra, parte del tórax (mesosoma) y patas de color negro y el resto del cuerpo es de color marrón-anaranjado. La hembra (figura 5E) presenta un ovipositor conspicuo, de 0,4x de largo respecto del ala anterior y sus antenas poseen 24 segmentos. El macho (figura 5F) tiene el gáster más comprimido que la hembra y posee antenas de 23 segmentos (Townsend, 1969; Torrén y Tortosa, 2008).



Figura 5. Estados de desarrollo de *M. ridens*. A. huevos, B. larva neonata, C. larva madura, D. pupa en capullo, E. hembra adulta con ovipositor conspicuo y F. macho adulto con gáster comprimido.

Ciclo de vida y ecología

Mastrus ridens es una especie originaria de Asia Central (Mills, 2005a), es un ectoparasitoide idiobionte, lo que significa que en el momento de oviponer la hembra detiene el desarrollo del huésped y la larva del parasitoide se alimenta externamente del huésped. Es una especie gregaria, de modo que se puede desarrollar más de un parasitoide por huésped. Además, parasita a las larvas de *C. pomonella* del quinto estadio cuando éstas migran fuera de los frutos en busca de un lugar donde tejer su capullo (figura 6) (Bezemer y Mills, 2003). Aspectos de la biología y la ecología de *M. ridens* fueron estudiados por varios autores en condiciones de laboratorio y en el campo (Bezemer y Mills, 2001; Bezemer y Mills, 2003; Hougardy *et al.*, 2005; Hougardy y Mills, 2006; Hougardy y Mills, 2007; Devotto *et al.*, 2010).

Para *Mastrus* sp. está descrito el ciclo de vida. Las larvas eclosionan al cabo de un día desde la oviposición. Luego, se mantienen activas durante 5-6 días y posteriormente tejen su capullo. Desde la formación del capullo hasta la emergencia de los adultos transcurren 16 a 18 días. En el laboratorio a 25-28 °C y 70-75% de humedad el tiempo de desarrollo de huevo a adulto es de 23-27 días (Abdullaev, 1972).

La actividad de los adultos de *M. ridens* aumenta hasta una temperatura óptima de 25-27 °C. Con temperaturas superiores a 27 °C las hembras se quedan inmóviles (Hougardy y Mills, 2007). Se observó que a una temperatura constante de 35 °C las hembras no dejan descendencia y los estados inmaduros no prosperan (Devotto *et al.*, 2010). En condiciones de laboratorio las hembras de *M. ridens* parasitan larvas del quinto estadio de *C. pomonella* de diversos tamaños (37-78 mg), y se observó una relación positiva entre el número de hembras que emerge por huésped y el tamaño del mismo (Devotto *et al.*, 2010). Además, en condiciones de laboratorio se registró una tasa de ataque de 1-2 huéspedes por día (Bezemer y Mills, 2003; Hougardy *et al.*, 2005), y una fecundidad diaria media de 5 huevos por hembra (Hougardy *et al.*, 2005). En el campo esta especie manifestó una buena capacidad de búsqueda y de dispersión en montes de manzanos (Bezemer y Mills, 2001).

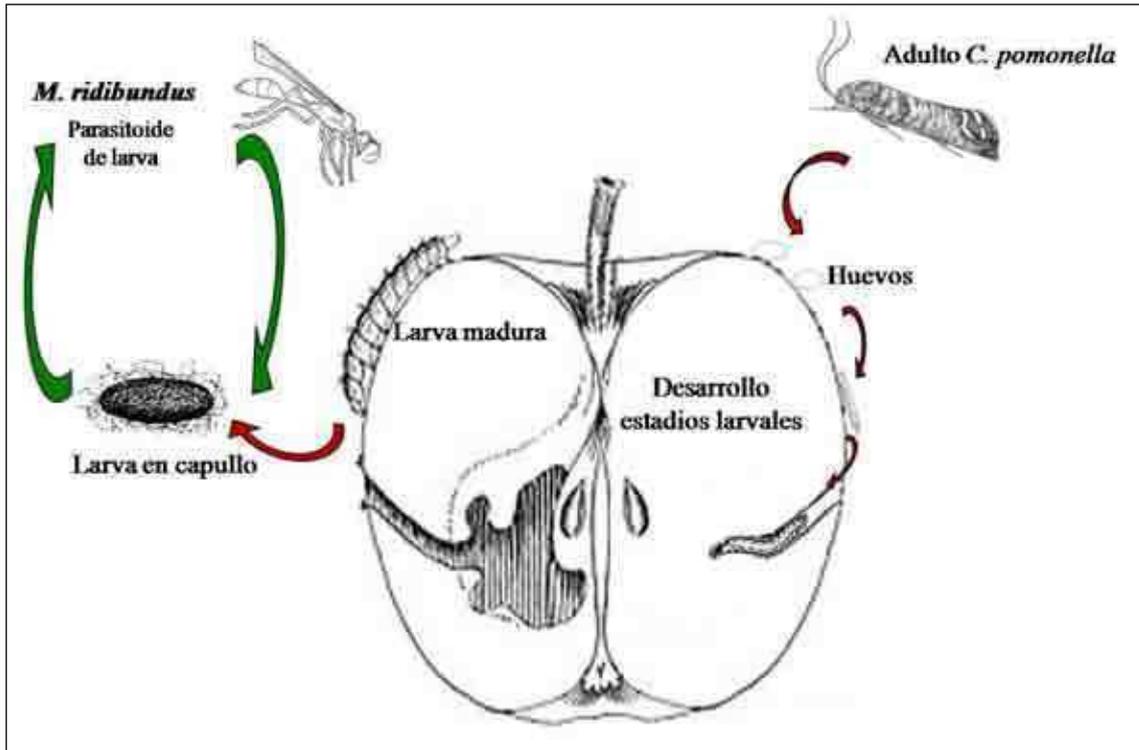


Figura 6. Esquema de la interacción entre el ectoparásito, *M. ridens* (flechas verdes) y *C. pomonella* (flechas rojas). *M. ridens* parasita a las larvas maduras del huésped luego de que salen del fruto y tejen su capullo. Los estadios inmaduros del ectoparásito acontecen sobre la larva madura de *C. pomonella* en su capullo (flechas verdes).

Antecedentes de su uso en el control biológico de *Cydia pomonella*

En Estados Unidos *M. ridens* fue importado como parte de un programa para controlar a *C. pomonella* en una extensa área en California. Este parasitoide fue liberado en montes frutales de manzanas, peras y nogales a partir de 1995 (Mills, 2005a). Los resultados obtenidos en los montes frutales fueron variables. En algunos de ellos se registraron altos niveles de parasitismo en larvas invernantes durante la temporada de su liberación (57% parasitismo), mientras que en otros montes no se detectó parasitismo (Mills *et al.*, 2004; Mills, 2005a). A nivel regional este parasitoide se estableció de forma satisfactoria en California. En particular, en el caso de algunos nogales se registró una disminución del daño de *C. pomonella* a partir de la liberación de esta especie (Mills, 2005b). Este enemigo natural también fue liberado en Washington, Oregon y Michigan (Kulmann y Mills, 1999; Epstein *et al.*, 2003). En Washington se recobraron adultos en numerosas ocasiones en montes sin uso de agroquímicos (Kulmann y Mills, 1999) y

también en Michigan, con niveles de parasitismo de hasta 58% en montes orgánicos (Epstein *et al.*, 2003).

En América del Sur esta especie fue liberada en Chile en 2008, en la XI región de Chile Chico, donde se registraron niveles de parasitismo de hasta 40% en larvas invernantes de *C. pomonella* (Devotto *et al.*, 2009). En la Argentina, en 2003 se emprendió un proyecto internacional (FONTAGRO FTG-18/01) denominado “Desarrollo de estrategias de control biológico para el manejo integrado de plagas de frutales (manzano)”. Uno de sus objetivos fue la selección e introducción de parasitoides exóticos para el control de *C. pomonella*, entre ellos *M. ridens*.

Ascogaster quadridentata

Hay descritas alrededor de ciento diez especies del género *Ascogaster*. Todas ellas son endoparásitos de lepidópteros, principalmente de tortricidos (Tang y Marsh, 1994). *A. quadridentata* tiene una distribución Holártica (Shaw, 1983), entre sus huéspedes además de *C. pomonella* se mencionan otras especies plagas de la familia de los tortricidos, como: *Grapholita molesta*, *G. prunivora* Walsh, *G. packardi* (Zell.), *Spilonota ocellana* (Denis & Schiffermuller), *Paralobesia viteana* (Clem.) y *Cydia nigricana* Steph. (Cox, 1932; Rosemberg, 1934; Boyce, 1936; Shaw, 1983; Tang y Marsh, 1994).

Posición sistemática

Este insecto fue descrito originalmente por Wesmael en 1835. Sus sinónimos son: *Chelonus impressus* Herrich-Schaeffer 1838 y *Ascogaster carpocapsae* o *Chelonus carpocapsae* Viereck 1909 (Shaw 1983; Tang y Marsh, 1994).

1. Orden: Hymenoptera
2. Superfamilia: Ichneumonoidea
3. Familia: Braconidae
4. Subfamilia: Cheloninae
5. Tribu: Chelonini
6. Género: *Ascogaster*
7. Especie: *Ascogaster quadridentata* Wesmael

Características morfológicas

Los caracteres morfológicos de los estados de desarrollo de *A. quadridentata* se recopilaron de los estudios de Cox (1932), Geier (1957) y Huddleston (1984).

Huevo (figura 7 A): con forma de coma, redondeado en el extremo de la cabeza y se angosta gradualmente hacia un extremo curvo en la región caudal, de 0,174 mm de largo. Es blanco e inicialmente tiene un contenido granular denso.

Larva (figura 7 B, E y G): el primer estadio larval tiene 0.198 mm de largo y consta de 13 segmentos. Cuando la larva del huésped completa su desarrollo y teje su capullo, el primer estadio larval completa su desarrollo. El segundo estadio es similar al primero, la cabeza es más angosta y menos esclerotizada, sin mandíbulas, y de 3,36 mm de largo. En el tercer estadio cambia el aspecto externo, la larva es menos alargada y más ancha en el medio, con mandíbulas ligeramente esclerotizadas y de 4,32 mm de largo. Este estadio hacia el final ocupa casi toda la cavidad corporal del hospedador. Con la última muda cambia el hábito de la larva, completando su desarrollo afuera. La larva emerge por un orificio del huésped y por medio de contorsiones graduales comienza a salir, hasta colocarse en forma paralela al mismo. El cuarto estadio larval se angosta en el medio y se arquea dorsalmente, de 5,86 mm de largo. Con mandíbulas fuertemente esclerotizadas, una vez que termina de consumir externamente al hospedador teje su propio capullo en el interior del capullo del mismo.

Pupa (figura 7 C y D): el capullo consiste en 3 capas de hebras de seda blancas con forma ovalada y mide 5,62 mm de largo. La pupa recién formada es blanca con ojos negros (figura 7 C). A medida que avanza el desarrollo se vuelve negra. Mide aproximadamente 4,4 mm de largo.

Adulto (figura 7 F): es una avispa de pequeño tamaño de 3-5 mm de largo, con cuerpo robusto negro o marrón oscuro y largas antenas. Una característica distintiva es que los tergitos de los segmentos abdominales están fusionados formando un caparazón dorso-lateral. Los machos son similares a las hembras. Se puede diferenciar los individuos de cada sexo a través de las antenas, ya que en los machos los segmentos siete a catorce son más largos y compactos que en las hembras (figura 8 A-D).



Figura 7. Estados de desarrollo de *A. quadridentata*. A. huevo, B. larva madura, C. pupa desnuda, D. pupa en capullo, E. larva del cuarto estadio alimentándose externamente del huésped, F. adulto con antenas largas, y G. Tamaño relativo de larva de *Cydia pomonella* no parasitada (izquierda) y parasitada (derecha).

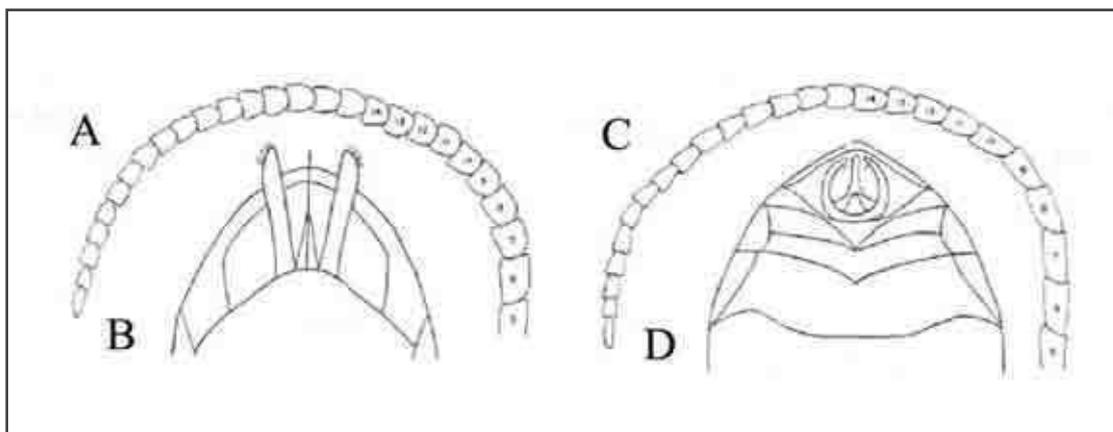


Figura 8. Esquema del abdomen y las antenas del adulto de *A. quadridentata*. A y B antena y abdomen de la hembra; C y D antena y abdomen del macho (Cox, 1932).

Ciclo de vida y comportamiento

Ascogaster quadridentata es una especie originaria de Eurasia (Boyce, 1936). Su ciclo de vida ha sido documentado por varios autores, Cox (1932), Rosemberg (1934) y Boyce (1936), pero poco se conoce sobre sus atributos biológicos, como la supervivencia y fecundidad de los adultos.

Este insecto es un endoparasoide koinobionte, lo que significa que, en el momento de oviponer, la hembra no mata al hospedador sino que el desarrollo del parasoide transcurre mientras el mismo también continúa desarrollándose y la larva del parasoide se alimenta en el interior del cuerpo del huésped. Además, se trata de un parasoide solitario, por lo tanto un único parasoide se desarrolla por huésped. Esta especie parasita los huevos de *C. pomonella*, las hembras depositan sus huevos en el citoplasma del huevo del hospedador, y luego la larva eclosiona, penetra en el embrión y continúa su desarrollo (figura 9). Tiene cuatro estadios larvales. Los tres primeros se alimentan internamente del huésped, pero con la última muda cambia el hábito de la larva y durante el cuarto estadio larval sale del interior del hispedador, una vez que este teje su capullo pupal, y se alimenta externamente consumiendo completamente al huésped a excepción del exoesqueleto (Cox, 1932). Las hembras adultas pueden parasitar exitosamente huevos de *C. pomonella* en edades avanzadas del desarrollo embrionario, de hasta 5 días de edad (Reed-Larsen y Brown, 1990). Los huevos parasitados son indistinguibles, a simple vista, de los no parasitados.

Los adultos tienen fototropismo positivo. Una vez que emergen, estén fertilizadas o no, las hembras están en condiciones de oviponer sin necesidad de alimentarse previamente (Rosemberg, 1934; Boyce ,1936). Su ciclo de vida está sincronizado con el del huésped, observándose varias generaciones por año según la región. En invierno entra en diapausa como primer estadio larval en el interior de la cavidad corporal del huésped. Las larvas de *C. pomonella* parasitadas son de menor tamaño que las normales, alcanzando un tercio del tamaño corporal al completar su desarrollo (figura 8G) (Cox, 1932; Cox y Daniels, 1935).

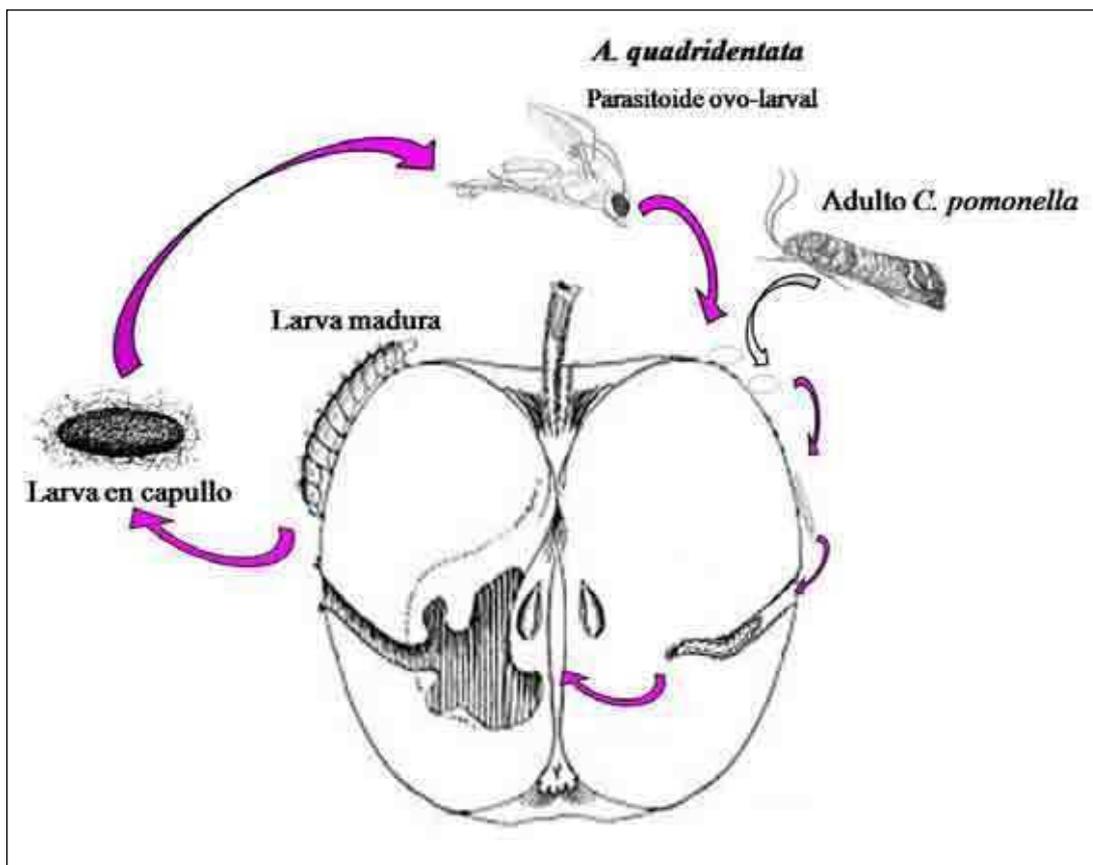


Figura 9. Esquema de la interacción entre el endoparásito *A. quadridentata* y *C. pomonella*. *A. quadridentata* parasita los huevos del huésped y los estadios inmaduros acontecen dentro de los estadios larvales del huésped (flechas rosas).

Antecedentes de su uso en el control biológico de *Cydia pomonella*

Los programas de control biológico que involucraron la introducción de *A. quadridentata* para el CBC de *C. pomonella* se remontan a inicios del siglo pasado. En

el este de Estados Unidos, a partir de los años veinte hay registros de poblaciones de este parasitoide en donde se lo menciona como una especie abundante (Dosier y Butler, 1929; Cox ,1932; Cox y Daniels, 1935; Clausen, 1978). En Nueva York se citan niveles de parasitismo superiores al 30% en montes sin aplicaciones de insecticidas (Cox ,1932; Cox y Daniels, 1935).

En Canadá, en la Columbia Británica, se realizaron liberaciones de *A. quadridentata* en 1933, y posteriormente se registró su establecimiento en la región (Boyce, 1936; Clausen, 1978). Esta especie se estableció en Nueva Zelanda donde se reportan niveles de parasitismo entre 5-32% en la zona de Canterbury (Tomkins *et al.* 1987; Suckling *et al.*, 2002). En Sudáfrica *A. quadridentata* fue liberado en 1920 y hay registros de su recuperación en algunas localidades en 1936. También se liberó en Australia en 1964 y en Perú en 1937, donde no existen datos sobre su establecimiento (Clausen, 1978).

Como se mencionó anteriormente, en Argentina, en 2003, se emprendió un proyecto internacional (FONTAGRO FTG-18/01), el cual entre sus objetivos incluyó la selección e introducción de parasitoides exóticos para el control de *C. pomonella*, como *A. quadridentata*.

OBJETIVOS

GENERAL:

Estudiar aspectos básicos de la biología de *M. ridens* y *A. quadridentata* a los efectos de evaluar su potencial como agentes de control de *C. pomonella* en la Argentina.

ESPECÍFICOS:

1. Introducir a *M. ridens* y *A. quadridentata* en el país y multiplicar a ambas especies de enemigos naturales y su huésped en el laboratorio.
2. Evaluar los principales atributos biológicos y poblacionales de *A. quadridentata* sobre *C. pomonella* en el laboratorio.
3. Evaluar parámetros asociados al desempeño y la preferencia de *M. ridens* sobre dos tipos de larvas de *C. pomonella* y dos especies de tortricidos plaga: *C. pomonella* y *G. molesta*.
4. Evaluar la toxicidad de insecticidas de uso frecuente en la producción de pomáceas sobre el parasitoide, *M. ridens*.
5. Evaluar la colonización y el establecimiento de los entomófagos en el Alto Valle de Río Negro.

CAPÍTULO 1

Introducción y multiplicación de los
enemigos naturales



Introducción

Luego de la búsqueda y selección de los enemigos naturales para desarrollar un programa de control biológico clásico (CBC), el paso siguiente consiste en la introducción y cuarentena de los agentes de control en el país importador (Van Driesche y Bellows, 1996). En cada país existen leyes que regulan la entrada de especies animales y las condiciones que se deben cumplir para su traslado desde el área de origen hasta su destino final. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) elaboró un código de conducta para la importación y liberación de agentes exóticos de control biológico. En particular, Argentina como integrante del Comité de Sanidad Vegetal del Cono Sur (COSAVE), adhiere a los lineamientos del mencionado código, en el que se indican, entre otros aspectos, las normas que se deben seguir para evaluar la idoneidad y calidad de los agentes de control biológico importados y las pautas en relación con su manipulación, evaluación y utilización. El procedimiento de importación de agentes de control biológico exóticos incluye la presentación de estudios de evaluación de impacto ambiental (análisis de riesgo para posibles organismos no destinatarios y para el medio ambiente), los cuales comprenden las pruebas de evaluación del rango de hospedadores del enemigo natural introducido (PERH) (FAO, 1996). En nuestro país estas pruebas son un requisito solicitado por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) y por la Secretaria de Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable.

Una vez que los agentes de control biológico ingresan en el país importador se procede a la cuarentena del material biológico, a través del confinamiento oficial de los agentes importados con fines de observación e investigación o para ulteriores inspecciones o pruebas (FAO, 1996). Los laboratorios de cuarentena están diseñados para ser un área altamente segura donde se procesan los envíos de material del extranjero, se excluyen los contaminantes y se crían los enemigos naturales mientras se evalúan aspectos asociados a la seguridad de los agentes, previamente a su liberación en el nuevo ambiente. Si las evaluaciones en la cuarentena resultan favorables, el organismo candidato puede ser multiplicado en el laboratorio para su posterior colonización en el campo (Van Driesche y Bellows, 1996).

En el caso de programas de CBC que involucren la multiplicación de los enemigos naturales es necesario establecer colonias de los mismos libres de contaminaciones. Esto requiere de: 1- la recuperación exitosa del enemigo natural a

partir del material recibido, 2- la posibilidad de contar con poblaciones adecuadas del huésped de cría del enemigo natural importado, y 3- la reproducción exitosa (cantidad, calidad) del agente importado (Basso, 2002). En este sentido el manejo y la cría de los enemigos naturales importados en el laboratorio constituye un aspecto relevante en la ejecución de programas de CBC, y se convierte en una limitante ya que no resulta fructífero disponer de un enemigo natural si su cría es complicada y costosa (Botto, 2002).

En relación con la multiplicación a gran escala de insectos para su utilización en programas de control biológico, una característica fundamental de los insectos producidos es que éstos deben conservar todas sus características biológicas para que cuando se liberen en el campo sean competitivos (Martínez, 2004). Para ello es necesario elaborar protocolos de control de calidad en las crías de insectos. El control de calidad consiste en: establecer estándares, estimar los parámetros asociados a la calidad, actuar cuando estos parámetros están por debajo de los valores estándares establecidos y planificar mejoras en los rangos observados (Dyck, 2010). Un aspecto fundamental es el monitoreo rutinario de los parámetros vinculados tanto a los estados inmaduros, como el porcentaje de eclosión de las larvas, el peso de la larva, el porcentaje de formación de pupas y el peso de la pupa, como a los adultos, tales como el porcentaje de emergencia, la razón sexual, la capacidad de vuelo y la supervivencia (Leppä y Fisher, 1989; Norlund, 1998). Además, es de gran relevancia poder relacionar los cambios en la calidad con un determinado estado de desarrollo del insecto y atribuirlos a un proceso particular de la cría.

En este capítulo se describe el proceso de introducción y cuarentena de *M. ridens* y *A. quadridentata* y los procedimientos involucrados en las crías sobre su huésped. Asimismo, debido a la necesidad de obtener un abastecimiento continuo del huésped en óptimas condiciones se evaluaron variables inherentes a la calidad de la cría de *C. pomonella* en el laboratorio.

1a) Cría del huésped, *C. pomonella* y estimación de parámetros asociados a la calidad de la misma.

Materiales y métodos

Cría del huésped

Cydia pomonella ha sido criada en el Insectario de Investigaciones para Lucha Biológica (IILB) desde 2003 y la colonia inicial procedió de individuos (larvas del último estadio) colectados en montes frutales de manzanos de la región del Alto Valle de Río Negro, Argentina. Para el desarrollo de las larvas se empleó una dieta artificial húmeda en base a agar-agar similar a la descrita por Guenellon *et al.* (1981). Esta cría tuvo como propósito principal proveer material del huésped para las crías de los enemigos naturales *M. ridens* y *A. quadridentata*, la realización de los estudios programados con ambos parasitoides y el mantenimiento de la colonia de *C. pomonella*. La multiplicación de este lepidóptero se llevó a cabo en una cámara de cría a 25 ± 2 °C de temperatura, 30-70% de humedad relativa e iluminación natural. El procedimiento de cría se esquematiza en la figura 1.1.

El sistema de cría consistió en colocar 100-150 adultos en unidades de oviposición (cilindros plásticos con orificios de ventilación de 29 x 12 cm de diámetro), recubiertas interiormente con papel parafinado sobre el cual las hembras depositan sus huevos. También se dispuso abundante alimento para los adultos en almohadillas absorbentes, que consistió en una solución azucarada preparada con miel, ácido ascórbico y Nipagin (metil parabeno, anti-micótico). Al cabo de una semana los adultos presentes en las unidades de oviposición fueron eliminados.² Cada 2-3 días se recambiaron los papeles parafinados de las unidades de oviposición, y los papeles con los desoves fueron lavados en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos y enjuagados con agua. Una vez secos, los papeles con desoves fueron almacenados en la cámara de cría en recipientes plásticos herméticos y asperjados con una solución de Micostatin® (Nistatina) para evitar la desecación de los huevos y la aparición de hongos. Luego, cuando los huevos alcanzaron un estado avanzado de desarrollo embrionario, “huevos cabeza negra”³ (HCN), se realizó “la siembra del

² Esta es una práctica habitual en los laboratorios de cría masiva ya que las hembras de *C. pomonella* dejan el 80-94% de su descendencia en los primeros 6 días de vida (Dick, 2010).

³ Se denomina “huevo cabeza negra” cuando se visualiza la cápsula cefálica del embrión esclerotizada (Quintana *et al.*, 1997).

material”, cuyo procedimiento consistió en colocar fragmentos de papeles con oviposiciones en los recipientes de cría con dieta artificial. En cada recipiente de 250 cm³ se colocó un fragmento de papel con 20-25 huevos, que se ubicó con un alfiler cerca de la superficie de la dieta para permitir que las larvas neonatas se desplazaran hasta la misma. A las 48 horas se retiró el papel. Las larvas se desarrollaron en la dieta, donde también transcurrió el estado de pupa. A los 30-35 días desde la siembra comenzaron a emerger los adultos en los recipientes de cría y fueron recolectados cada 2-3 días para ser transferidos a las unidades de oviposición. Luego de 2 meses a partir de la siembra los recipientes de cría fueron eliminados.

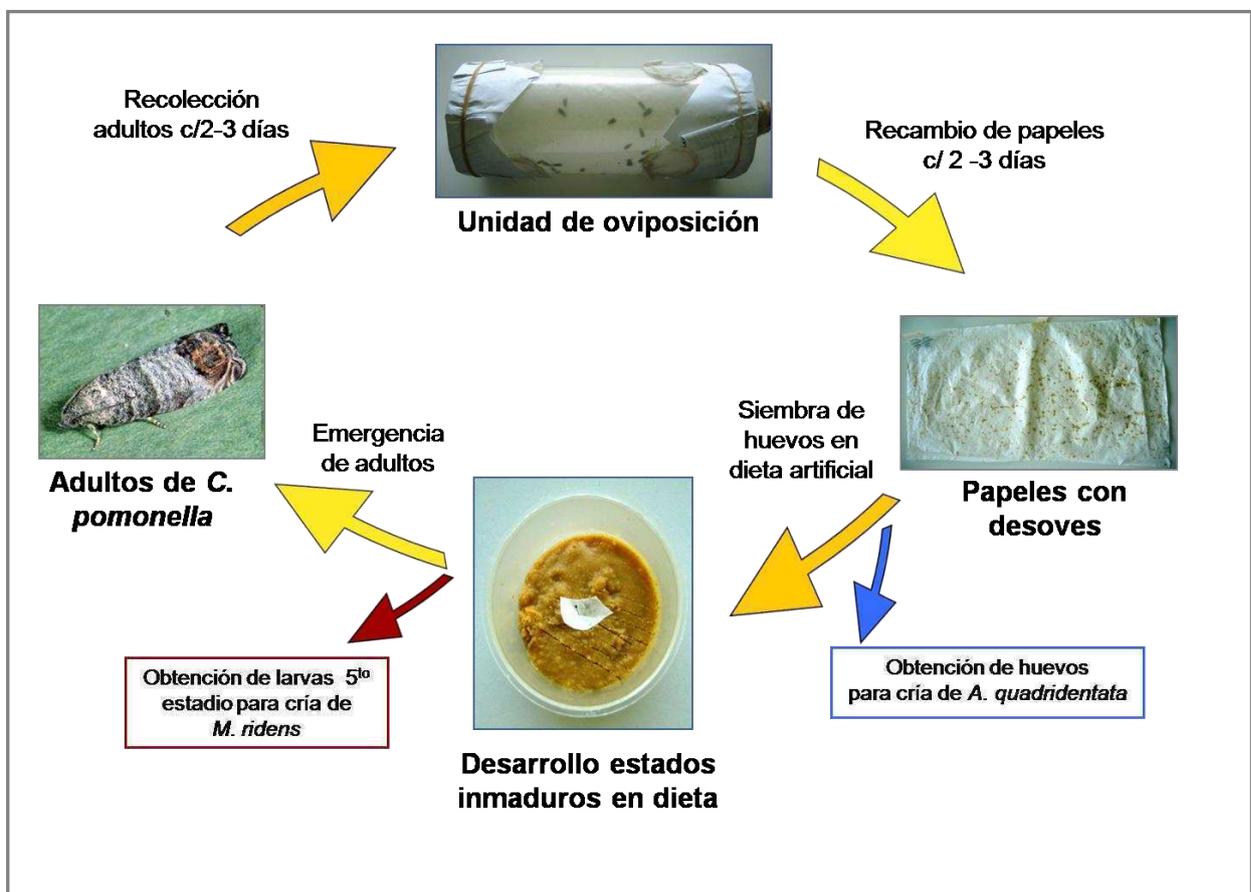


Figura 1.1. Esquema de cría de *C. pomonella*.

Estimación de parámetros asociados a la calidad de la cría

Se estudiaron 5-8 cohortes de individuos. Cada cohorte representó a individuos pertenecientes a una misma semana de producción. Las observaciones se realizaron

mediante el uso de una lupa binocular y para la identificación de los estados inmaduros se tomó como referencia los estados de desarrollo descriptos por Quintana *et al.* (1997). Se evaluaron las variables que se detallan a continuación:

1. Viabilidad de los huevos.

Se utilizaron huevos blancos (≤ 48 horas de edad). Los papeles con los desoves se dispusieron en cajas de petri de plástico, de 5,5 cm de diámetro. En cada recipiente se colocó un trozo de papel con 20 a 25 huevos y se asperjaron con una solución de Nistatina. A los 5 días se registraron la cantidad de larvas eclosionadas y no eclosionadas, y en los huevos sin eclosion de larvas se observó si estaban secos o si contenían hongos. Se analizaron 15 réplicas por semana durante 8 semanas de producción, y se estimó la viabilidad de los huevos a través del porcentaje de eclosión como: $[\text{n}^\circ \text{ de larvas eclosionadas} / (\text{n}^\circ \text{ de larvas eclosionadas} + \text{n}^\circ \text{ de huevos donde no hubo eclosión})] * 100$.

El porcentaje de eclosión fue analizado con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis por no cumplirse los supuestos del ANOVA y se compararon las medias de las semanas de producción (efecto del tratamiento) con la prueba de comparaciones múltiples por rangos (Statsoft, 2000).

2. Mortalidad de los huevos utilizados en la siembra (huevos desarrollados).

Se evaluó la mortalidad de los huevos en el estado de cabeza negra (HCN) ya que este tipo de huevos son los que se utilizan habitualmente para la siembra en la cría de esta especie en el laboratorio. En las condiciones de la cámara de cría los huevos alcanzan este estado de desarrollo embrionario al cabo de cinco días aproximadamente. Los papeles con HCN se dispusieron en los recipientes de cría con dieta artificial siguiendo la metodología descrita anteriormente para esta especie. Por recipiente de 250 cm^3 (5 cm alto x 6,5 cm diámetro) se colocó un trozo de papel con 20 a 25 huevos y a las 72 horas se registró la cantidad de larvas eclosionadas y no eclosionadas. Se evaluaron 40 recipientes de cría por semana durante 8 semanas de producción, representando el 10% de la producción total semanal del laboratorio. La mortalidad de los huevos (HCN) se estimó como: $[\text{n}^\circ \text{ de huevos donde no hubo eclosión} / (\text{n}^\circ \text{ de larvas eclosionadas} + \text{n}^\circ \text{ de huevos donde no hubo eclosión})] * 100$.

La mortalidad de los huevos fue evaluada con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis por no cumplirse los supuestos del ANOVA, y se compararon las

medias con la prueba de comparaciones múltiples (Statsoft, 2000). A partir de los individuos de los cuarenta recipientes de cría obtenidos en este punto se evaluaron las variables de los puntos 3 a 5.

3. Supervivencia de las larvas del último estadio.

En las condiciones de la cámara de cría se observó que el tiempo de desarrollo de *C. pomonella* desde la eclosión de la larva de primer estadio hasta el quinto y último estadio larval fue de aproximadamente 20 días⁴. Para evaluar la supervivencia de las larvas del último estadio se seleccionaron al azar 10 recipientes de los 40 mencionados en el punto anterior y se registró la cantidad de larvas vivas. Se estimó el porcentaje de supervivencia de las larvas a los 20 días como: $(\text{n}^\circ \text{ de larvas vivas} / \text{n}^\circ \text{ de larvas eclosionadas}) * 100$.

La supervivencia de las larvas del último estadio fue analizada con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis por no cumplirse los supuestos del ANOVA y se compararon las medias con la prueba de comparaciones múltiples por rangos (Statsoft, 2000).

4. Peso, supervivencia de la pupa y proporción sexual de la descendencia

A los 25 días desde la siembra se tomó una muestra de pupas al azar, a partir de los 40 recipientes de cría por semana mencionados en el punto 2. Se colectaron 50 pupas por semana y se agruparon aleatoriamente en 10 lotes de 5 pupas cada uno. Los individuos de cada lote se pesaron en una balanza de precisión Mettler H15. Se estimó el peso de la pupa por semana de producción como el promedio del peso de los 10 lotes. En cada lote se contabilizó la cantidad de pupas y se identificó el sexo de las mismas, registrándose la cantidad de pupas no viables y de adultos emergidos.

La supervivencia de la pupa por lote se estimó como: $(\text{n}^\circ \text{ adultos emergidos} / \text{n}^\circ \text{ pupas iniciales}) * 100$

La proporción sexual de la descendencia por lote se estimó como: $[(\text{n}^\circ \text{ pupas hembra} / (\text{n}^\circ \text{ pupas hembra} + \text{n}^\circ \text{ pupas macho})) * 100]$

El peso medio de las pupas se evaluó mediante un ANOVA de un factor y las posibles diferencias entre medias de las semanas de producción se compararon con la prueba de Fisher LSD. El nivel de significancia fue $\alpha = 0,05$. Los datos de

⁴ En la bibliografía se citan valores entre 15 y 25 días para el tiempo de desarrollo larval de *C. pomonella* dependiendo de las condiciones ambientales de la cría (Dick, 2010)

supervivencia de la pupa y proporción de sexos se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis por no cumplirse el supuesto de normalidad del ANOVA (Lilliefors $p < 0,01$) (Statsoft, 2000).

5. Fecundidad de los adultos obtenidos

Una vez que emergieron los adultos se aislaron parejas de menos de 48 horas de edad. Las mismas se colocaron en recipientes plásticos (8,5 cm de diámetro x 5,5 cm de altura) con tapa, acondicionados para la oviposición con papel encerado y abundante alimento para los adultos. Cada 48 horas y durante una semana se registró la cantidad de huevos depositados por hembra. A partir de estos datos se estimó la fecundidad semanal como: número de huevos/hembra/semana.

La variable fecundidad fue analizada con un ANOVA de un factor ($\alpha = 0,05$) (Statsoft, 2000).

Resultados

1. Viabilidad de los huevos

El porcentaje de eclosión de las larvas en huevos blancos (HB) fue significativamente diferente entre las semanas de producción (K-W: $H(7) = 33,73$; $p < 0,0000$). Los valores obtenidos fueron inferiores al 70% en todas las semanas, y oscilaron entre: $28,57 \pm 5,38\%$ y $68,27 \pm 3,4\%$, (figura 1.2). Se observó el menor porcentaje de eclosión en la semana 1 que difirió significativamente de los valores más altos en las semanas 3, 4, 5 y 8, mientras que los valores de las semanas 2, 6 y 7 fueron intermedios entre los anteriores. Además, en los huevos que no eclosionaron larvas se registró un porcentaje de huevos secos superior al 30% en todas las semanas, con valores que oscilaron entre: $31,83 \pm 9,76$ y $82,22 \pm 5,08\%$, mientras que solo se registró la presencia de hongos en una semana de producción con un valor cercano al 1,4% de los huevos donde no eclosionaron larvas con hongos.

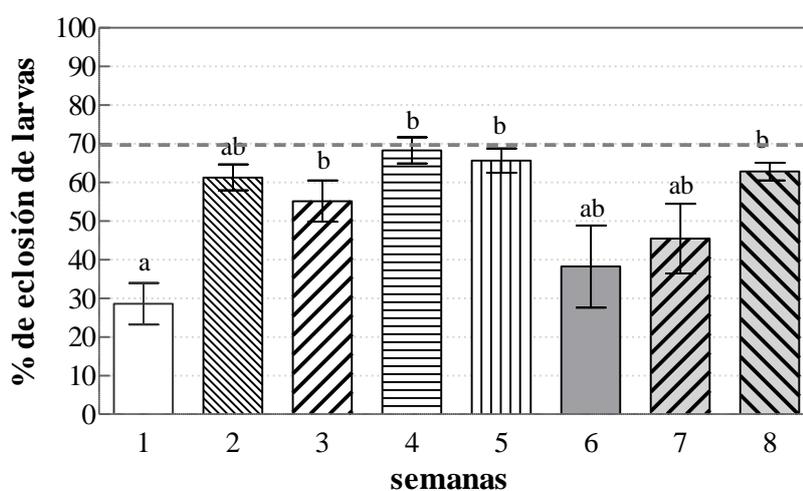


Figura 1.2. Porcentaje de eclosión de larvas en huevos blancos (HB) de *C. pomonella* (media \pm error estándar) para cada semana de producción. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas en el porcentaje de eclosión (prueba de comparaciones múltiples por rangos, $p < 0,05$).

2. Mortalidad de los huevos utilizados en la siembra

La mortalidad de los huevos cabeza negra (HCN) difirió significativamente entre las semanas de producción (K-W: $H(7) = 75,39$; $p < 0,0000$). Los valores obtenidos superaron el 10% de mortalidad en todas las semanas, con valores entre $37,97 \pm 2,57\%$

y $14,28 \pm 1,38\%$ (media \pm error estándar) en las semanas 2 y 7, respectivamente (figura 1.3).

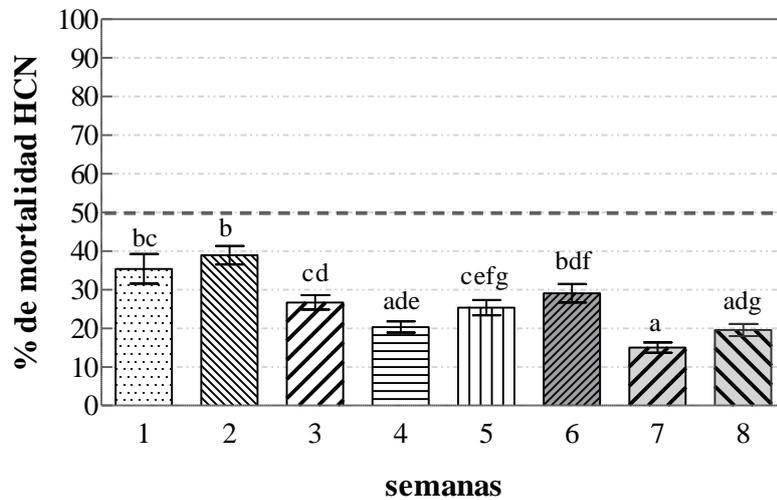


Figura 1.3. Porcentaje de mortalidad de huevos cabeza negra (HCN) de *C. pomonella* (media \pm error estándar) para cada semana de producción. Letras distintas indican diferencias significativas en el porcentaje de eclosión (prueba de comparaciones múltiples por rangos, $p < 0,05$).

3. Supervivencia de larvas del último estadio.

El porcentaje de supervivencia de larvas a los 20 días de desarrollo fue inferior al 60% y se registraron diferencias significativas entre las semanas de producción (K-W: $H(5) = 17,87$; $p = 0,0031$) (figura 1.4). Se observó el menor porcentaje de supervivencia de las larvas (33%) en la semana 1 que difirió significativamente de los valores más altos en las semanas 2 y 4 (50-60%), mientras que los restantes valores fueron intermedios.

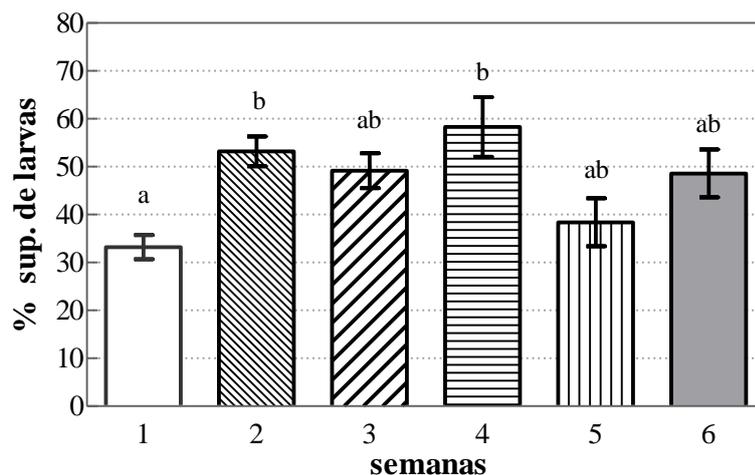


Figura 1.4. Porcentaje de supervivencia de larvas del último estadio de *C. pomonella* (media \pm error estándar) para cada semana de producción. Letras distintas indican diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia (prueba de comparaciones múltiples por rangos, $p < 0,05$).

4. Peso, supervivencia de la pupa y proporción sexual de la descendencia

El peso de las pupas fue variable entre las semanas de producción ($F_{(5,50)} = 2,44$; $p = 0,0468$). Se observó el mínimo valor en la semana 4 que difirió significativamente de los valores más altos registrados en las semanas 3 y 6, mientras que los valores de las semanas 1, 2 y 5 fueron intermedios entre los anteriores (figura 1.5).

La supervivencia de la pupa y la proporción de sexos no variaron significativamente entre las semanas de producción ($K-W: H_{\text{sup. pupa}}(5) = 10,89$; $p_{\text{sup. pupa}} = 0,0535$ y $H_{\text{prop. sexos}}(5) = 3,55$; $p_{\text{prop. sexos}} = 0,6147$). La supervivencia de la pupa fue superior al 80% en todas las semanas de producción (figura 1.6) y la proporción de sexos fue cercana a 1:1 con un ligero sesgo hacia las hembras en la segunda y cuarta semana (proporción sexos $\geq 0,6$) (figura 1.7).

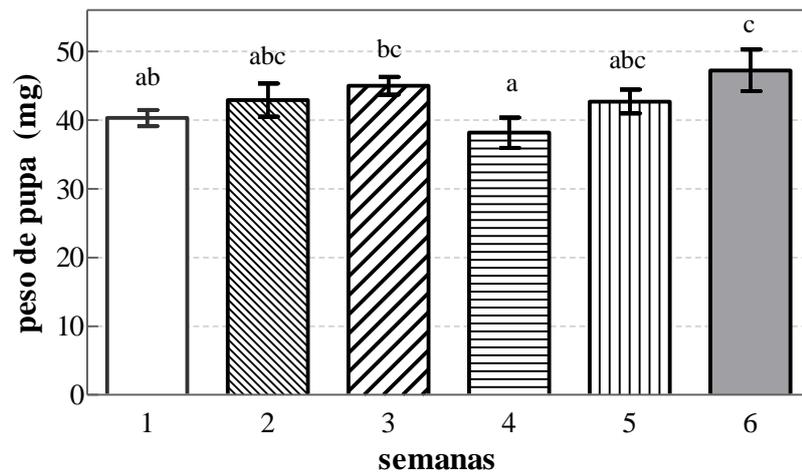


Figura 1.5. Peso de la pupa de *C. pomonella* (media \pm error estándar) para cada semana de producción. Letras distintas indican diferencias significativas en el peso (prueba de Fisher LSD, $p < 0,05$).

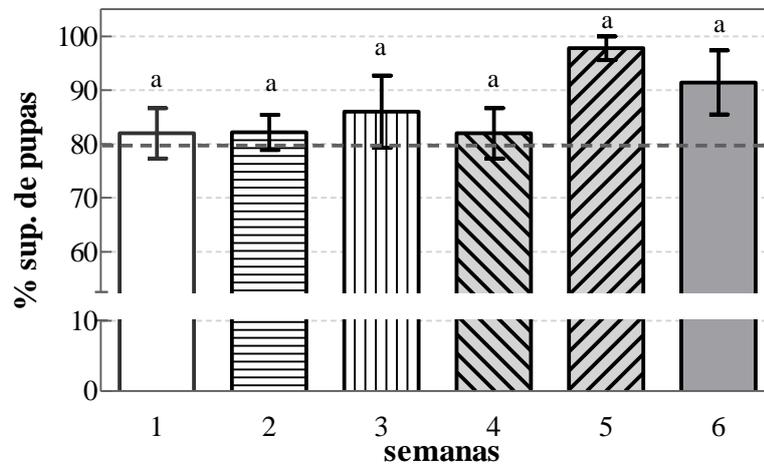


Figura 1.6. Porcentaje de supervivencia de la pupa de *C. pomonella* (media \pm error estándar) para cada semana de producción. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia (Kruskal- Wallis, $p > 0,05$).

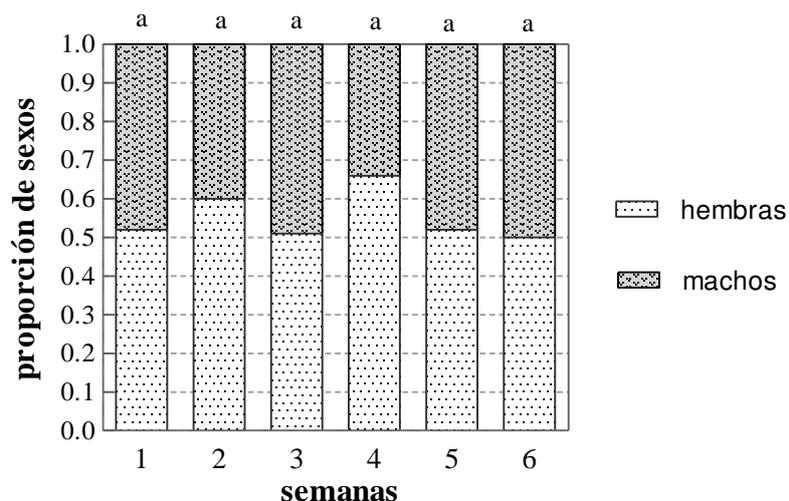


Figura 1.7. Proporción de sexos de *C. pomonella* (media) para cada semana de producción. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas en la proporción de sexos (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

5. Fecundidad de los adultos obtenidos

La fecundidad semanal no difirió significativamente entre las semanas de producción ($F_{(4, 45)} = 1,04$; $p = 0,3947$) (tabla 1.1).

Tabla 1.1. Fecundidad semanal de *C. pomonella* (media \pm error estándar).

Semana	n	Fecundidad semanal (huevos/hembra/semana)
1	15	146,80 \pm 14,84 a
2	5	184,00 \pm 42,91 a
3	12	171,25 \pm 21,75 a
4	8	122,37 \pm 29,33 a
5	7	190,71 \pm 36,58 a

Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencias significativas (ANOVA, $p > 0,05$).

Discusión

La viabilidad de los huevos de *C. pomonella* estimada a través del porcentaje de eclosión de las larvas en huevos blancos (rango: $28,57 \pm 5,38\%$ - $68,27 \pm 3,4\%$) fue reducida, con valores menores al 50% de larvas eclosionadas en tres de las ocho semanas evaluadas. Estos valores resultaron menores que los citados por otros autores para esta especie (tabla 1.2), quienes registraron valores entre 60 y 90 por ciento de eclosión dependiendo del tipo de dieta utilizada. Dick (2010) sugiere que el porcentaje de eclosión de las larvas debería ser mayor o igual al 70% para desarrollar una cría masiva de este lepidóptero. El análisis de los huevos donde no hubo eclosión de larvas reveló que un porcentaje elevado correspondió a huevos que se hallaban secos con valores superiores al 50% en 5 de las 8 semanas de producción. Entre los factores más importantes que afectan la eclosión de las larvas están la temperatura y la humedad relativa (Rock, 1967; Hathaway *et al.*, 1971; Dyck, 2010). En este estudio, a pesar que los papeles con huevos fueron asperjados con una solución con Nistatina es posible que las unidades experimentales utilizadas (cajas de Petri plásticas) no fueran lo suficientemente herméticas como para mantener la humedad necesaria para el desarrollo embrionario de los huevos. Asimismo, una pequeña proporción en la disminución del porcentaje de eclosión podría estar vinculado a la presencia de huevos no fertilizados (Dyck, 2010). Respecto de la mortalidad de los huevos cabeza negra utilizados en la siembra se observó que se produce una merma en la producción en esta etapa de la cría mayor al 10%. Para evitar esta pérdida es posible efectuar directamente la siembra de las larvas neonatas de *C. pomonella* en los recipientes con dieta artificial.

Tabla 1.2. Parámetros asociados a la calidad de la cría de *C. pomonella* en condiciones de laboratorio registrados por otros autores y en esta investigación.

Eclosión larvas (%)	Sup. larvas (%)	Sup. pupas (%)	Peso pupas (mg)	Fecundidad (huevos/♀)	Dietas artificiales	Condiciones ambientales	Autores
/	78 – 94	79 - 87	/	/	con agar	27°C; 18:6(L:O)	Rock (1967)
62 – 85	37 – 61	74 - 77	20-30 ♂ 36-41 ♀	/	con agar, o aserrín y pulpa de papel	26,7 ± 3°C, 50-60% HR; 18:6(L:O)	Hathaway <i>et al.</i> (1971)
74	/	/	/	/	con pulpa papel y aserrín	28 ± 1°C; 75%HR; 17:7 (L:O)	Batiste y Olson (1973)
75	/	/	/	90-150	con agar	25 ± 1°C; 50-70% HR; 18:6(L:O)	Guenelon <i>et al.</i> (1981)
92	/	/	31-50 ♂ 36-53 ♀	209	con agar	27 ± 1°C; 60 ± 10% HR; 18:6(L:O)	Quintana <i>et al.</i> (1997)
80	/	/	/	165-210	con agar	25 ± 1°C; 60-70%HR; 24:0 (L:O)	Cariac <i>et al.</i> (2003)
≥70	≥80	≥80	≥ 31-35 ♂ ≥ 39-43 ♀	/	/		Dick (2010) Valores estándares
28-68	33-60	82-98	38-45	122-190	con agar	25 ± 2°C; 30-70% HR; iluminación natural	Este trabajo

En relación a la supervivencia larval, los valores obtenidos fueron similares a los citados por Hathaway *et al.* (1971) para larvas criadas en dietas artificiales con distintos componentes de soporte (37 – 61%), pero resultaron inferiores al mencionado por Rock (1967) para larvas criadas en distintas dietas artificiales en base a agar (supervivencia: 78 – 94%) (tabla 1.2). Dick (2010) sugiere que es necesario un porcentaje de supervivencia de las larvas de *C. pomonella* mayor o igual al 80% para mantener una cría masiva. En el presente trabajo, los valores obtenidos resultaron menores al 60%, lo que indica una alta mortalidad en esta etapa del ciclo de vida. La alta mortalidad de las larvas puede asociarse a la presencia de virus entomopatógenos. En la cría se detectaron casos de individuos afectados por virus, y en particular en los recipientes de cría utilizados para estimar las variables de calidad se hallaron larvas con síntomas de virosis. Los virus son una amenaza para el éxito de las crías masivas de lepidópteros, especialmente cuando se utilizan dietas artificiales (Dick, 2010). Un patógeno muy importante que afecta a las larvas de *C. pomonella* es el virus de la granulosis (CpGV), cuya transmisión horizontal de un individuo a otro de la misma generación, depende, entre otros factores, de la densidad del insecto en la dieta (Steineke y Jehle, 2004). En

una cría en donde se multiplican varios individuos por recipiente con dieta artificial la probabilidad de contagio entre individuos es alta. Además, este virus puede ser transmitido de una generación a la siguiente a través de madres a hijos (transmisión vertical o trans-ovárica), lo cual facilita la persistencia de la enfermedad en la cría (Dick, 2010).

En cuanto al peso de las pupas (tabla 1.2), los valores observados se encuentran dentro del rango citado por Quintana *et al.* (1997) y fueron superiores al observado por Hathaway *et al.* (1971); además, se ubican en el rango de los valores de referencia dados por Dick (2010) para la cría de esta especie. De modo similar, la supervivencia registrada para las pupas concuerda con lo observado por Dick (2010), quien sugiere que para mantener una cría a gran escala de esta especie se estima adecuado una supervivencia de las pupas mayor o igual al 80%. Los valores obtenidos también fueron comparables a los registrados por Rock (1967) con dietas artificiales basadas en agar y distintos ácidos grasos esenciales (rango supervivencia: 84 - 87%), y fueron superiores a los valores de Hathaway *et al.* (1971) (rango supervivencia 74 - 78 %) (tabla 1.2).

La proporción sexual (estimada sobre las pupas) fue cercana a 0,5 (hembras/total descendencia) valor citado para esta especie por Quintana *et al.* (1997) y Dick (2010). Respecto de la fecundidad de las hembras, los valores obtenidos están dentro de los observados por otros autores a lo largo de la vida reproductiva de las hembras (tabla 1.2), los cuales mencionan que las hembras de *C. pomonella* dejan entre el 80-94% de los huevos en los primeros 6 días de vida, lapso que está contemplado en el presente trabajo. En particular, los valores de fecundidad obtenidos fueron similares a los hallados por Gennelon *et al.* (1981) (90-150 huevos/ hembra). Mientras que Quintana *et al.* (1997) y Cariac *et al.* (2003) reportaron mayores valores de fecundidad, de 209 huevos/hembra y 165- 210 huevos/ hembra, respectivamente (tabla 1.2)

En conclusión, los resultados obtenidos manifiestan que la mortalidad en las primeras etapas del desarrollo de *C. pomonella* (huevo y larva, respectivamente) además de ser muy variable fue mayor a lo deseable en términos de una producción de insectos a gran escala. Los bajos registros de supervivencia asociados a la etapa de huevo han estado influenciados por déficits en la humedad relativa registrada en las unidades experimentales motivo por el cual este aspecto es factible de ser mejorado. En cuanto a la supervivencia de la pupa, su peso promedio y la fecundidad de los adultos, los valores registrados se adecuan a los valores estándares establecidos para desarrollar una cría masiva de este lepidoptero.

Los problemas más serios detectados en la cría de esta especie estuvieron relacionados principalmente a la etapa de desarrollo de las larvas, en la que los problemas originados por virosis (CpGV) resultan ser los más frecuentes y problemáticos de resolver (Cossentine *et al.*, 2005; Dick, 2010). En este sentido, se plantearon dos alternativas para disminuir la incidencia del virus (CpGV) en la cría del laboratorio:

1. iniciar un pie de cría donde se desarrollan individualmente las larvas, de forma tal de eliminar a los ejemplares que presenten síntomas de virosis. Si bien este método tiene como factor limitante el hecho de que la multiplicación individual de los insectos consume muchas horas de trabajo, ha resultado beneficioso para mantener una colonia sin virus de CpGV en otros laboratorios. Este sistema ha sido adoptado exitosamente por el laboratorio de cría masiva de Mt. Albert Research Center en Nueva Zelanda (Rogers y Winks, 1993);
2. iniciar nuevas colonias con individuos de *C. pomonella* libres del virus. Para ello es necesario obtener colonias fundadoras a partir de adultos colectados de áreas reconocidas como libre de virus. En nuestro país esta alternativa es posible colectando material (larvas del último estadio) proveniente del Valle de los Antiguos, ubicado al Noreste de la provincia de Santa Cruz. Este es un valle aislado y está alejado de las principales regiones del país productoras de pomáceas, en donde los insecticidas derivados del virus CpGV son ampliamente utilizados para el control de *C. pomonella* (Altube *et al.*, 2007). También, dado que el virus CpGV es muy sensible a los rayos solares y en particular a los rayos ultravioletas (UV) (Lacey y Unruh, 2005) es posible encontrar poblaciones de *C. pomonella* sin virosis en lugares situados en la zona de la pre-cordillera, caracterizada por altas radiaciones UV.

1b) Introducción y cría del ectoparásitoide: *M. ridens*

Materiales y métodos

Esta especie fue introducida desde Estados Unidos en enero de 2005. Las pruebas de evaluación del rango de hospedadores de *M. ridens* fueron realizadas anteriormente por “United States Department of Agriculture (USDA) - Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)” en Estados Unidos. El material importado procedió de la cría de laboratorio de la Universidad de Berkeley, California, Estados Unidos y la cuarentena se realizó en IILB, IMYZA, INTA Castelar, Argentina.

El material inicial consistió en fajas de cartón corrugado con larvas de *C. pomonella* parasitadas conteniendo pupas y larvas del parasitoide. Este material fue acondicionado en jaulas de madera (40 x 35 x 32 cm), con mangas para la manipulación del material y ventanas de “voile” para la ventilación, hasta la emergencia de los adultos. Las condiciones de la cuarentena fueron: 25-27 °C de temperatura, 40-60% de humedad relativa e iluminación natural. A partir de 1 650 larvas de *C. pomonella* parasitadas emergieron 1 372 adultos del parasitoide y 8 adultos del huésped, los cuales fueron destruidos. Los adultos de *M. ridens* obtenidos fueron trasladados a jaulas de mangas de características similares a las mencionadas anteriormente. En ellas se dispuso alimento (trazas de miel en láminas de acetato) por una generación. El enemigo natural se multiplicó satisfactoriamente utilizando larvas desarrolladas de *C. pomonella* procedentes del IILB y larvas diapausantes del campo provenientes de la EEA INTA Alto Valle. Como resultado de la cuarentena no se observaron contaminantes no deseados (hiperparásitos) acompañando al enemigo natural importado. Una vez obtenida el alta cuarentenaria, la cría de *M. ridens* se mantuvo bajo condiciones controladas, obteniéndose el material necesario para realizar ensayos de laboratorio y la colonización del enemigo natural en el campo.

La cría de esta especie desarrollada en el IILB se esquematiza en la figura 1.8. Se empleó una cámara de cría a 25 ± 2 °C de temperatura, 30-70% de humedad relativa e iluminación natural. Los adultos se dispusieron en “jaulas de oviposición” que fueron construidas en madera (40 x 35 x 32 cm) y tenían mangas de tela para la manipulación del material y ventanas de “voile” para la ventilación. Por cada jaula se colocó un máximo de 150 adultos (igual proporción de hembras y de machos) obtenidos en el

transcurso de una semana, con abundante alimento y agua. El alimento consistió en trazas de miel colocadas en placas de acetato de 4 x 6 cm, que se iban renovando cada 2-3 días. El agua se suministró en bebederos plásticos (recipientes de 6 cm alto x 8,5 cm diámetro) con la tapa perforada y una tela absorbente embebida en agua.

En las jaulas de oviposición se expusieron larvas de *C. pomonella* del último estadio provenientes del laboratorio y acondicionadas en tiras de cartón corrugado (de 2 cm de ancho) plegadas en forma circular (fajas). Para la multiplicación de *M. ridens* se utilizaron larvas del huésped del último estadio no diapausantes dispuestas en cartones corrugados, ya que una vez que éstas se ubican en los orificios de los cartones limitan su desplazamiento y tejen su capullo para transformarse en pupas. Esto facilita la actividad de parasitismo por parte de las hembras del parasitoide. Por faja se colocaron 50-75 larvas del huésped y en cada jaula de oviposición se dispuso un número determinado de fajas de acuerdo con la cantidad de adultos del parasitoide presentes. Se procuró mantener una relación de 2:1 (larvas de *C. pomonella*: hembra de *M. ridens*) ya que en la bibliografía se menciona que una hembra de *M. ridens* ataca en promedio un huésped por día en condiciones de laboratorio (Bezemer y Mills, 2003).

El tiempo de exposición de las fajas fue de 2 - 3 días, luego de ese lapso fueron reemplazadas, y las fajas parasitadas fueron transferidas a jaulas de mangas de similares características a las descritas anteriormente, denominadas “jaulas de emergencia”. Las jaulas de oviposición se mantuvieron en funcionamiento por 2 semanas. En las jaulas de emergencia, al cabo de 21 - 23 días desde la exposición, comenzaron a emerger los adultos del parasitoide y cada 2 - 3 días fueron colectados y transferidos a las jaulas de oviposición para continuar con el ciclo de cría. En un lapso de 30 días las fajas con larvas del huésped fueron eliminadas. En las jaulas de emergencia también se obtuvieron adultos de *C. pomonella*, provenientes de las larvas del huésped no parasitadas, que fueron transferidos a la cría de este lepidóptero.

El desempeño del parasitoide fue monitoreado semanalmente a través del parasitismo. Por semana se seleccionaron al azar dos fajas con larvas del huésped del total de fajas expuestas y se estimó el porcentaje de parasitismo por faja según la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{cantidad larvas parasitadas}}{\text{cantidad larvas expuestas}} \times 100$$



Figura 1.8. Esquema de la cría de *M. ridens*.

Resultados y discusión

La cría de *M. ridens* en condiciones controladas se desarrolló satisfactoriamente del 2005 al 2012. Habitualmente la cría de este parasitoide se lleva a cabo con larvas de *C. pomonella* diapausantes tal como se describe en numerosos trabajos (Bezemer y Mills, 2001; Bezemer y Mills, 2003; Lacey *et al.*, 2003; Bezemer *et al.*, 2005; Hougardy *et al.*, 2005; Hougardy y Mills, 2007), pero en el IILB fue posible mantener una colonia de esta especie utilizando como huésped larvas de *C. pomonella* del último estadio, no diapausantes. El sistema de cría empleado permitió obtener adultos de *M. ridens* en aproximadamente 21-24 días. La variación en el tiempo de desarrollo especificado estaría asociada a fluctuaciones propias de la temperatura de la cámara de cría. Como

era esperable para un organismo poiquiloterma, la duración del ciclo de vida disminuyó con el aumento de la temperatura en el rango de las temperaturas registradas en la cámara de cría (rango: 23-27°C).

A partir de una exposición semanal de 500-600 larvas del último estadio de *C. pomonella* se obtuvo una producción semanal de adultos de *M. ridens* = $273,76 \pm 15,01$ hembras (media \pm error estándar) y $305,53 \pm 20,15$ machos (media \pm error estándar) (n = 66 semanas). El parasitismo semanal promedio registrado por faja fue de $43,37 \pm 2,10\%$ (media \pm error estándar) (n = 48 semanas). Cabe destacar que los valores obtenidos pueden estar subestimando el parasitismo en sentido estricto ya que para su cálculo no se consideraron las larvas del huésped que se escaparon de las fajas y las larvas muertas, las cuales podrían haber estado parasitadas.

Si bien la cantidad de adultos de *M. ridens* obtenida fue suficiente para realizar los ensayos sobre aspectos de su biología en el laboratorio y para las liberaciones a campo, surgieron inconvenientes asociados a la cría del huésped, que impidieron mantener una producción estable en el tiempo. Los inconvenientes estuvieron vinculados, entre otros factores, tanto a la cantidad como a la calidad de las larvas del huésped utilizadas para la multiplicación de *M. ridens*. Tal como se expresó anteriormente, la cría de *C. pomonella* presentó una alta incidencia del virus CpGV, lo cual afectó la supervivencia de las larvas del huésped parasitadas. Si bien para la cría del parasitoide se seleccionaron larvas del huésped en óptimas condiciones (sin síntomas aparentes de virosis en el momento de selección) se observó que luego de la exposición al parasitoide algunas de ellas presentaron síntomas asociados al virus de CpGV (hinchazón, coloración amarillenta o blanquecina y la licuefacción de los tejidos corporales). Las larvas de *M. ridens* que se desarrollaron en las larvas del huésped enfermas adquirieron una coloración oscura y no completaron su desarrollo por la muerte prematura del huésped. La infección de los huéspedes con baculovirus (ej.: CpGV) puede interferir con el desarrollo de los parasitoides, por la competencia por el recurso (huésped) entre otros factores (Lacey y Unruh, 2005; Mc. William, 2007, Lacey y Shapiro-Ilan, 2008). En otras especies de himenópteros parasitoides se observó que las hembras son capaces de discriminar y optar entre huéspedes infectados con agentes entomopatógenos y huéspedes sanos (Caballero *et al.*, 1991; Kyei-Poku y Kunimi, 1997; Stoianova *et al.*, 2004). Según Lacey *et al.* (2003) *M. ridens* es capaz de detectar a las larvas *C. pomonella* que están infectadas con nematodos entomopatógenos y sus hembras evitan dejar su descendencia en este tipo de huésped. En relación a la presencia

del virus de CpGV en la población de *C. pomonella* del laboratorio sería importante evaluar en futuros estudios el comportamiento de selección y oviposición de *M. ridens* respecto de larvas de *C. pomonella* sanas e infectadas con el virus.

1c) Introducción y cría del endoparasitoide: *A. quadridentata*

Materiales y métodos

En una etapa inicial, *A. quadridentata* fue introducida desde el laboratorio de la Universidad del Estado de Washington, Estados Unidos al Centro Nacional de Entomología de la Cruz, en Chile en 2003. Las pruebas de evaluación del rango de hospedadores de esta especie fueron realizadas por el USDA–APHIS. Superada esta etapa desde Chile se remitió material al laboratorio cuarentenario del IILB en Argentina, en febrero de 2004.

El material inicial recibido por el IILB consistió en 800 huevos parasitados por *A. quadridentata*, los cuales se dispusieron en recipientes plásticos de cría (250 cm³) con dieta artificial. La dieta utilizada fue similar a la descrita por Guenellon *et al.* (1981) para la cría de *C. pomonella*. Se monitoreó el desarrollo de los individuos hasta la emergencia de los adultos y se mantuvieron los recipientes de cría a: 25-27°C de temperatura, 40-60% de humedad relativa e iluminación natural. Las polillas emergidas fueron destruidas y los adultos de *A. quadridentata* obtenidos se mantuvieron en jaulas de cría (cajas plásticas de 55 x 30 x 35 cm con ventanas de “voile” para la ventilación y manipulación de los insectos) por una generación en las mismas condiciones. El enemigo natural se multiplicó satisfactoriamente utilizando huevos de *C. pomonella* procedentes del laboratorio del IILB y los estados inmaduros se desarrollaron en la dieta artificial mencionada anteriormente. Como resultado de la cuarentena no se observaron contaminantes (hiperparásitos) acompañando al enemigo natural importado. Una vez obtenida el alta cuarentenaria, la cría de *A. quadridentata* se desarrolló bajo condiciones controladas en las instalaciones del IILB, obteniéndose el material necesario para realizar la colonización del parasitoide en el campo y para llevar a cabo los ensayos en el laboratorio.

La cría de esta especie desarrollada en el laboratorio (figura 1.9) se realizó en una cámara de cría a 25 ± 2 °C de temperatura, 30 - 70% de humedad relativa e iluminación natural. Los adultos se dispusieron en “jaulas de oviposición” constituidas por cajas plásticas (55 x 30 x 35 cm) con ventanas de “voile” para la ventilación y manipulación de los insectos. En ellas se colocó abundante alimento y agua de la manera descrita para la cría de *M. ridens*. Por jaula se ubicó un máximo de 120 individuos obtenidos en el transcurso de una semana, que, además, fueron expuestos a papeles con huevos de *C. pomonella* (≤ 48 horas edad) durante 2 - 3 días. La cantidad de huevos del huésped por jaula se estimó en función de las hembras del parasitoide, considerándose una relación de alrededor de 20 huevos de *C. pomonella* por hembra del parasitoide. Luego de la exposición, los papeles con huevos fueron almacenados siguiendo la metodología descrita para la cría de *C. pomonella*. Una vez que los huevos alcanzaron un estado de desarrollo embrionario avanzado (HCN) y dado que no es posible diferenciar a simple vista los huevos parasitados de los no parasitados, se colocaron todos los huevos del huésped (papeles con desoves) en recipientes de cría con dieta artificial. Por recipiente se ubicó un fragmento de papel con 20 - 25 huevos siguiendo la metodología descrita para la siembra del huésped. Los recipientes de cría se dispusieron en estanterías durante el desarrollo de los estados inmaduros. Al cabo de 35 - 40 días comenzó la emergencia de los adultos de *A. quadridentata*, y a partir de ese momento los recipientes fueron transferidos a las jaulas de emergencia. Estas jaulas eran estructuras de aluminio con mallas plásticas de 140 x 62 x 50 cm con puertas, provistas de abundante alimento y agua de la forma descrita anteriormente, donde se colocaron los recipientes de cría sin tapa. Los adultos del parasitoide fueron recolectados cada 2 - 3 días y transferidos a las jaulas de oviposición para continuar el ciclo de cría. Luego de 2 meses desde la siembra los recipientes de cría fueron eliminados. De los huevos no parasitados emergieron adultos de *C. pomonella*, que se transfirieron a la cría del huésped.

El desempeño del parasitoide fue monitoreado semanalmente a través del parasitismo. Se estimó el porcentaje de parasitismo en base a los adultos obtenidos por semana según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{cantidad adultos parasitoide}}{\text{cantidad adultos parasitoide} + \text{cantidad adultos huésped}} \times 100$$

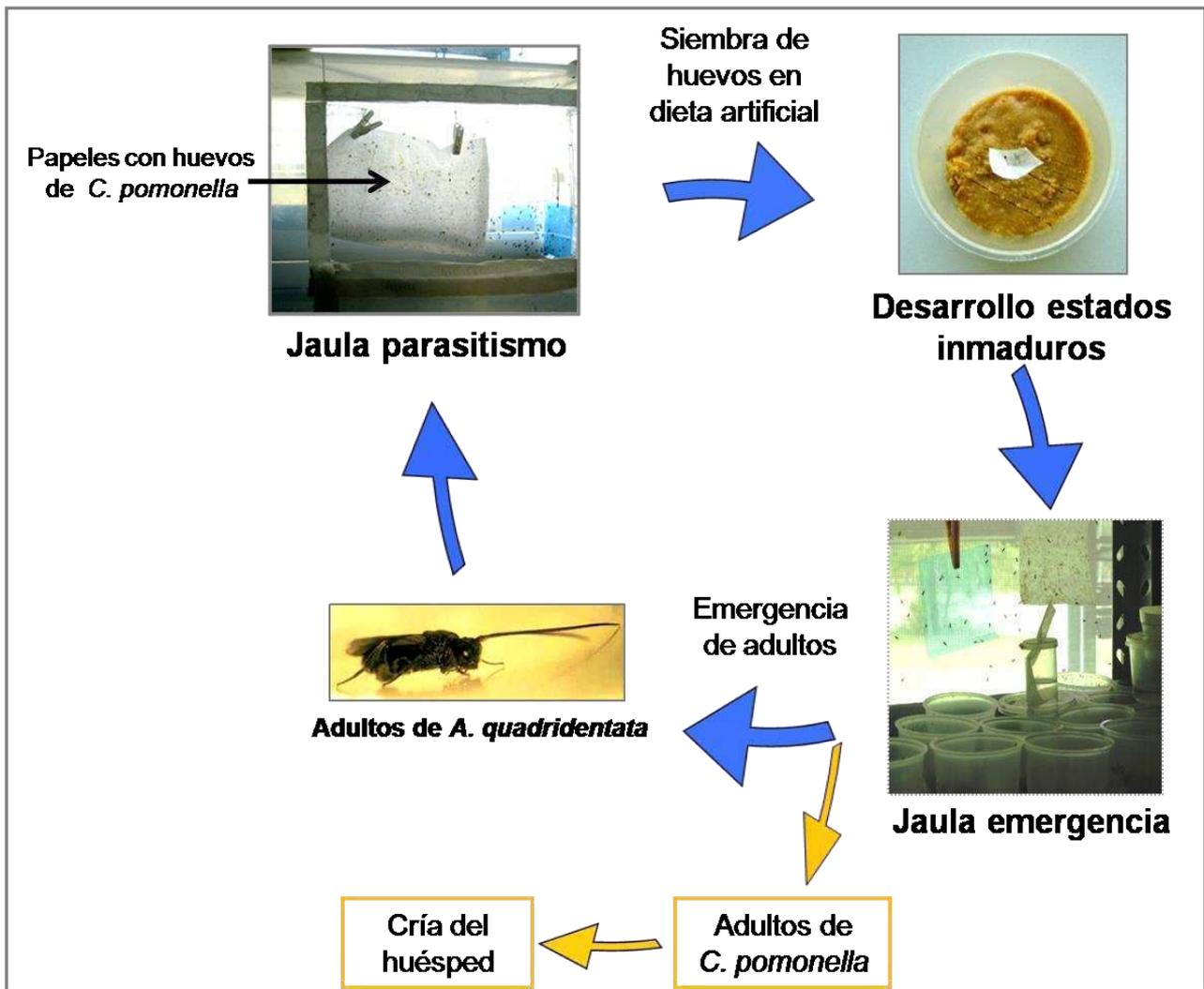


Figura 1.9. Esquema de la cría de *A. quadridentata*.

Resultados y discusión

La cría de *A. quadridentata* se llevó a cabo satisfactoriamente en condiciones controladas desde 2004 al 2012. El sistema de cría empleado posibilitó la obtención de adultos de *A. quadridentata* en aproximadamente 45 días. A los 40 - 45 días desde la siembra de los huevos del huésped se registró un pico de emergencia, la cual se extendió hasta los 60 días. Como se mencionó para *M. ridens*, la variación en los tiempos de desarrollo especificados estaría asociada a fluctuaciones de la temperatura de la cámara de cría (23 - 27°C).

A partir de la siembra semanal de 100 - 150 recipientes con dieta artificial con 20 - 25 huevos de *C. pomonella* por unidad se obtuvo una producción semanal de $414,53 \pm 24,59$ adultos (media \pm error estándar) ($n = 57$ semanas) y se registró un porcentaje de parasitismo de $58,71 \pm 2,64\%$ (media \pm error estándar). Al calcular el parasitismo en función de los adultos obtenidos no se consideraron los estados larvales que no completaron el desarrollo, los cuales podrían haber estado parasitados. A pesar de que los valores de parasitismo obtenidos superaron el 50% se registró una baja eficiencia en la producción. En base al material inicial semanal (120 recipientes de cría en promedio) se debería haber obtenido un total de 3.000 individuos (adultos de *A. quadridentata* + adultos *C. pomonella*), y los valores registrados en la cría alcanzaron en promedio un 21% de este valor ($414,53 \pm 24,59$ adultos parasitoide y $212 \pm 18,06$ adultos *C. pomonella*). Estos resultados indican que hubo una merma importante en la producción durante el desarrollo de los estadios larvales del huésped (parasitados y sin parasitar). Como se mencionó anteriormente, la alta mortalidad de los estadios larvales de *C. pomonella* estaría asociada a la presencia de virosis (CpGV). Este virus se transmite de una generación a la siguiente de madres a hijos (transmisión vertical o trans-ovárica) (Cossentine *et al.*, 2005) por lo cual si la población del laboratorio estuvo infectada con este virus es posible que una proporción de los huevos de *C. pomonella* utilizada en la cría del parasitoide también haya estado infectada con el virus. En este sentido dado que no es posible detectar los huevos del huésped infectados con el virus CpGV mediante métodos no destructivos y eliminarlos, un requisito fundamental para mejorar la producción de la cría del enemigo natural es obtener una colonia del huésped libre del virus o con una baja incidencia del mismo.

Con perspectivas hacia la implementación en la Argentina de proyectos de control biológico clásico de *C. pomonella* que involucren la multiplicación de *M. ridens* y *A. quadridentata* a gran escala es necesario optimizar, a futuro, la cría del huésped y aumentar la producción de los agentes benéficos.

Conclusiones del capítulo 1

- ✓ La elevada mortalidad registrada durante el desarrollo larval de *Cydia pomonella* (>40%) constituyó una etapa crítica para el establecimiento de una cría masiva de este lepidóptero en condiciones controladas.
- ✓ El empleo de larvas no diapausantes de *C. pomonella* fue satisfactorio para la multiplicación de *M. ridens* en el laboratorio.
- ✓ Los sistemas de cría utilizados para los EN en el laboratorio fueron exitosos y permitieron obtener material biológico para realizar los ensayos en el laboratorio y las liberaciones en el campo. Los conocimientos obtenidos se pueden emplear para el desarrollo de protocolos para la de cría a gran escala de estos enemigos naturales.

CAPÍTULO 2

Estudios biológicos sobre el
parasitoide

Ascogaster quadridentata



Introducción

El conocimiento básico de la biología y ecología de los enemigos naturales es la base sobre la cual se asienta el desarrollo de tácticas de control biológico (Van Driesche y Belows, 1996). Los parámetros poblacionales de insectos, estimados a partir de tablas de vida desarrolladas en el laboratorio, constituyen una herramienta para caracterizar a las poblaciones de enemigos naturales (Southwood, 1994). La tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r_m) considera simultáneamente el tiempo de desarrollo, la fecundidad y la supervivencia de los individuos. En general, el valor de r_m describe el crecimiento potencial de una población bajo determinadas condiciones ambientales y por tal motivo ha sido empleada con distintos propósitos: como una característica biológica que describe la rapidez con que crece una población en condiciones estipuladas, como un índice bioclimático que indica la efectividad de un parasitoide para suprimir a su huésped bajo distintas condiciones ambientales, especialmente la temperatura (Messenger, 1964) o para comparar distintas especies de enemigos naturales como posibles agentes de control de una determinada plaga (Vargas *et al.*, 2002).

Ascogaster quadridentata es un enemigo natural de *C. pomonella* que ha sido utilizado en estrategias de control biológico clásico de esta plaga (Kuhlman y Mills, 1999; Lacey y Unruh, 2005; Mills, 2005 a y b). A pesar que este parasitoide fue descrito originalmente en 1835 (Shaw 1983; Tang y Marsh, 1994), la información disponible sobre aspectos básicos de su biología es escasa (Cox, 1932; Rosemberg, 1934; Boyce ,1936) y no existen referencias bibliográficas acerca de la fecundidad y los parámetros poblacionales de esta especie.

El objetivo de este capítulo fue estimar los principales parámetros biológicos y poblacionales de *A. quadridentata* en condiciones controladas de laboratorio utilizando como huésped a *C. pomonella*.

2a) Parasitismo en los primeros días de vida

Materiales y métodos

Los individuos de *A. quadridentata* y los huevos del huésped (*C. pomonella*) utilizados en los ensayos del presente capítulo provinieron de las crías mantenidas en el Insectario de Investigaciones en Lucha Biológica (IILB). Los ensayos se condujeron en condiciones controladas en una cámara climatizada Instrumentalia® (modelo: MGC-450HPY-2) a: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 50 - 70% de HR y fotoperíodo 14:10 (L:O).

En este ensayo se evaluó el parasitismo de *A. quadridentata* con tres niveles de disponibilidad del huésped, durante los primeros tres días de vida de las hembras. Parejas de *A. quadridentata* de menos de 24 horas de vida, sin experiencia previa de parasitismo, fueron asignadas al azar a cada una de las tres densidades evaluadas: 50, 100 y 150 huevos de *C. pomonella* menores a 24 horas de edad. Para obtener las parejas de adultos del parasitoide se colectaron individuos con menos de 24 horas de emergencia y se dispusieron en una jaula plástica (25 x 35 x 32 cm) con ventanas de volie. Durante 2 a 3 horas se observó el comportamiento de los individuos, y al registrar una cópula esa pareja fue colectada y aislada en un recipiente individual hasta su empleo en el ensayo. Se realizaron cuatro réplicas por densidad del huésped. Las parejas del parasitoide fueron expuestas individualmente en recipientes de vidrio (21 cm alto x 13 cm diámetro) con tapa de “voile” (figura 2.1) con abundante alimento (trazas de miel dispuestas en acetatos de 4 x 3 cm) y agua dispuesta en bebederos plásticos (recipientes de 4 x 4 cm de diámetro con tapa perforada y un trozo de tela absorbente embebida en el agua). En cada unidad experimental se ubicó un trozo de papel con los huevos del huésped con una de las tres densidades evaluadas, los cuales fueron dispuestos con un alfiler en trozos de telgopor suspendidos por un hilo (figura 2.1). Los papeles con desoves fueron renovados cada 24 h durante los primeros tres días de vida de las hembras. Se registró diariamente la cantidad de huevos del huésped parasitados mediante la disección de los mismos. Los huevos de *C. pomonella* fueron almacenados en un freezer Gafa® hasta su disección, que se realizó empleando una lupa binocular y utilizando una gota de solución fisiológica como diluyente. Se estimó el parasitismo, definido como la cantidad de huevos del huésped parasitados por hembra por día.

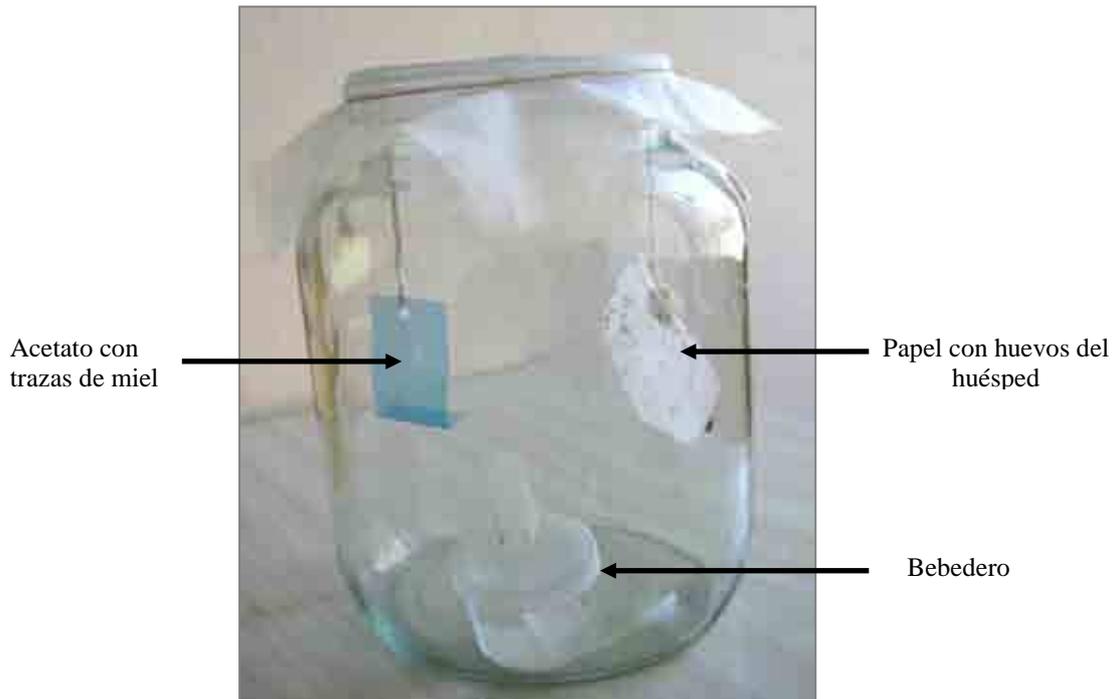


Figura 2.1 Recipiente de vidrio utilizado para evaluar el parasitismo de *A. quadridentata*.

Resultados y discusión

El parasitismo de *A. quadridentata* en función de la edad de las hembras aumentó a partir del segundo día de vida en las tres densidades evaluadas (figura 2.2). Se registró una gran variabilidad en la cantidad de huéspedes parasitados entre individuos. El parasitismo medio de las hembras en el primer día de vida tuvo valores entre 3 y 9,5 huevos parasitados/♀/día para las densidades de 150 y 50 huevos, respectivamente. Mientras que en las hembras de dos días de edad se registraron valores de parasitismo medio entre 20 y 36 huevos parasitados/♀/día para las densidades de 150 y 100 huevos, y en las hembras de tres días valores entre 23,5 y 31,5 huevos parasitados/♀/día para las densidades de 150 y 50 huevos, respectivamente. En todas las densidades del huésped evaluadas la cantidad de huevos parasitados por hembra por día fue inferior a 50 huevos del huésped, registrándose un máximo de 44 huevos parasitados/♀/día. Se detectaron eventos de superparasitismo (más de un huevo del parasitoide por huevo del huésped) en todas las densidades evaluadas, con un porcentaje cercano al 5% de los huevos del huésped superparasitados.

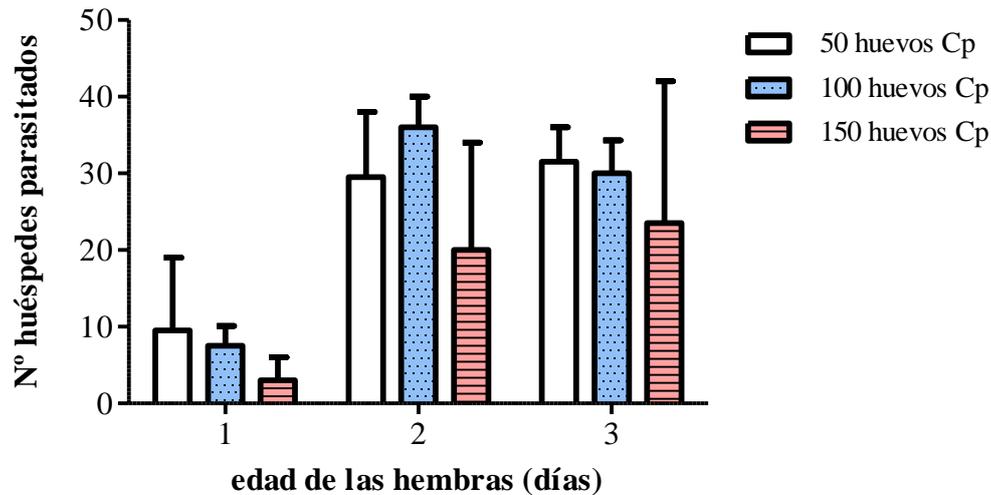


Figura 2.2. Huevos de *C. pomonella* parasitados por *A. quadridentata* (media + error estándar) para diferentes densidades ofrecidas del huésped.

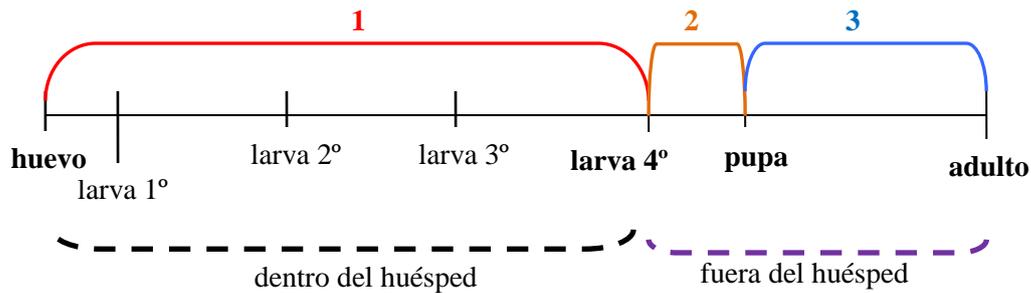
El parasitismo puede ser estimado a través de diferentes métodos, entre ellos está el método de cría del huésped, que implica mantener y alimentar al huésped en un sustrato hasta que el parasitoide complete su desarrollo y emergen los adultos. Este método presenta la ventaja de permitir identificar factores de mortalidad del huésped como “*host-feeding*” y la mortalidad asociada a la inserción del ovipositor en el huésped registrada en algunas especies de parasitoides. Otro método ampliamente utilizado es la disección del huésped, en el que es posible detectar los huevos y las larvas del parasitoide al realizar la disección del huésped bajo lupa o microscopio. Con este último método es posible evitar la mortalidad del huésped vinculada a enfermedades y a la manipulación del material durante el proceso de cría (Day, 1994). Inicialmente se realizaron ensayos preliminares para estimar el parasitismo de *A. quadridentata* a través del método de cría de *C. pomonella*, pero se observó una alta mortalidad del huésped durante el proceso de cría y no se obtuvieron resultados. Debido a ello, en el presente ensayo se utilizó el método de disección de los huevos del huésped.

A partir de los resultados obtenidos en este ensayo se fijó que la densidad del huésped correspondiente a 60 huevos por día constituye una densidad adecuada (“*ad libitum*”) para los estudios de fecundidad, en tanto supera ampliamente el máximo valor de parasitismo diario registrado para esta especie en condiciones de laboratorio.

2b) Tiempo de desarrollo de los estados inmaduros

Materiales y métodos

Se estimó el tiempo de desarrollo de los estadios inmaduros de *A. quadridentata* que transcurren fuera del huésped en condiciones controladas de laboratorio. Se expusieron quince grupos de cuatro hembras fecundadas de menos de 72 horas de vida, sin contacto previo con el huésped a 60 huevos de *C. pomonella* durante cuatro horas para obtener huevos del huésped parasitados. Posteriormente, los huevos del huésped fueron incubados a 25 ± 2 °C en recipientes herméticos hasta que completaron el desarrollo embrionario. Luego, las larvas neonatas de *C. pomonella* fueron transferidas individualmente a recipientes de 15 cm³ con una capa homogénea de 0,5 cm de dieta artificial en base a agar-agar similar a la descrita anteriormente para la cría del parasitoide. A los 25 días, cuando el huésped alcanzó el último estadio larval se seleccionaron las larvas que estaban parasitadas (identificadas por su menor tamaño) (Cox, 1932). Cada larva se colocó en una caja de Petri de 5,5 cm de diámetro con una tira de cartón corrugado (3 x 2cm) como sustrato inerte para tejer el capullo. Diariamente se observó cada individuo hasta la emergencia de los adultos. Según el criterio de Cox (1932), se registraron los siguientes eventos: 1- la salida al exterior del cuarto estadio larval de *A. quadridentata*, 2- la expulsión del material intestinal acumulado en forma de meconio en la prepupa y 3- la emergencia de los adultos. Además, en los ejemplares adultos se identificó el sexo. Con los datos obtenidos se estimó el tiempo de desarrollo de los estados inmaduros descritos en la figura 2.3.



1. Tiempo de desarrollo desde el estado de huevo hasta la salida al exterior del cuarto estadio larval. Cuando la larva del tercer estadio muda, cambia de hábito y sale del interior del huésped.
2. Tiempo de desarrollo desde la larva cuarto estadio hasta la prepupa. La larva del cuarto estadio una vez que sale del interior del huésped se alimenta externamente del mismo, luego teje el capullo (prepupa) y con la expulsión del meconio se transforma en pupa.
3. Tiempo de desarrollo de la pupa.

Figura 2.3. Ciclo de vida de *A. quadridentata*, donde se indica el tiempo de desarrollo de los estados del ciclo registrados en el ensayo.

Análisis estadístico: Se compararon las variables del tiempo de desarrollo de los estados del ciclo de vida entre sexos. La duración del ciclo de vida (huevo - adulto), el tiempo de desarrollo desde huevo a larva del cuarto estadio (1), previa transformación de los datos ($\log(x+1)$) (Sokal, 1981) y el tiempo de desarrollo de pupa (3) fueron analizados a través de una prueba t-Student. El tiempo de desarrollo de la larva cuarto estadio a prepupa (2) fue evaluado mediante la prueba no paramétrica de Man-Whitney U por no cumplirse el supuesto de normalidad del ANOVA (Lilliford, $p < 0,05$). Se consideró en todas las pruebas un $\alpha = 5\%$ y se usó el programa Statistica (Stat Soft, 2000).

Resultados y discusión

La figura 2.4 muestra los eventos registrados en el desarrollo de los estados inmaduros de *A. quadridentata* que transcurren fuera del huésped. El tiempo de desarrollo de los estados inmaduros de machos y hembras fue similar, no se hallaron diferencias significativas para ninguno de los parámetros evaluados entre ambos sexos (tabla 2.1.). La duración promedio del ciclo de vida de *A. quadridentata* fue de $43,05 \pm 0,77$ días (media \pm error estándar) y la fase de desarrollo que transcurre dentro del huésped

(huevo hasta larva cuarto estadio) comprendió más del 70% de la duración del ciclo de vida.



Figura 2.4. Estados inmaduros de *A. quadridentata* posteriores a la salida del interior del huésped. **A-** larva del cuarto estadio saliendo del extremo posterior del huésped, **B-** larva del cuarto estadio alimentándose externamente de la larva de *C. pomonella*, **C-** larva del cuarto estadio que consumió completamente al huésped, **D-** pupa con ojos imaginales visibles (flecha roja) y donde se observa el meconio (flecha violeta), **E-** pupa avanzada donde se observan partes esclerotizadas de color oscuro y **F-** larva del cuarto estadio en su capullo (prepupa).

Tabla 2. 1. Duración en días de los estadios inmaduros (media \pm error estándar) para hembras y machos de *A. quadridentata*.

Estado de desarrollo	Hembras (n = 14)	Machos (n = 15)
Huevo a larva cuarto estadio (1)	33,53 \pm 1,15 a	31,03 \pm 0,63 a
Larva cuarto estadio-prepupa (2)	2,33 \pm 0,20 a*	2,60 \pm 0,19 a*
Pupa (3)	8,73 \pm 0,48 a	8,02 \pm 0,36 a
Ciclo de vida	44,59 \pm 1,30 a	41,64 \pm 0,71 a

Medias seguidas por letras iguales en las filas no difieren significativamente (a- prueba t-Student $p > 0,05$, y a*Man-Whitney U, $p > 0,05$).

El tiempo de desarrollo de huevo a adulto registrado en esta investigación se encuentra dentro del rango de los valores hallados para esta especie sobre el mismo huésped criado en manzanas a 26,6 °C (rango valores: 35 a 48 días) (Cox, 1932). Sin embargo, fue mayor al registrado por otros autores para la misma especie sobre *Grapholita molesta* criada en manzanas en condiciones de laboratorio a 26,6 °C, con valores inferiores a los 36 días (Cox, 1932; Boyce, 1936). Asimismo, el tiempo de desarrollo de *A. quadridentata* resultó superior a los valores mencionados por otros autores para dos especies de parasitoides de la misma tribu en condiciones experimentales similares. Para *Chelonus* sp. nr. *curvimaculatus* (Hymenoptera: Braconidae) criada sobre *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) a 25 °C se mencionan valores de tiempo de desarrollo de huevo a adulto de 27 días para los machos y 29 días para las hembras (Hentz *et al.*, 1998), y en el caso de *Chelonus blackburni* (Hymenoptera: Braconidae) criada sobre el mismo huésped se citan valores similares, de alrededor de 30 días (Jackson *et al.*, 1978).

En términos generales los valores aquí registrados para el tiempo de desarrollo de *A. quadridentata* fueron similares o mayores a los hallados para esta especie en la bibliografía. Cabe destacar que el tiempo de desarrollo de un endoparasitoide puede verse influido por la temperatura y la especie de huésped en la que se desarrolla (Jackson *et al.*, 1978; Hentz *et al.*, 1998; Zenil *et al.*, 2004).

2c) Longevidad, supervivencia y fecundidad del adulto

Materiales y métodos

Quince parejas de adultos de menos de 24 horas de vida y sin experiencia previa de parasitismo fueron asignadas al azar a cada una de las siguientes condiciones: agua (condición A), agua + alimento (condición B) y agua + alimento + huésped (condición C). Las parejas fueron colocadas en las unidades experimentales descriptas anteriormente. Siguiendo la metodología detallada en el apartado 2^a, el alimento y el huésped fueron renovados diariamente hasta la muerte de la última hembra en las condiciones B y C según correspondiera. En la condición C se expusieron 60 huevos de *C. pomonella* menores de 24 horas de edad y los papeles con desoves fueron renovados cada 24 h hasta la muerte de la última hembra. Diariamente se registró la cantidad de hembras vivas y en la condición C se registró además la cantidad de huevos colocados por hembra a través de la disección de los huevos del huésped.

A partir de los datos obtenidos se estimaron los siguientes parámetros:

1. Longevidad: días transcurridos desde la emergencia de la hembra hasta su deceso.
2. Supervivencia por edades (l_x): proporción de hembras vivas de una cohorte inicial que sobrevive hasta la edad x (expresada en días).
3. Fecundidad específica por edades (m_x): huevos colocados por una hembra de edad x por día.
4. Parasitismo: número de huevos del huésped parasitados por hembra por día.

Análisis estadístico: la longevidad y las curvas de supervivencia fueron analizadas por separado para cada sexo. La longevidad se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis por no cumplirse los supuestos del ANOVA y las medias se compararon con la prueba de comparaciones múltiples por rangos medios derivada de la prueba de Kruskal-Wallis. Las curvas de supervivencia fueron caracterizadas utilizando el método de Kaplan-Meier y para compararlas se utilizó la prueba de Cox-F test. Este análisis fue elegido por ser el más adecuado para los datos obtenidos (número bajo de réplicas y sin datos “censored”). Se consideró en todas las pruebas un $\alpha = 5\%$ y se usó el programa Statistica (Stat Soft, 2000).

Resultados y discusión

La **longevidad** fue mayor en las hembras que tuvieron alimento (condiciones B y C), con valores cercanos a los 9 días, en comparación con las hembras sin alimento (condición A), con valores de aproximadamente 3 días ($H_{2,32} = 14,60$, $p = 0,0007$). En los machos la longevidad fue mayor en los individuos con alimento y agua (condición B) respecto de los que no tuvieron alimento (condición A), pero no se observaron diferencias significativas en la longevidad de los machos con presencia del huésped y los individuos en las otras dos condiciones evaluadas (condiciones A y B) ($K-W: H_{2,32} = 115,49$, $p = 0,004$) (tabla 2.2).

Tabla 2.2. Longevidad de hembras y machos de *A. quadridentata* en distintas condiciones experimentales (media \pm error estándar).

Condición (n)	Hembras	Machos
A- con agua (12)	2,92 \pm 0,18 a	2,75 \pm 0,18 a
B- con agua y alimento (11)	8,82 \pm 1,76 b	9,82 \pm 1,78 b
C- con agua, alimento y huésped (9)	9,55 \pm 2,22 b	5,89 \pm 1,83 ab

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre condiciones para cada sexo (prueba de comparaciones múltiples de los rankings medios, $p < 0,05$).

La longevidad y la supervivencia (curva de supervivencia) son dos parámetros biológicos que expresan la mortalidad de una especie, la longevidad promedio indica la edad promedio que puede alcanzar un individuo al morir mientras que la curva de supervivencia refleja el patrón de mortalidad de la población a lo largo de las sucesivas edades (Rabinovich, 1980). Estos parámetros son característicos de cada especie, y pueden verse afectados por diversos factores como el tamaño del adulto, la calidad del huésped, el tipo de alimentación y la temperatura y humedad del ambiente (Jervis y Kidd, 1996). Si bien los datos bibliográficos no son estrictamente comparables con los obtenidos en este trabajo, ya que las condiciones experimentales fueron disímiles y las especies evaluadas y los huéspedes utilizados no fueron los mismos, a modo orientativo se presenta en la tabla 2.3 los valores de longevidad registrados por otros autores para *A. quadridentata* y otras especies emparentadas bajo diversas condiciones experimentales.

La longevidad de las hembras de *A. quadridentata* con alimento (condiciones B y C) aquí registrada resultó similar a la obtenida para esta especie con agua y alimento en condiciones de semi-campo con temperaturas variables (15 - 29 °C), pero resultó inferior a los valores hallados también para las hembras con agua y alimento en condiciones de laboratorio a temperaturas menores a las del presente estudio (21 y 22 °C) (Cox, 1932; Boyce, 1936) (tabla 2.3). Los valores de longevidad citados para especies de braconidos emparentadas con *A. quadridentata* (tabla 2.3) muestran que la longevidad de las hembras obtenida en este estudio en presencia de alimento (condiciones B y C) fue similar a la hallada por Kainoch (1982) y Honda y Kainoch (1998) para las hembras de *A. reticulatus* con agua, alimento y huésped a la misma temperatura. También fue similar a los valores mencionados para dos especies de la misma tribu del género *Chelonus* en presencia de alimento y huésped (Jackson *et al.*, 1978; Hentz *et al.*, 1998). No obstante, resultó menor que los valores citados por otros autores para especies de la misma subfamilia de braconidos en diversas condiciones ambientales, los cuales mencionan valores de longevidad superiores a los 30 días (Abdel-Malek, 1947; Subba Rao y Gowda, 1961; Moreno Mari y Jiménez Peydro, 1992). Por último, la longevidad de las hembras de *A. quadridentata* solo con agua aquí registrada resultó marcadamente menor a la hallada en otra especie de braconido de la misma tribu (*Chelonella Sulcata*) a una temperatura variable entre 20 y 28 °C (Abdel-Malek, 1947).

La longevidad de los machos de *A. quadridentata* con agua y alimento obtenida en el presente trabajo, fue similar a la citada para la especie en condiciones de semi-campo con temperaturas variables (Cox, 1932), mientras que fue menor a la mencionada por Cox (1932) y Boyce (1936) para los machos en estudios de laboratorio a temperaturas inferiores (tabla 2.3). Asimismo, la longevidad de los machos con alimento y huésped resultó marcadamente menor a la registrada por otros autores para especies de la misma tribu en condiciones experimentales similares (Subba Rao y Gowda, 1961; Hentz *et al.*, 1998).

Tabla 2.3. Longevidad y fecundidad acumulada de especies de parasitoides ovo-larvales pertenecientes a la familia Braconidae registrados por otros autores.

Parasitoide	Subfamilia (tribu)	Huésped	Longevidad (días)	Fecundidad acumulada	Condiciones ambientales	Autores
<i>Ascogaster quadridentata</i>	Cheloninae (Chelonini)	<i>Cydia pomonella</i>	♀: 13 (semi-campo), ♀: 31 (lab.) ♂: 11 (semi-campo) ♂: 22 (lab.) con agua y alimento	/	semi-campo (15 a 29 °C) y lab. (22 °C)	Cox, 1932
<i>Ascogaster quadridentata</i>	Cheloninae (Chelonini)	<i>Cydia pomonella</i>	♀: 33 - 60 ♂: 39 - 50 con agua y alimento	/	21 °C	Boyce, 1936
<i>Ascogaster reticulatus</i>	Cheloninae (Chelonini)	<i>Adoxophyes</i> sp.	♀: 12 ± 1,5 con agua y alimento	/	25 ± 1 °C, 20 - 60%HR, 18:6(L:O)	Honda y Kainoch, 1998
<i>Ascogaster reticulatus</i>	Cheloninae (Chelonini)	<i>Adoxophyes</i> sp.	♀: 11,4 con agua, alimento y huésped	706 huevos/♀ (rango: 457 - 919)	25 ± 1 °C, 30 - 50%HR, 16:8(L:O)	Kainoch, 1982
<i>Chelonus blackburni</i>	Cheloninae (Chelonini)	<i>Pectinophora gossypiella</i>	♀: 11,6 ± 2,91 con agua, alimento y huésped	909,43 ± 118,1 huevos/♀	T variable (25 a 41 °C), 45 - 65%HR, 15:9(L:O)	Jackson <i>et al.</i> , 1978
<i>Chelonus curvimaculatus</i>	Cheloninae (Chelonini)	<i>Pectinophora gossypiella</i>	♀: 12,2 ± 3,6 ♂: 14,2 ± 6,7 con agua, alimento y huésped	925 huevos/♀	25 °C, 16:8 (L:O)	Hentz <i>et al.</i> , 1998
<i>Chelonella Sulcata</i>	Cheloninae (Chelonini)	<i>Ephestia kuehniella</i>	31- con agua y alimento 7- con agua	/	T variable (20 a 28°C)	Abdel-Malek, 1947
<i>Chelonus rufus</i>	Cheloninae (Chelonini)	<i>Corcyra cephalonica</i>	♀: 37 - 51 ♂: 13 - 25 HR: 45 a 90% con agua, alimento y huésped	229 - 955 huevos/♀ HR: 45 a 90%	25 °C, HR variable 0:24 (L:O)	Subba Rao y Gowda, 1961
<i>Phanerotoma ocularis</i>	Cheloninae (Phanerotomini)	<i>Ephestia kuehniella</i>	♀: 52,21 ± 11,39 días con agua, alimento y huésped	/	25 °C; 60 - 70%HR, 16:8(L:O)	Moreno Mari y Jiménez Peydro, 1992

La curva de **supervivencia** (l_x) de las hembras sin y con alimento (condiciones B y C) resultó diferente (condiciones B y C) (Cox-F test: $F_{A-B} (22, 24) = 4,30, p = 0,00039$; $F_{A-C} (18, 24) = 3,24, p = 0,00398$; $F_{B-C} (18, 22) = 1,09, p = 0,14452$) (figura 2.5.A). Las hembras sin alimento presentaron una supervivencia menor a los 6 días y el 50% de las hembras ($l_x (50)$) permaneció vivo hasta el 3^{er} día de edad (tabla 2.4). Mientras que la supervivencia de las hembras con alimento se extendió por más de 20 días, observándose que el 50% de las hembras permaneció con vida hasta el 8^{vo} y 6^{to} día en las condiciones B y C, respectivamente. Asimismo, en los machos también se observó que la curva de supervivencia de los individuos sin alimento resultó diferente de las de adultos con alimento (condiciones B y C) (Cox-F test: $F_{A-B} (22, 24) = 4,37, p = 0,00034$;

$F_{A-C (18, 24)} = 2,25, p = 0,03222$; $F_{B-C (18, 22)} = 1,96, p = 0,07461$) (figura 2.5.B). Los machos sin alimento tuvieron una supervivencia menor a los 6 días de edad, mientras que en los machos con alimento la supervivencia fue mayor a los 16 días.

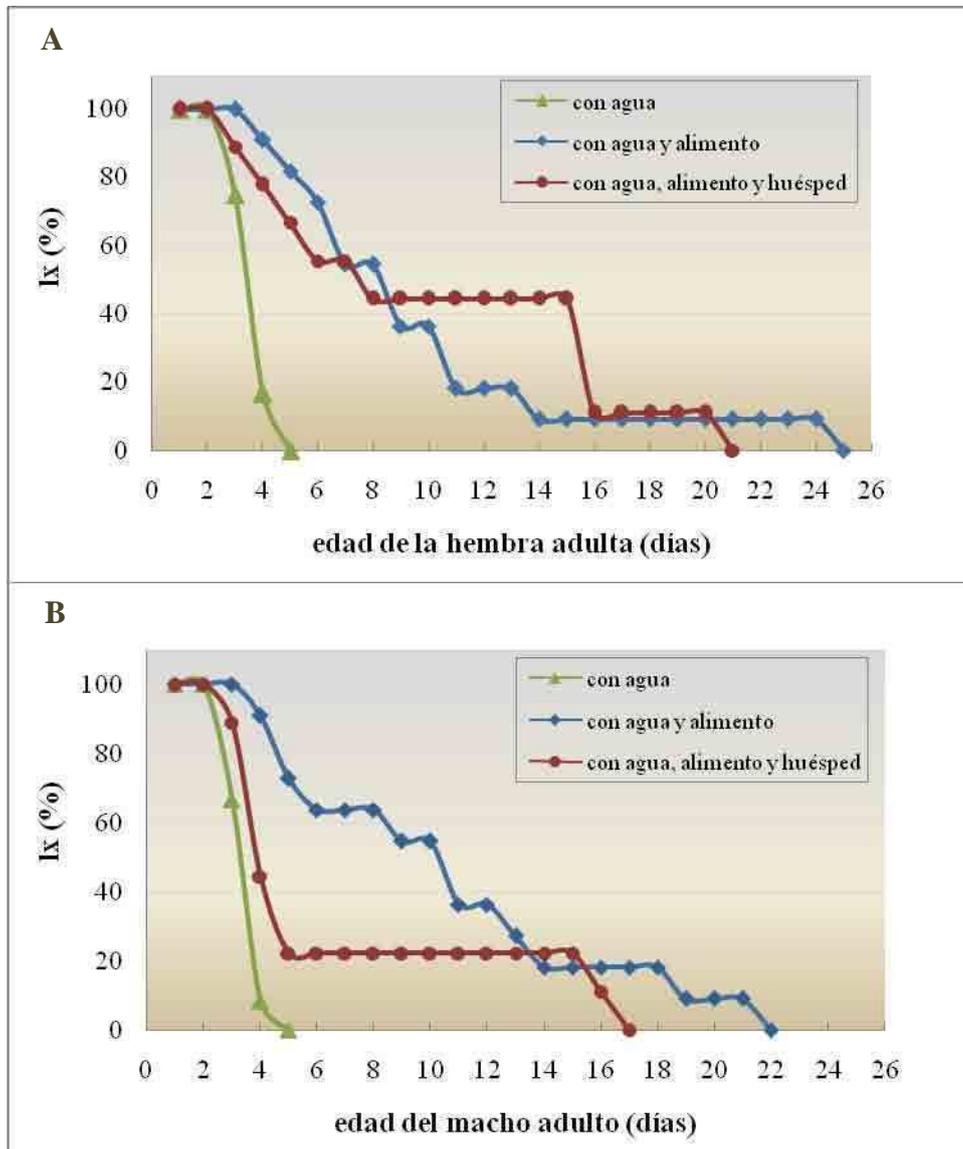


Figura 2.5. Curvas de supervivencia media diaria (Ix) de los adultos de *A. quadridentata*. **A-** hembras; **B-** machos.

Tabla 2.4. Edad de las hembras y machos de *A. quadridentata* en días correspondientes a los cuartiles 25, 50 y 75 de la supervivencia. Estimación por método de límite-producto de Kaplan-Meier.

	Hembras			Machos		
	condición A	condición B	condición C	condición A	condición B	condición C
Lx ₍₇₅₎	2	5	3,25	2	4	3
Lx ₍₅₀₎	3	8	6	3	9	3
Lx ₍₂₅₎	3	10	15	3	12,25	4

Considerando las diferencias registradas en la longevidad media de las hembras y teniendo en cuenta que el valor de la supervivencia del 50% de las hembras en presencia de alimento fue igual o mayor al doble del valor en las hembras sin alimento (tabla 2.4) se manifiesta, como era esperable, la importancia de disponer de una fuente de alimento que proporcione hidratos de carbono para incrementar la supervivencia de las hembras. La gran mayoría de los parasitoides adultos requiere de alimentos ricos en azúcares, como el néctar o la miel, como principal fuente de energía (Wäckers *et al.*, 2008). La alimentación con azúcares por lo general se asocia a un aumento en la longevidad de machos y hembras y a menudo se correlaciona positivamente con una mayor fecundidad en las hembras (Siekman *et al.*, 2001; Wäckers *et al.*, 2008). La disponibilidad de alimento puede tener un profundo efecto sobre la dinámica poblacional del sistema parasitoide-huésped, favoreciendo el desempeño (extendiendo la vida reproductiva de las hembras) y propiciando el establecimiento de los parasitoides (Wäckers, 2003). En tal sentido, el suplemento de miel como alimento para los adultos en la cría de *A. quadridentata* en el laboratorio es de suma importancia para aumentar su supervivencia y optimizar el rendimiento de la cría. Además, la disponibilidad de fuentes de alimento adecuadas para los adultos es un factor que debe considerarse en el momento de liberar a los parasitoides adultos en el campo.

En *A. quadridentata* el comportamiento de oviposición en las hembras se manifestó desde el primer día de vida (figura 2.6). La **curva de fecundidad** (m_x) mostró una fecundidad variable pero continua hasta la muerte de los adultos, observándose tres picos máximos de oviposición a los 8, 11 y 13 días de vida con valores superiores a los 30 huevos/hembra/día. La fecundidad diaria promedio fue de $22,27 \pm 4,73$ huevos/hembra/día. Es importante destacar que si bien los valores máximos de

oviposición se registraron entre los 6 y 15 días de vida de las hembras, solo el 25% de las hembras sobrevivió hasta la edad de 15 días, y a la edad en que el 75% de las hembras aún vivía solo se alcanzó aproximadamente el 20% de la fecundidad acumulada ($\sum m_x$). Esto sugiere que las hembras llegan a expresar un bajo porcentaje de su potencial reproductivo.

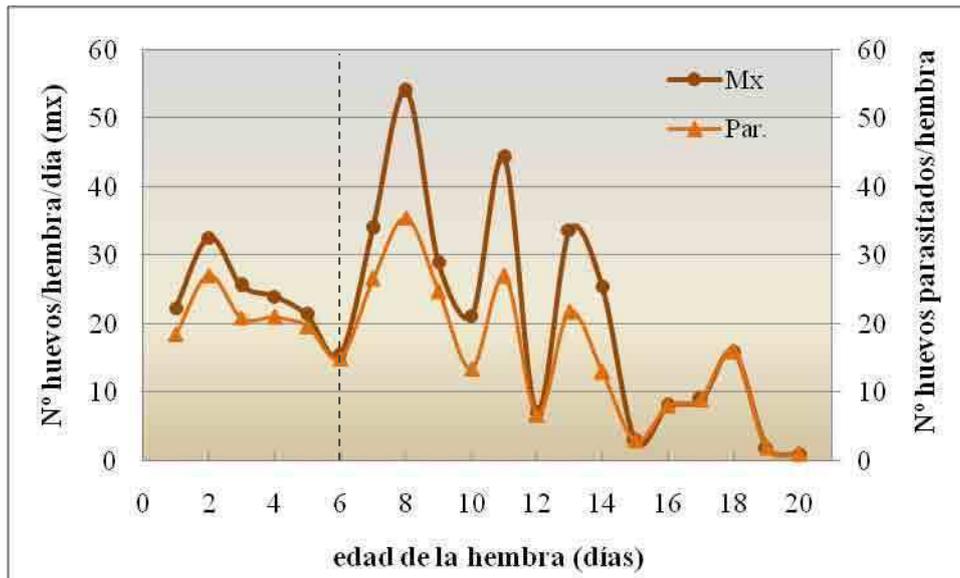


Figura 2.6. Curva de fecundidad específica por edades (m_x) (línea marrón) y parasitismo medio diario (línea naranja) de *A. quadridentata*. La línea vertical punteada indica la supervivencia del 50% de los individuos ($l_{x(50)}$).

La **fecundidad total** (definida como la cantidad de huevos que coloca una hembra a lo largo de su vida) fue de $262,1 \pm 85,24$ huevos/hembra (media \pm error estándar), y se observó una gran variabilidad entre las hembras estudiadas (rango: 40 - 640 huevos/hembra). El único antecedente que existe para esta especie en relación a la fecundidad de una hembra a lo largo de su vida corresponde a la mención de Cox (1932) de la cantidad de huevos presentes en los ovarios cuando emergen las hembras, con un valor de 360 huevos en promedio. El valor presentado por Cox (1932) representa el valor de fecundidad potencial, es decir, la cantidad máxima de huevos que puede potencialmente dejar una hembra, mientras que el valor aquí obtenido corresponde a la fecundidad realizada, es decir la cantidad de huevos que en efecto deja una hembra (Jervis y Kidd, 1996). Entonces, es razonable que el valor aquí obtenido resulte menor al

citado por Cox (1932). El valor de fecundidad total de *A. quadridentata* obtenido en el presente estudio se encuentra en el rango de los valores mencionados para *Chelonus rufus* Lyle (Braconidae: Chelonini) en condiciones experimentales similares (Subba Rao y Gowda, 1961), pero fue menor a los valores citados para especies de la misma tribu, como *A. reticulatus*, *C. blackburni* y *C. curvimaculatus*, con valores superiores a 700 huevos/hembra (Jackson *et al.*, 1978; Kainoch, 1982; Hentz *et al.*, 1998) (tabla 2.3).

El **parasitismo** (nº de huevos del huésped parasitados por hembra) en función de la edad de las hembras produjo una curva semejante a la curva de fecundidad (definida como huevos que pone una hembra por día), pero con valores menores (figura 2.6). La curva de parasitismo presentó un valor máximo de $35,5 \pm 8,15$ huéspedes parasitados/hembra/día a los 8 días de vida de las hembras. El parasitismo diario medio fue de $17,53 \pm 2,88$ (media \pm error estándar) huéspedes parasitados/hembra/día y el número de huéspedes parasitados en promedio a lo largo de la vida de las hembras fue de $202,8 \pm 59,24$ (media \pm error estándar) huéspedes parasitados/hembra. Los menores valores observados en la curva de parasitismo respecto de la curva de fecundidad se debieron a que se registraron eventos de superparasitismo⁵. El $11,11 \pm 1,91\%$ (media \pm error estándar) de los huevos expuestos simultáneamente estuvieron superparasitados, y se observó un máximo de 6 huevos del parasitoide por huevo del huésped.

El superparasitismo es un comportamiento que se observa frecuentemente en la naturaleza. En los parasitoides solitarios, un solo adulto emerge por huésped, y en un huésped superparasitado, del total de individuos presentes logrará sobrevivir un único individuo del parasitoide (Salt, 1934). Las explicaciones acerca de la existencia de este tipo de comportamiento se basan en que éste puede representar una ventaja para el endoparasitoide cuando dos o más huevos del parasitoide en un mismo huésped aumentan la probabilidad de obtener descendencia. Una situación en que esto ocurre es cuando el huésped es capaz de encapsular a los huevos del parasitoide, y el parasitoide se beneficia al dejar dos o más huevos, en tanto esto le permite saturar el sistema de defensa del huésped (encapsulamiento). Así, al menos uno de sus huevos sobrevivirá a expensas de los otros. También es posible que un parasitoide deje dos o más huevos en un huésped aumentando la probabilidad de que uno de su propia descendencia derrote a un superparasitoide (Bakker *et al.*, 1985; van Alphen y Visser, 1990; Godfray, 1994). Al

⁵ El superparasitismo se refiere al comportamiento de oviposición de las hembras parasitoides que ponen sus huevos en un huésped previamente parasitado por la misma hembra o por otra de la misma especie (Godfray, 1994).

mismo tiempo, existen factores que pueden afectar el comportamiento de selección del huésped asociado a la capacidad de discriminar entre huéspedes parasitados y no parasitados, como el tiempo transcurrido entre las oviposiciones (Visser *et al.*, 1992), la cantidad de hembras presentes en el parche de huéspedes (Gates, 1993) y la densidad del huésped (Salt, 1934). La capacidad para discriminar entre huéspedes parasitados y no parasitados es un fenómeno que se observa comúnmente en los parasitoides himenópteros (Salt, 1934). Esta capacidad está asociada a la presencia de feromonas de marcación. Las hembras de los parasitoides depositan feromonas en el área de oviposición (marcación del área), en la superficie del huésped (marcación externa) o dentro del huésped (marcación interna). La marcación se realiza antes, durante y después de la oviposición para evitar que ocurran eventos de superparasitismo (Kainoch, 1999). En sus estudios experimentales acerca del superparasitismo y la aceptación del huésped en *Trichogramma evanescens* (Westw.) (Hymenoptera: Trichogrammatidae), Salt (1937) postuló que esta especie es capaz de distinguir entre huéspedes parasitados y no parasitados a través de señales que dejan las hembras sobre el huésped, las cuales son compuestos volátiles que desaparecen gradualmente con el tiempo, y a través de señales internas del huésped que las hembras detectan con el ovipositor. En particular, para *A. quadridentata* se registraron casos de superparasitismo en condiciones de laboratorio (Cox, 1932; Rosembreg, 1934), pero, sin embargo, no ha sido estudiado el comportamiento asociado a la selección del huésped y el superparasitismo.

Dadas las condiciones de esta investigación, en el marco de la cual la cantidad de huevos del huésped utilizada fue en exceso, y las hembras estuvieron aisladas (sin interferencia mutua), es posible suponer que los eventos de superparasitismo registrados estén asociados al hecho de que durante el período de exposición del huésped (24 horas) las señales externas de marcación ligadas al parasitismo se disiparon con el tiempo. Este hecho influyó en la habilidad de las hembras para discriminar entre huéspedes parasitados y no parasitados. En esta dirección, Rosembreg (1934), al estudiar algunos pocos individuos aislados, observó que las hembras de esta especie no oviponen en un huevo previamente parasitado por la misma hembra hasta que transcurre un corto período de tiempo (menor a una hora), por lo que sugiere que las señales de marcación de esta especie se disipan rápidamente.

Finalmente un factor intrínseco importante para el éxito de un agente de control biológico, es su capacidad reproductiva. El número de huevos que deja una hembra del

parasitoide es un atributo biológico significativo. Sin embargo, para el empleo de parasitoides en programas de control biológico un dato más representativo, especialmente en parasitoides solitarios, es la cantidad de huéspedes que es capaz de parasitar una hembra. Dado que no existían datos sobre la capacidad reproductiva de *A. quadridentata* la información obtenida en este trabajo acerca del patrón de parasitismo en función de la edad de las hembras fue un aporte sustancial al conocimiento de la biología de la especie. Además, permitió ajustar las densidades del huésped utilizadas en la cría en el laboratorio (proporción del número de huevos del huésped por hembra de *A. quadridentata*) para obtener una producción más eficiente.

2d) Parámetros poblacionales

Materiales y métodos

Ascogaster quadridentata es un endoparasitoide solitario (Cox, 1932), por lo tanto solo sobrevive un individuo del parasitoide independientemente de la cantidad de huevos que la hembra coloca en un huésped. Por este motivo, para el cálculo de los parámetros poblacionales que involucran la fecundidad (m_x) se consideraron los valores obtenidos de parasitismo, definido como el número de huéspedes parasitados por hembra por día. Debido a que no existen antecedentes bibliográficos sobre la mortalidad de los estados inmaduros del parasitoide y la estimación de estos parámetros no pudo efectuarse en el presente trabajo, se asumió que no hubo mortalidad en los estados inmaduros. A partir de los datos obtenidos en la secciones 2b) y 2c) se confeccionó una tabla de vida y se estimaron los siguientes parámetros poblacionales (Rabinovich, 1980):

- ✓ La tasa neta reproductiva o tasa de reemplazo (R_0) refleja el número promedio de descendientes que es capaz de producir cada hembra de la población durante toda su vida. Su cálculo es el siguiente:

$$R_0 = \sum l_x m_x$$

- ✓ El tiempo generacional (T) es el tiempo promedio en días que transcurre desde el nacimiento de un individuo y el nacimiento de uno de sus descendientes. El método de cálculo es el siguiente:

$$T = \sum x l_x m_x / \sum l_x m_x$$

- ✓ La tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r_m) es el número de descendientes por hembra por unidad de tiempo. Representa la capacidad potencial de multiplicación poblacional y se calcula iterando la ecuación de Lotka:

$$\sum l_x m_x e^{-r_m x} = 1$$

- ✓ El tiempo de duplicación (D): es el tiempo requerido por la población para duplicarse. La fórmula que posibilita su cálculo es la siguiente:

$$D = (\ln 2)/r_m$$

Para el cálculo de estos parámetros se utilizó el programa TABLAVI (La Rossa y Khan, 2003) El programa estima cada uno de los parámetros y su correspondiente error estándar y la tasa intrínseca de crecimiento por el método de Jacknife (r_{mj}).

Resultados y discusión

Los valores obtenidos para los parámetros poblacionales de *A. quadridentata* se presentan en la tabla 2.5.

Tabla 2.5. Parámetros poblacionales de *A. quadridentata* estimados sobre *C. pomonella* (media \pm error estándar) (n = 8 hembras).

Ro	r_m	T	D
209,26 \pm 59,28	0,11 \pm 0,005	50,37 \pm 0,63	6,29 \pm 0,32
huevos parasitados/ \varnothing	huevos parasitados/ \varnothing /día	días	días

Los parámetros de la tabla de vida son frecuentemente utilizados para caracterizar a las especies de enemigos naturales. Los datos aquí presentados son el primer aporte sobre

los parámetros poblacionales de una especie del género *Ascogaster*. Por ello, la comparación entre estadísticos es difícil teniendo en cuenta que los datos hallados en la bibliografía se refirieren a otras especies de parasitoides y huéspedes. Con fin ilustrativo en la tabla 2.6 se muestran los estadísticos poblacionales correspondientes a otros endoparasitoides de lepidópteros de la misma subfamilia y tribu. El valor de R_0 obtenido para *A. quadridentata* indica que una hembra puede producir en promedio alrededor de doscientos descendientes en cada generación (tabla 2.5). Este valor fue superior, aproximadamente el doble, del citado para *Chelonus curvimaculatus* Cámeron; y si bien resultó mayor que el registrado para *C. oculator* Panzer, hay que destacar que para esta última especie se calculó dicho parámetro a partir de la progenie hembra obtenida por hembra (tabla 2.6).

Respecto de la tasa intrínseca de crecimiento poblacional, si bien *A. quadridentata* evidenció un valor mayor que el mencionado para *C. oculator*, hay que contemplar que las diferencias observadas pueden obedecer a la disparidad de criterios para estimar la fecundidad. En *C. oculator* se consideró solo a la progenie hembra para el cálculo de la fecundidad y la estimación de r_m , mientras que en *A. quadridentata* se estimó este parámetro en base a la fecundidad definida como la cantidad de huéspedes que parasita una hembra, que comprende la descendencia de machos y hembras. A su vez, el valor más grande de r_m registrado para *A. quadridentata* también puede asociarse a que esta especie presentó un menor tiempo de duplicación y tiempo generacional respecto de los registrados en *C. oculator*. En este sentido Messenger (1964) plantea que los factores que afectan la duración del ciclo de vida, y en consecuencia el tiempo generacional, ejercen efectos más importantes sobre la tasa intrínseca de crecimiento que aquellos factores que afectan la fecundidad.

Tabla 2.6. Parámetros poblacionales de otras especies de braconidos de la subfamilia Cheloninae y tribu Chelonini. Se presentan los valores de la tasa neta reproductiva (**Ro**), la tasa intrínseca crecimiento poblacional (**r_m**), el tiempo generacional (**T**) y el tiempo de duplicación (**D**).

Parasitoide	Huésped	n	Ro	r _m	T (días)	D (días)	Condiciones ambientales	Autores
<i>Chelonus curvimaculatus</i>	<i>Pectinophora gossypiella</i>	10	74,60 (huevos/♀)	/	/	/	25 ± 1 °C , 14:10 (L:O)	Hentz <i>et al.</i> , 1998
<i>Chelonus oculator</i>	<i>Ephestia cautella</i>	10	168,7 (♀/♀)	0,0936 ± 0,001 (♀/♀/ día)	54,7	7,3	25 °C 60 - 70%HR 16:8 (L:O)	Tunca <i>et al.</i> , 2010

Asimismo, resulta útil comparar los valores de los estadísticos poblacionales del enemigo natural con los de su huésped para evaluar su potencial como agente de control biológico. En la bibliografía se hallaron valores altamente variables para los parámetros poblacionales de *C. pomonella* (tabla 2.7). En líneas generales, los valores de r_m y Ro citados fueron estimados en base a la progenie hembra y resultaron menores o similares a los obtenidos para *A. quadridentata*, mientras que los valores referidos al tiempo generacional de *C. pomonella* resultaron menores que los aquí obtenidos para el parasitoide. Las diferencias observadas entre los valores citados para los parámetros poblacionales de *C. pomonella* pueden deberse al uso de diferentes poblaciones del lepidóptero en los distintos trabajos (poblaciones de Irán, Canadá y otros). En tal sentido, para obtener datos más apropiados acerca de la población local del huésped sería necesario estimar los parámetros poblacionales de esta población de *C. pomonella* en las mismas condiciones experimentales que las empleadas en el presente trabajo.

Tabla 2.7. Parámetros poblacionales de *C. pomonella*. Se presentan los valores de la tasa neta reproductiva (**Ro**), la tasa intrínseca crecimiento poblacional (**r_m**), el tiempo generacional (**T**) y el tiempo de duplicación (**D**).

Ro (♀/♀)	r _m (♀/♀/ día)	T (días)	D (días)	Condiciones ambientales	Autores
13,04 ± 1,07	0,062 ± 0,001	43,47 ± 0,23	11,16 ± 0,30	25 °C, 50±10%HR, 16:8 (L:O)	Agiidam <i>et al.</i> , 2009
rango: 4,06 - 12,72	rango: 0,002 - 0,004	/	/	20 - 25 °C, HR ≥ 50%, luz natural	Geier y Briese, 1978
rango: 53,79 ± 1,95 - 64,41 ± 1,94	rango: 0,115 ± 0,001 - 0,121 ± 0,001	rango: 34,35 ± 0,06 - 34,18 ± 0,05	rango: 6,02 ± 0,0 6- 5,71 ± 0,05	25 °C, 65%HR, 16:8 (L:O)	Gu <i>et al.</i> , 2006

En conclusión, este estudio aporta información novedosa sobre características biológicas de una especie muy poco conocida. Los resultados aquí obtenidos ofrecen un primer acercamiento respecto del potencial de *A. quadridentata* como agente de control biológico de *C. pomonella*, este enemigo natural expresó en condiciones de laboratorio un alto r_m y un bajo T respecto de otras especies de endoparasitoides de la misma tribu. Serán necesarios futuros estudios en condiciones de campo para complementar la información aquí obtenida.

Conclusiones del capítulo 2

- ✓ Se estimaron los principales parámetros biológicos y poblacionales de *A. quadridentata* utilizando como huésped a *C. pomonella* bajo condiciones controladas.
- ✓ Los valores obtenidos para la tasa intrínseca de crecimiento de *A. quadridentata*, ($r_m = 0,11 \pm 0,005$ huevos parasitados/♀/día) y el tiempo generacional ($T = 50,37 \pm 0,63$ días) indicarían que este enemigo natural posee un alto potencial como agente de control biológico de *C. pomonella*.

CAPÍTULO 3

Estudios biológicos sobre el
parasitoide
Mastrus ridens



3a) Desempeño de *Mastrus ridens* en dos tipos de larvas de *Cydia pomonella*: larvas diapausantes de campo y no diapausantes de laboratorio y preferencia por ambos huéspedes.

Introducción

La eficacia de un parasitoide depende de su habilidad para localizar a un potencial huésped en un ambiente determinado, y una vez hallado el huésped, que su reproducción sea exitosa (Godfray, 1994). Los huéspedes hallados a menudo difieren en su calidad, y las hembras deben decidir en cuáles oviponer y a cuáles ignorar. Aspectos tales como son su forma, textura, coloración y la liberación de volátiles pueden condicionar la selección de los parasitoides (Salt, 1935; Hackerman *et al.*, 2008). Además, la edad, el estadio y el tipo de dieta del huésped -como así también su estado fisiológico (Lawrence, 1990)- han mostrado tener un efecto directo en el comportamiento de selección y en el desempeño del parasitoide (Bautista y Harris, 1997; Laumann *et al.*, 2000; Gandolfi *et al.*, 2003; Chong y Oetting, 2006).

Mastrus ridens es un ectoparasitoide que como se mencionó anteriormente ataca a las larvas desarrolladas de *C. pomonella* cuando éstas migran fuera de los frutos (Bezemer y Mills, 2003). Las larvas del huésped generalmente tejen los capullos en hendiduras o grietas de los troncos de los árboles a cierta distancia de los frutos donde se alimentaron y a veces incorporan al capullo material vegetal de los alrededores. Las hembras del parasitoide utilizan las feromonas de agregación de las larvas de *C. pomonella*, presentes en la seda de los capullos pupales, como señales volátiles para localizar al huésped a través de largas distancias en el campo (Jumean *et al.*, 2005).

En el laboratorio del IILB se multiplica a *M. ridens* utilizando como huéspedes a las larvas del último estadio de *C. pomonella* no diapausantes que provienen de la cría del laboratorio.

Esta sección tuvo por objetivo estudiar el desempeño de *M. ridens* y la preferencia por larvas de *C. pomonella* no diapausantes de laboratorio y diapausantes de campo.

Materiales y métodos

Los individuos de *M. ridens* provinieron de la línea de cría que se mantiene en el IILB desde 2005 sobre larvas del último estadio no diapausantes de *C. pomonella* de laboratorio. Las larvas del huésped utilizadas en los ensayos fueron larvas de dos tipos: 1) larvas de *C. pomonella* no diapausantes provenientes de la cría en el laboratorio sobre dieta artificial; 2) larvas diapausantes procedentes del campo. Para la colecta de estas últimas se ubicaron fajas de cartón corrugado (10 cm) envolviendo los troncos de los árboles de manzana en cuadros infestados con la plaga dos meses antes de la cosecha de 2010, en montes sin uso de agroquímicos de la región del Alto Valle de Río Negro. Las fajas proporcionaron sitios para que las larvas maduras tejieran su capullo.

Con el fin de evaluar el desempeño de *M. ridens* en larvas diapausantes y no diapausantes se realizó una prueba sin opción donde cada huésped fue presentado por separado al parasitoide, y se estimaron parámetros biológicos tales como: el parasitismo, la fecundidad y la proporción sexual de la progenie. También se realizó una prueba de opción doble en donde se le ofreció al parasitoide los dos tipos de larvas del huésped en simultáneo y se estimó la proporción de parasitismo de cada tipo de huésped para estudiar su preferencia. Para eliminar los posibles estímulos químicos involucrados en la localización y aceptación del huésped asociados al material vegetal o a la dieta artificial de las larvas de *C. pomonella* utilizadas en los ensayos, estas últimas fueron puestas en contacto con trozos de cartón corrugado, previamente expuestos a la luz UV (Philips® TUV 36W/ G36 T8) durante 40 minutos, como sustrato inerte en donde tejer el capullo. Las larvas del huésped fueron expuestas al parasitoide una vez que tejieron su capullo. Dado que para esta especie se menciona una tasa de ataque de 1 - 2 huéspedes por día en condiciones de laboratorio (Bezemer y Mills, 2003; Hougardy *et al.*, 2005), en los ensayos se utilizó una densidad de cuatro larvas por día por huésped para satisfacer la condición necesaria de exponer una densidad “*ad libitum*” del huésped. Los ensayos se desarrollaron en cámaras climatizadas Instrumentalia® (modelo: MGC-450HPY-2) a: $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 50 - 70% de HR, y fotoperíodo 14:10 (L:O).

En la **prueba sin opción** se utilizaron diecinueve parejas de adultos de *M. ridens* de menos de 48 horas de edad, sin experiencia previa de parasitismo. Cada pareja se ubicó al azar en un frasco de vidrio (21 cm alto x 13 cm diámetro) con tapa de “voile”, donde se colocó agua, alimento y el huésped (figura 3.1.A). Los bebederos consistieron en recipientes plásticos con tapa, con un orificio a través del cual sobresalía una tela

absorbente embebida en agua y se utilizó trazas de miel como alimento. Dentro de una caja de Petri (5,5 cm) sin tapa se colocó un trozo de cartón corrugado de 3x2 cm conteniendo 4 larvas de *C. pomonella* (diapausantes o no diapausantes) acondicionadas de la forma descrita anteriormente. Al cabo de 24 horas de exposición las cajas de Petri conteniendo al huésped fueron retiradas, tapadas y conservadas en las mismas condiciones hasta la emergencia de los adultos del parasitoide. Las larvas del huésped se examinaron a los 8 días desde la exposición para evitar la mortalidad de los huevos y de los estadios larvales iniciales de *M. ridens* asociada a la manipulación del material que se observó en ensayos preliminares. Se registraron la cantidad de huéspedes parasitados y la cantidad de larvas del parasitoide. Posteriormente, al emerger los adultos de la filial 1 de *M. ridens* se registró la cantidad de individuos y el sexo de cada uno. A partir de los datos obtenidos se estimaron los siguientes parámetros: el parasitismo, definido como la cantidad de larvas del huésped parasitadas por hembra; la fecundidad total, definida como la cantidad de descendientes por hembra (progenie/♀); la fecundidad por huésped, definida como la cantidad de descendientes por huésped por hembra (progenie/huésped/♀), y la proporción sexual, definida como la cantidad de progenie hembra respecto del total de la descendencia.

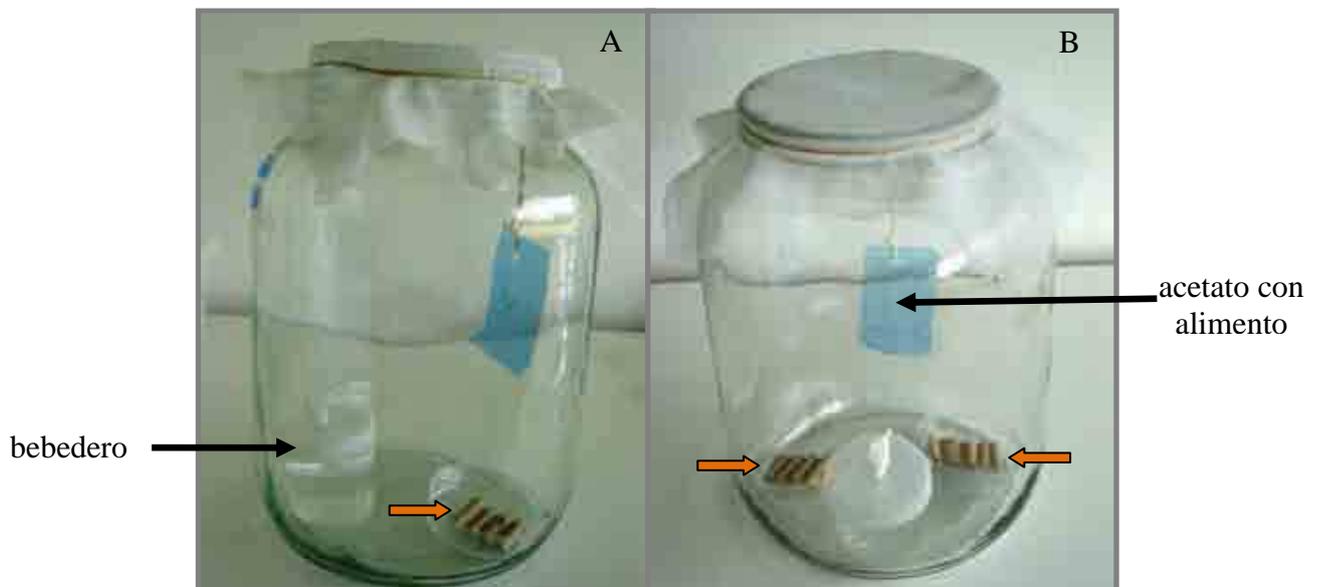


Figura 3.1. Dispositivo utilizado para evaluar el desempeño y la preferencia de *M. ridens*: A- pruebas sin opción, y B- pruebas con opción. Las flechas naranjas indican los trozos de cartón que contienen a las larvas del huésped.

En la **prueba con opción**, veinte parejas de adultos de *M. ridens* de menos de 48 horas de edad, sin experiencia de parasitismo fueron expuestas simultáneamente a larvas del último estadio de *C. pomonella* de ambos tipos. Las parejas fueron asignadas al azar en frascos de vidrio con agua, alimento y el huésped acondicionado como se describió previamente (figura 3.1.B). Por recipiente se colocaron dos cajas de Petri, cada una con cuatro larvas del último estadio de *C. pomonella* de cada tipo (diapausantes y no diapausantes) acondicionadas en trozos de cartón inerte como se describió anteriormente. Ambas cajas de Petri se ubicaron aleatoriamente en los extremos del frasco de tal forma que las parejas del parasitoide al ser liberadas estuvieran a una distancia equidistante de las mismas. Al cabo de 24 horas se retiraron las larvas del huésped, se taparon las cajas de petri y se conservaron en las mismas condiciones hasta la emergencia de los adultos del parasitoide. A los ocho días desde la exposición se registró la cantidad de huéspedes parasitados de cada tipo y se estimó el parasitismo por tipo de huésped.

Análisis estadístico: en la prueba sin opción, el número de larvas parasitadas, la fecundidad total y por huésped, y la proporción de sexos fueron evaluadas a través de una prueba de Man-Whitney U por no cumplirse los supuestos del ANOVA. Los datos de parasitismo por tipo de huésped de la prueba con opción se evaluaron a través de una prueba t-Student para muestras pareadas. Se consideró un $\alpha = 5\%$ y se usó el programa Statistica (Stat Soft, 2000).

Resultados y discusión

En la **prueba sin opción** el parasitismo difirió significativamente entre las larvas de *C. pomonella* diapausantes y no diapausantes ($Z = -3,05$; $p = 0,0022$). Las hembras de *M. ridens* parasitaron en promedio más de una larva del huésped al ofrecerles individuos diapausantes, con un valor máximo de tres huéspedes parasitados por hembra; mientras que al ofrecerles larvas no diapausantes, de las diecinueve hembras estudiadas solo se registró parasitismo en diez de ellas y proveniente de un único huésped (tabla 3.1.). La fecundidad total también resultó ser mayor en las larvas diapausantes ($Z = -2,37$; $p = 0,0173$), pero en la fecundidad por huésped se registraron valores similares para ambos tipos de larvas del huésped. La proporción sexual de la descendencia fue similar entre las larvas diapausantes y no diapausantes (tabla 3.1).

Tabla 3.1. Parámetros biológicos de *M. ridens* sobre larvas de *C. pomonella* de distinta procedencia (media \pm error estándar) en la prueba sin opción.

Parámetro	Huésped: larvas de <i>C. pomonella</i>	
	No diapausantes	Diapausantes
Número de huéspedes parasitados	0,53 \pm 0,12 a	1,37 \pm 0,21 b
Fecundidad total (progenie/ ♀)	2,21 \pm 0,65 a	6,16 \pm 1,30 b
Fecundidad por huésped (progenie/huésped/♀)	2,21 \pm 0,65 a	3,73 \pm 0,63 a
Proporción sexual	0,62 \pm 0,14 a (n = 10)	0,49 \pm 0,09 a (n = 16)

Las letras iguales en las filas indican que no existen diferencias significativas entre tratamientos (prueba de Man-Whitney U, $p > 0,05$).

En el presente trabajo, la cantidad de huéspedes parasitados en las larvas de *C. pomonella* diapausantes en condiciones de laboratorio resultó similar a la mencionada para esta especie por otros autores en larvas también diapausantes del mismo huésped (valores cercanos a uno) en condiciones similares (Bezemer y Mills, 2001; Bezemer y Mills, 2003; Hougardy *et al.*, 2005). Asimismo, los valores de fecundidad por huésped obtenidos en este trabajo resultaron similares a los valores hallados por Bezemer y Mills (2003) en la misma especie en larvas diapausantes, quienes mencionan valores de $4,51 \pm 0,43$ huevos/huésped (exposición de cuatro larvas huésped) y de $3 \pm 0,13$ progenie/huésped (exposición de ocho larvas del huésped). La proporción sexual obtenida por otros autores en el mismo huésped fue levemente superior a la registrada en esta investigación (Bezemer y Mills, 2003).

Al ofrecerle conjuntamente larvas de *C. pomonella* de ambos tipos (**prueba con opción**), *M. ridens* prefirió al huésped diapausante, observándose un parasitismo menor a un tercio en las larvas del huésped no diapausantes en comparación con las diapausantes ($t = -4,46$; $p = 0,0002$; $gl = 18$).

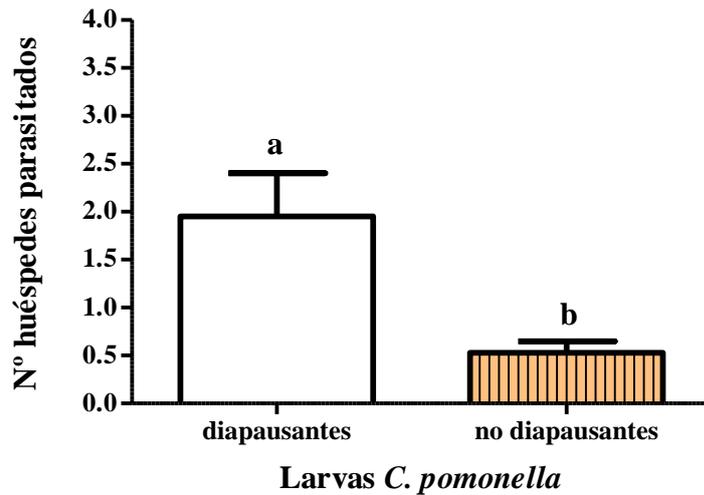


Figura 3.2. Parasitismo de *M. ridens* en la prueba de opción doble según la procedencia del huésped (media \pm error estándar). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos (prueba t-Student para muestras pareadas, $p > 0,05$).

Mastrus ridens es un parasitoide gregario capaz de adecuar el número de huevos depositados por huésped en función de la disponibilidad y del tamaño de las larvas de *C. pomonella* (Bezemer y Mills, 2003; Devotto *et al.*, 2010). En este trabajo la disponibilidad y el tamaño de las larvas del huésped utilizadas en los ensayos fueron similares tanto en las larvas diapausantes como no diapausantes. Si bien las hembras del parasitoide aceptaron a las larvas de *C. pomonella* no diapausantes como huéspedes para oviponer, observándose una fecundidad por huésped o tamaño de camada similar entre larvas diapausantes y no diapausantes, no las prefirieron respecto de las larvas diapausantes.

La selección del huésped por parte de los parasitoides incluye la preferencia por el hábitat y una serie de comportamientos que llevan a la oviposición, tales como la localización, el reconocimiento y la aceptación del huésped (Salt, 1935; Vinson, 1976). Para localizarlo, los parasitoides utilizan señales químicas (volátiles de la planta hospedera y del huésped) y características físicas de este último (tamaño, movimiento, etc.) (Salt, 1935). La aceptación del huésped depende de su reconocimiento como un sitio adecuado para la oviposición, alimentación y desarrollo de los estados inmaduros del parasitoide, y está asociada a la palatabilidad del propio huésped y de los otros hospedadores presentes en el ambiente (Godfray, 1994). En este trabajo el menor parasitismo registrado en las larvas no diapausantes es un posible indicador de una menor palatabilidad de este tipo de huéspedes.

M. ridens es un ectoparasitoide que -como se mencionó anteriormente- ataca a las larvas desarrolladas de *C. pomonella* cuando estas migran fuera de los frutos (Bezemer y Mills, 2003). En la naturaleza las larvas de *C. pomonella*, que son potenciales huéspedes de *M. ridens*, se encuentran espacialmente alejadas de la fruta donde se desarrollaron. Por lo tanto, es probable que las señales químicas preponderantes asociadas al comportamiento de localización y aceptación del huésped en esta especie sean los compuestos químicos asociados al propio huésped. El patrón proteico del capullo del huésped es probablemente especie específico, por lo cual se menciona que es posible que provea a los parasitoides de señales confiables involucradas en la búsqueda del huésped (Bénédet *et al.*, 2002). En *M. ridens* las hembras son atraídas a través de largas distancias por las feromonas de agregación de las larvas de *C. pomonella*. Estos compuestos volátiles están presentes en la seda de los capullos de las larvas del huésped y no en las larvas desnudas y poseen una corta duración (Jumean *et al.*, 2005). Además, se observó que las hembras también son atraídas por compuestos químicos de contacto presentes en la seda de los capullos pupales del huésped, los cuales son reconocidos a través de sensillas gustatorias presentes en las antenas y en las vainas del ovipositor (Charles *et al.*, 2013). La composición química del capullo es característica de cada especie y es independiente del estado fisiológico del huésped. Entonces, es posible suponer que en las condiciones del presente estudio, la evaluación de la palatabilidad del huésped hubiera estado asociada mayormente a la información sobre el medio interno de la larva (señales químicas dentro del huésped) obtenida por las hembras de *M. ridens* a través de la inserción del ovipositor en el tejido del huésped.

Las distintas especies de huéspedes y los estados de desarrollo de una misma especie varían en cuanto a calidad y cantidad de recursos nutritivos que proveen para el desarrollo de los parasitoides (Vinson y Iwantsch, 1980). Los insectos que están en diapausa poseen características fisiológicas particulares como una mayor reserva de lípidos, una mayor tolerancia al frío y una mayor resistencia a la pérdida de agua (Denlinger, 2008). En *Nasonia vitripens* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae), un ectoparasitoide de moscas, se halló que el estado fisiológico del huésped (pupas en diapausa o normales) afectó el comportamiento de oviposición y el desarrollo de la progenie. *N. vitripens* dejó una menor cantidad de huevos y una mayor progenie de machos en las pupas diapausantes (menos palatables). Los autores sugieren que si bien las pupas en diapausa representan una mayor cantidad de nutrientes la menor palatabilidad de estos huéspedes puede asociarse a la incapacidad de *N. vitripens* para

regular el metabolismo de las pupas en diapausa (Rivers y Delinger, 1995). En *C. pomonella* las larvas en diapausa acumulan altos niveles de trehalosa, un hidrato de carbono que posiblemente tenga un rol importante como sustancia crio- protectora asociado a la estrategia de hibernación de esta especie (Khani *et al.*, 2007a). Además, poseen elevados niveles de ácido linoleico, un ácido graso relacionado con los componentes estructurales de las membranas celulares y con la formación de los depósitos de lípidos para ser utilizados como fuente de energía en los insectos (Khani *et al.*, 2007b). En este sentido las diferencias observadas en el parasitismo de *M. ridens* entre las larvas diapausantes y no diapausantes de *C. pomonella* podrían relacionarse entre otros factores a la composición de nutrientes y a los niveles hormonales de cada tipo de larva.

Por otra parte, también es posible que las características físicas del huésped asociadas a diferencias estructurales de los capullos de las larvas diapausantes y no diapausantes de *C. pomonella* hayan estado vinculadas en el comportamiento de selección del huésped. De hecho, en los insectos los capullos están contruidos principalmente con seda y filamentos formados por proteínas y los capullos que realizan los individuos en diapausa durante el invierno tienden a ser más robustos y con más capas de seda que los capullos efectuados el resto del año (Danks, 2004). En particular, en *C. pomonella* los capullos de las larvas en diapausa son de forma redondeada y poseen paredes más gruesas, mientras que los capullos de las larvas no diapausantes son más angostos y presentan un tubo separado de la cámara principal por un tabique de seda (Hansen y Harwood, 1968).

Desde el 2005, en el IILB se multiplica a *M. ridens* sobre larvas no diapausantes de laboratorio de *C. pomonella*. Debido a que la multiplicación de los parasitoides en el laboratorio depende del éxito en el parasitismo para optimizar la cría de *M. ridens* sería importante incorporar periódicamente material diapausante del campo.

3b) Desempeño de *Mastrus ridens* en dos especies de lepidópteros plaga: *Cydia pomonella* y *Grapholita molesta* y preferencia por estas especies de huéspedes.

Introducción

Mastrus ridens es un ectoparasitoide específico de *C. pomonella* que es posible que ataque a otros tortricidos miembros de la tribu Grapholitini. En pruebas de laboratorio se observó que además de *C. pomonella* también parasita a otra especie del mismo género, *C. prunivora* (Walsh), pero que en este último huésped no se desarrolla normalmente (Hennessey *et al.*, 1995). En tanto que en el campo, en su país de origen (Kazajistán) y en Estados Unidos, donde fue introducido para el control biológico de *C. pomonella* (en California y Washington), la única especie de huésped que se conoce asociada a este parasitoide es *C. pomonella* (Hennessey *et al.*, 1995; Mills, 2005a; Kullman y Mills, 1999).

En los montes frutales de pepita de nuestro país está presente además del lepidóptero plaga, *C. pomonella*, otra especie de tortricido plaga de la misma tribu, *Grapholita molesta* (Busck), que se presenta como un huésped potencial de *M. ridens*. Si bien *G. molesta* es una plaga secundaria u ocasional del cultivo de pomáceas, esta ha ido ganando relevancia en los últimos años y posee una importancia cuarentenaria para destinos como México e Israel (Giganti *et al.*, 2007).

Grapholita molesta tiene un ciclo biológico similar al de *C. pomonella* (Giganti *et al.*, 2007). La larva del último estadio de *G. molesta* puede medir hasta 14 mm y puede diferenciarse de la larva de carpocapsa por la presencia de una estructura quitinosa ubicada en el último segmento abdominal, llamada “peine anal”. El adulto es de color oscuro y de menor tamaño que el de *C. pomonella*. Los principales hospederos de *G. molesta* son los frutales de carozo y de pepita. En los frutales de carozo, primero ataca los brotes y luego, cuando estos comienzan a lignificarse, se dirige hacia los frutos. En los frutales de pepita ataca principalmente peral, luego manzano y membrillero. En este último, al ser un cultivo tardío, solo afecta a los frutos, mientras que en el manzano además de los frutos ataca a los brotes, aunque en baja proporción. En los montes frutales de pepita donde se realizan tratamientos fitosanitarios convencionales, *G. molesta* no incide en forma considerable en el cultivo ya que es controlada por los insecticidas aplicados contra *C. pomonella*. En cambio, en los montes

donde se utiliza como técnica principal de control la confusión sexual, se observa que *G. molesta* puede causar daños de importancia económica (Cucchi y Becerra, 2007).

En esta sección se estudió el desempeño de *M. ridens* y la preferencia respecto a dos especies de tortricidos plaga presentes en nuestro país: *C. pomonella* y *G. molesta*.

Materiales y métodos

Los individuos de *M. ridens* provinieron de la cría que se mantiene en el IILB. Se realizaron pruebas con y sin opción de especie de huésped siguiendo la metodología detallada en el apartado 3a. Como huéspedes se emplearon larvas diapausantes del último estadio de *C. pomonella* y de *G. molesta* procedentes del campo. Las larvas de *C. pomonella* se colectaron de la forma descrita anteriormente en el apartado 3a) durante marzo-abril de 2012 en montes de manzanos sin uso de agroquímicos y las larvas de *G. molesta* se colectaron en la misma época en montes de duraznos sin uso de plaguicidas en el Alto Valle de Río Negro. Las larvas de *G. molesta* fueron colectadas en duraznos debido a la baja densidad de esta plaga hallada en manzanos. Se utilizó la densidad de $n = 4$ para cada especie de huésped y las larvas de ambas especies fueron acondicionadas en tiras de cartón corrugado inerte de la forma descrita en el apartado anterior. Para cada ensayo (con y sin opción) se estimaron las mismas variables detalladas en la sección 3a).

Análisis estadístico: en la prueba sin opción, el número de larvas parasitadas, la fecundidad total y por huésped, y la proporción de sexos de la progenie fueron evaluadas a través de una prueba de Man-Whitney U por no cumplirse los supuestos del ANOVA. Los datos de parasitismo por especie de huésped de la prueba con opción se compararon a través de una prueba t-Student para muestras pareadas. Se consideró un $\alpha = 5\%$ y se utilizó el programa Statistica (Stat Soft, 2000).

Resultados y discusión

En la **prueba sin opción** el parasitismo de *M. ridens* difirió significativamente entre ambos huéspedes ($Z = 2,70$; $p = 0,0069$), y los mayores valores se registraron sobre *C. pomonella* (tabla 3.2.). Al ofrecerle como huésped a *G. molesta*, de las 20 hembras evaluadas solo 11 dejaron descendencia y mayormente parasitaron una única larva del huésped; resultando los valores de fecundidad total y por huésped similares en *G. molesta*. El valor de fecundidad por huésped también resultó superior en *C. pomonella* ($Z_{fec.tot} = 3,28$; $p_{fec.tot} = 0,0010$ y $Z_{fec./huésped} = 3,29$; $p_{fec./huésped} = 0,0009$), mientras que la proporción sexual de la descendencia fue similar entre ambas especies (tabla 3.2.).

Tabla 3.2. Parámetros biológicos de *M. ridens* estimados sobre dos especies de lepidópteros (media \pm error estándar) en la prueba sin opción.

Parámetro	Especie huésped	
	<i>Cydia pomonella</i>	<i>Grapholita molesta</i>
Número de huéspedes parasitados	1,5 \pm 0,25 a	0,60 \pm 0,13 b
Fecundidad total (progenie/♀)	5,89 \pm 1,22 a	0,75 \pm 0,23 b
Fecundidad por huésped (progenie/huésped/♀)	3,14 \pm 0,51 a	0,68 \pm 0,20 b
Proporción sexual	0,35 \pm 0,07 a (n = 14)	0,44 \pm 0,15 a (n = 8)

Las letras iguales en las filas indican que no existen diferencias significativas entre tratamientos (prueba de Man-Whitney U, $p > 0,05$)

En la **prueba con opción** se observaron diferencias en la selección del huésped en función de la especie ofrecida. *M. ridens* prefirió las larvas de *C. pomonella* respecto de las de *G. molesta* ($t = 4,22$; $p = 0,0006$; $gl = 16$).

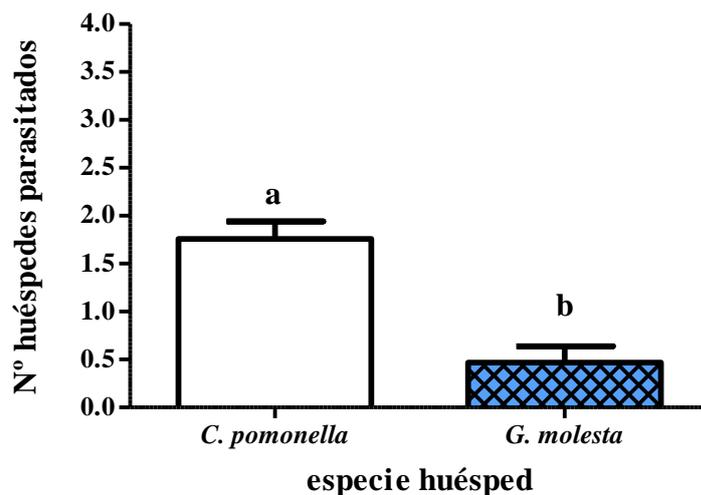


Figura 3.3. Parasitismo de *M. ridens* en la prueba de opción doble según la especie de huésped (media \pm error estándar). Las letras distintas indican que existen diferencias significativas entre ambas especies de huéspedes (prueba t-Student para muestras pareadas, $p < 0,05$).

En esta investigación se observó que *M. ridens* ataca las larvas de *G. molesta* y puede completar su desarrollo en esta especie de huésped, registrándose parasitismo y emergencia de adultos. Este resultado difiere del hallado por Charles *et al.* (2013a) al evaluar el comportamiento de selección de *M. ridens* asociado a cinco especies de huéspedes potenciales. Estos autores observaron que *G. molesta* junto a otra especie de lepidóptero emparentada con *C. pomonella* (*C. succedana*) no fueron reconocidas por *M. ridens* como huéspedes, y señalaron que ninguna de las hembras del parasitoide dejó descendencia en *G. molesta*. Las diferencias registradas en el parasitismo de *M. ridens* sobre *G. molesta* entre ambos trabajos probablemente se deban a la utilización de huéspedes en distintos estados fisiológicos. En el presente estudio se emplearon como huéspedes a larvas diapausantes de *G. molesta* del campo, mientras que Charles *et al.* (2013a) utilizaron larvas de la misma especie no diapausantes del campo. Por otro lado, en otro trabajo de los mismos autores se evaluó la supervivencia de *M. ridens* en las mismas cinco especies de huéspedes potenciales en condiciones de confinamiento (Charles *et al.*, 2013b), y si bien la metodología de obtención de las larvas de *G. molesta* fue similar entre ambos trabajos, no se especifica allí el estado fisiológico del huésped. En este último estudio se observó que las hembras del parasitoide rara vez atacaron a las larvas de *G. molesta*, además se registró una baja proporción de huevos que completaron su desarrollo (huevo - adulto) y adultos de menor tamaño sobre *G. molesta*

respecto de *C. pomonella* (Charles *et al.*, 2013b). Los resultados hallados por Charles *et al.* (2013b) pueden relacionarse en este caso con las condiciones de confinamiento artificial (empleo de pequeños recipientes y exposición de dos hembras del parasitoide a una única larva del huésped por 72 h) que pudieron haber alterado el comportamiento normal de las hembras de *M. ridens*; a diferencia de las condiciones experimentales aquí empleadas (exposición de huéspedes en exceso y sin interferencia mutua entre hembras del parasitoide).

Por otro lado, se observó un mejor desempeño de *M. ridens* (mayores valores de parasitismo y fecundidad) sobre *C. pomonella* respecto de *G. molesta*, resultando *C. pomonella* la especie de huésped preferida en las pruebas con opción. *M. ridens* es un ectoparasitoide, gregario e idiobionte, que como se mencionó anteriormente, es capaz de adecuar el número de huevos depositados por huésped en función de características del huésped (tamaño, etc.) y de su disponibilidad (Bezemer y Mills, 2003; Devotto *et al.*, 2010). *G. molesta* y *C. pomonella* son especies de lepidópteros que difieren en su tamaño, siendo las larvas de *G. molesta* más pequeñas respecto de las de *C. pomonella* (Moyano de Leone y Ruberti, 2007). Los valores mayores de fecundidad de *M. ridens* se obtuvieron en la especie huésped de mayor tamaño. Esto coincide con la hipótesis generalizada, que sostiene que en los parasitoides gregarios idiobiontes, el tamaño del huésped determina el tamaño y la supervivencia de la progenie (Salt, 1940; Taylor, 1988; Rivers y Denlinger, 1995). Si bien los huéspedes más grandes se asocian a una mayor provisión de nutrientes, para algunas especies de parasitoides idiobiontes la palatabilidad del huésped no solo es función del tamaño, sino que también puede asociarse a factores como la disponibilidad/accesibilidad de los nutrientes, el estado fisiológico del huésped o a la capacidad del parasitoide para regular el sistema fisiológico del huésped atacado (Zavieso y Mills, 2000; Bell *et al.*, 2005; Hackermann *et al.*, 2007). En este sentido, las distintas especies de huéspedes empleadas en esta investigación además de su tamaño también pueden diferir en cuanto a su calidad, es decir en la composición de nutrientes, tal como lo plantearon otros autores al evaluar el éxito reproductivo de otra especie de parasitoide gregario (*Hyssopus pallidus* Askew) en los mismos lepidópteros huéspedes (Hackermann *et al.*, 2007).

Asimismo, en vistas a la implementación de un programa de control biológico clásico para *C. pomonella* en la región del Alto Valle de Río Negro, es importante destacar la capacidad del parasitoide exótico, *M. ridens*, para parasitar y sobrevivir en un huésped alternativo presente en el ambiente, como *G. molesta*. Si bien los resultados

fueron obtenidos en condiciones de laboratorio, dan una orientación sobre el comportamiento del parasitoide en el campo. En la región del Alto Valle, *G. molesta* es una plaga secundaria del cultivo de pomáceas, que presenta poblaciones limitadas en montes convencionales pero que puede tener preponderancia en montes de producción orgánica o en montes con manejo integrado y uso de la técnica de confusión sexual contra *C. pomonella* (Chichón *et al.*, 2001). Asimismo, *G. molesta* es una plaga importante en los frutales de carozo (Moyano de Leone y Ruberti, 2007). Aunque la producción de los frutales de pepita es la principal actividad productiva en la región (82% de la superficie cultivada), los frutales de carozo aparecen en tercer lugar, con alrededor de 2 000 ha cultivadas. Además, en el contexto actual del modelo productivo predominante de la región se observa en la agricultura familiar una diversificación de la actividad productiva, con un aumento de pequeñas superficies en las unidades productivas destinadas a los frutales de carozo (Domini *et al.*, 2011). Los sitios descritos, donde la presencia de *G. molesta* adquiere relevancia, representan otra posibilidad para la supervivencia y el establecimiento del parasitoide *M. ridens* en la región.

Conclusiones del capítulo 3

- ✓ Si bien *M. ridens* parasita y se desarrolla exitosamente tanto en las larvas no diapausantes como diapausantes de *C. pomonella*, estas últimas parecen ofrecer un recurso nutricional más palatable para el parasitoide, favoreciendo su desempeño (mayor fecundidad y niveles de parasitismo).
- ✓ *Mastrus ridens* parasita a *G. molesta*, y es capaz de completar su desarrollo (huevo - adulto) exitosamente en este huésped. Por este motivo, *G. molesta* resulta un huésped alternativo de interés para el establecimiento del parasitoide en la región de Alto Valle de Río Negro.

CAPÍTULO 4

Compatibilidad de uso de
Mastrus ridens y la aplicación de
insecticidas usados en la producción
de pomáceas



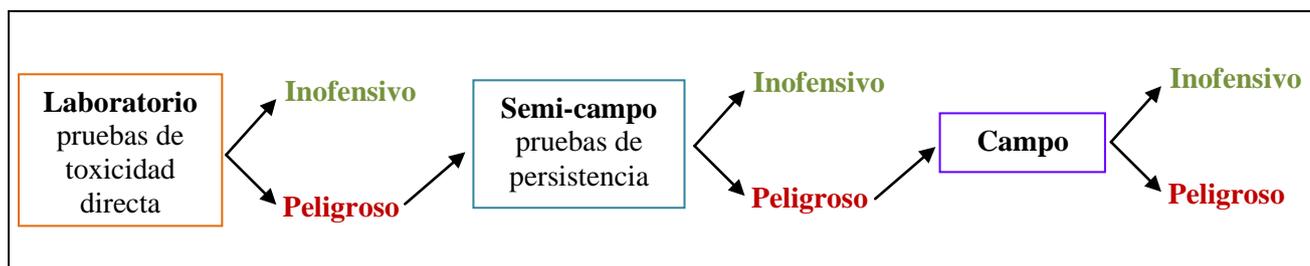
Introducción

Para favorecer el empleo de estrategias de control biológico de plagas es necesario conocer los factores que afectan la abundancia y el desempeño de los enemigos naturales en el campo. Los insecticidas pueden disminuir la efectividad de los parasitoides y predadores causando directamente su muerte o afectando su comportamiento y su tasa reproductiva entre otros parámetros (Van Driesche y Bellows, 1996). Los enemigos naturales pueden entrar en contacto con los insecticidas a través del huésped, por contacto directo con el producto o por ingestión de néctar y polen de flores con residuos del insecticida. Conocer la interacción entre los insecticidas y la fauna benéfica es un aspecto crítico para integrar ambas técnicas de control de plagas y adoptar una estrategia de manejo integrado (Hajek, 2004). Los efectos subletales de los insecticidas en los enemigos naturales pueden ser tan perjudiciales como la mortalidad del propio insecto en relación al éxito del enemigo natural como agente de control. Entre los efectos subletales se registran alteraciones en parámetros biológicos tales como: disminución en la fecundidad, fertilidad y longevidad, cambios en la proporción sexual y alteraciones en el comportamiento asociado a la movilidad, orientación, alimentación y oviposición de los insectos (Fernandes *et al.*, 2010).

En una estrategia de manejo integrado, el empleo de los plaguicidas debe respetar a los enemigos naturales ya sea a través de su selectividad fisiológica, como de su selectividad física o ecológica. La selectividad fisiológica se refiere a la toxicidad intrínseca del principio activo. Los productos químicos varían enormemente en su toxicidad y existen muy pocos casos en los que son altamente efectivos contra la plaga e inoocuos para el enemigo natural. La selectividad ecológica resulta de cómo es formulado y aplicado el insecticida. Cualquier factor que reduzca el contacto del enemigo natural con el plaguicida favorecerá la selectividad ecológica. Los productos que tienen una residualidad corta después de la aplicación favorecerán la actividad de la fauna benéfica. Además, los productos no selectivos pueden ser usados selectivamente si son aplicados en patrones espaciales o temporales que limiten el contacto con los enemigos naturales (De Bach, 1977; Van Driesche y Bellows, 1996).

Los métodos para evaluar la compatibilidad de los insecticidas con los enemigos naturales van desde pruebas de laboratorio hasta estudios de campo. La Organización Internacional de Control Biológico (abreviatura en inglés: IOBC) ha delineado pruebas a nivel de laboratorio y en el campo que permiten seleccionar a los agroquímicos según

su efecto sobre los enemigos naturales a través de un procedimiento en cascada (Hassan *et al.*, 1985):



Las pruebas iniciales en el laboratorio consisten en la evaluación de la toxicidad sobre los estados de desarrollo de los enemigos naturales que eventualmente pueden estar expuestos a los agroquímicos en el campo. En los parasitoides se considera que el estado más susceptible es el adulto, mientras que los más tolerantes son los estados que se desarrollan dentro del huésped (Hassan, 1997). Las pruebas de toxicidad directa implican la exposición de los insectos a residuos secos de los insecticidas y permiten determinar los productos que no causan efectos adversos sobre los enemigos naturales (inofensivos), mientras que aquellos que presentan signos de toxicidad deben ser además estudiados en relación a su persistencia en ensayos de semi-campo y posteriormente en pruebas de campo.

La persistencia de la actividad tóxica de los agroquímicos es un factor de suma importancia, ya que pueden existir productos que en las pruebas anteriores demuestren ser tóxicos pero que su efecto sea de vida corta, por lo que un correcto manejo de los intervalos liberación-aplicación podría permitir su empleo en conjunto con los enemigos naturales. En las pruebas de persistencia (semi-campo) se exponen los insectos a los residuos de los insecticidas aplicados en las plantas a diferentes intervalos después del tratamiento. Las plantas se pulverizan con los productos y se mantienen en condiciones de campo con la incidencia directa de los rayos solares.

Por último, las pruebas de campo permiten verificar la toxicidad de los productos y proporcionan una importante información de uso práctico. Estas pruebas se realizan liberando a los enemigos naturales directamente sobre el cultivo experimental o comercial que ha sido pulverizado y, posteriormente se evalúa la supervivencia y el desempeño de los enemigos naturales a diferentes intervalos de tiempo después del tratamiento (Hassan *et al.*, 1985, Hassan, 1997).

El objetivo de este capítulo fue evaluar la toxicidad de insecticidas de uso frecuente en la producción de pomáceas sobre el parasitoide, *M. ridens*. Para ello se realizaron dos tipos de ensayos:

- 1- Ensayos para evaluar la toxicidad directa de los principios activos sobre los adultos del parasitoide
- 2- Ensayos para evaluar la persistencia de la actividad tóxica de los principios activos sobre los adultos del parasitoide.

4a) Toxicidad directa sobre el adulto

Materiales y métodos

Inicialmente se evaluaron en el laboratorio tres principios activos utilizados comúnmente en el control de *C. pomonella*: virus de la granulosis (CpGV), clorantraniliprole, y tiaclopirid (tabla 4.1). Posteriormente se decidió evaluar un cuarto principio activo correspondiente a un insecticida regulador de crecimiento, denominado novaluron (tabla 4.1). Para los ensayos se adaptaron las metodologías desarrolladas por la IOBC y las descritas por Jacas y Viñuela (1994) y Mead-Briggs *et al.* (2000) para los braconidos *Opius concolor* y *Aphidius rhopalosiphi*, respectivamente. El dispositivo utilizado consistió en dos placas de vidrio desmontables (13 x 13 cm) para formar el techo y el piso, y un armazón de PVC (10,5 cm diámetro) con tres orificios para la ventilación (1 cm) (figura 4.1). En todos los casos se utilizó agua destilada como solvente y testigo, y se evaluaron las dosis de los productos recomendadas comercialmente para los manzanos (tabla 4.1). Los insecticidas fueron aplicados de acuerdo con la técnica del “film”, cubriendo la cara interna de las placas de vidrio en cada uno de los dispositivos (2 placas de vidrio) por separado mediante un equipo pulverizador con una boquilla de cono hueco 8001, marca Teejet a 200 kPa de presión y una altura del objetivo de 0,40 m. Las pulverizaciones fueron realizadas por el Ing. Agr. Gerardo Masiá en el Instituto de Ingeniería Rural, INTA, Castelar. Se evaluó el efecto de los productos sobre la supervivencia y la reproducción del enemigo natural.

Tabla 4.1. Productos utilizados en las pruebas de toxicidad directa sobre el estado adulto de *M. ridens*.

Principio activo	Marca comercial	Concentración	Clasificación química	Acción
virus de la granulosis de <i>C. pomonella</i> (CpGV) *	CarpovirusPlus	50 cm ³ /hl	insecticida biológico	ingestión
clorantraniliprole *	Coragen	20 cm ³ /hl	diamida antranflica	contacto e ingestión
tiacloprid *	Calypso	20 cm ³ /hl	cloronicotinílico (neonicotinoide)	contacto y sistémica
novaluron **	Rimon	100 cm ³ /hl	benzoilfenilurea (IGR)	ingestión y contacto

Información obtenida de la Guía de productos fitosanitarios 2011 (CASAFE, 2011)

* Insecticidas utilizados en el primer ensayo de toxicidad directa.

**Insecticida utilizado en el segundo ensayo de toxicidad directa.

Efecto sobre la supervivencia

Se pulverizaron siete dispositivos con cada producto y el testigo fue considerado como un tratamiento más en, el cual se utilizó agua destilada para la pulverización. Una vez seca la superficie tratada, en cada dispositivo se colocó un grupo de seis adultos (3♀ y 3♂) de *M. ridens* de menos de 48 horas de edad y se cerró el dispositivo con un tapón de algodón embebido en una solución de agua-miel. Los dispositivos se mantuvieron bajo las siguientes condiciones: 25 ± 2 °C, 40 - 60% HR, ventilación constante e iluminación natural. Se registró la proporción de individuos muertos a las 2, 24 y 48 horas de exposición al producto.

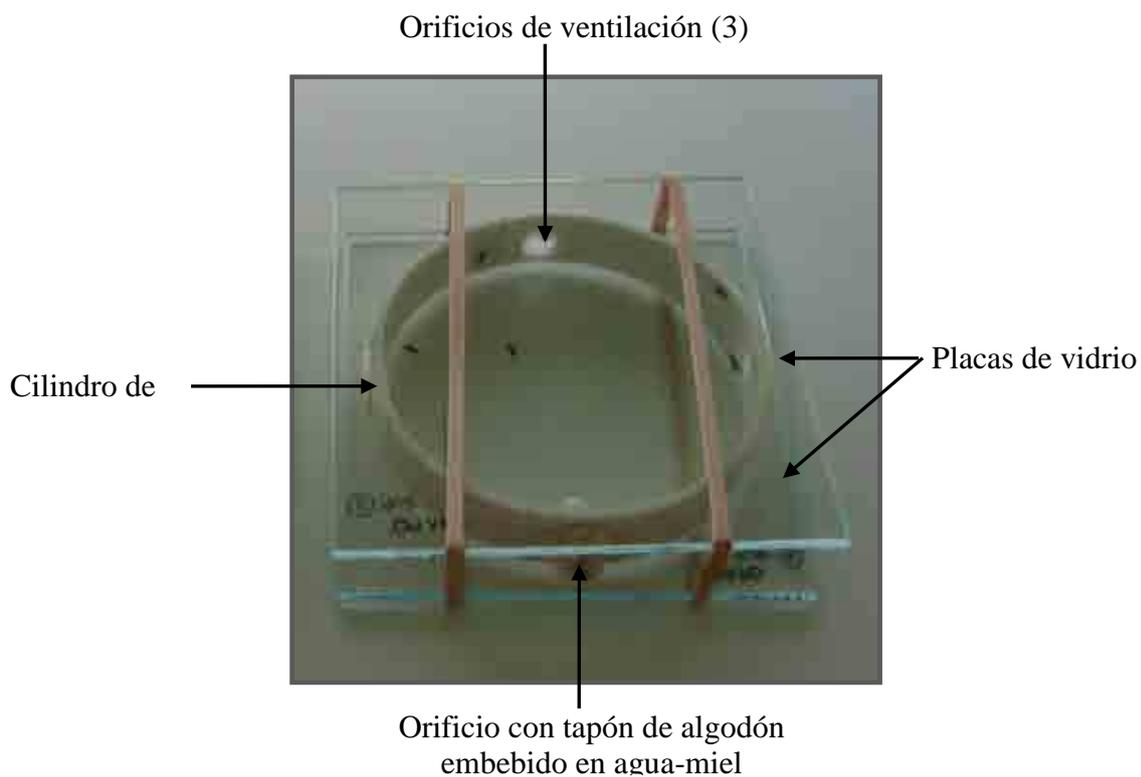


Figura 4.1. Dispositivo utilizado en las pruebas de toxicidad directa sobre los adultos de *M. ridens* para evaluar su supervivencia.

Efecto sobre parámetros reproductivos (efectos sub-letales)

Se pulverizaron ocho dispositivos con cada producto y se utilizó un tratamiento testigo con agua destilada. Una vez seca la superficie tratada en cada dispositivo se colocó una pareja de adultos de *M. ridens* de menos de 48 horas de edad en contacto con los residuos de los insecticidas durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, las hembras aún vivas fueron transferidas individualmente a un nuevo dispositivo a los efectos de evaluar su fecundidad y otros parámetros biológicos (figura 4.2). Se usaron recipientes de vidrio (12,5 cm de diámetro x 20 cm de alto) con tapa de “voile” provistos con agua en bebederos (recipientes plásticos con agua y una tapa con un orificio con tela absorbente embebida en el agua), alimento (trazas de miel en tiras de acetatos) y el huésped. En cada recipiente se colocaron cuatro larvas desarrolladas de *C. pomonella* ubicadas en trozos de cartón corrugado de 3x2 cm en la base de una caja de Petri (5,5 cm). Al cabo de 24 horas se retiraron los cartones conteniendo las larvas del huésped y se taparon las

cajas de Petri (5,5 cm). Las condiciones experimentales fueron: 25 ± 2 °C, 40 - 60% HR, ventilación constante e iluminación natural. No se observó el material al día siguiente del contacto del insecticida con el huésped para evitar la mortalidad de los huevos y de los estadios larvales iniciales de *M. ridens* asociada a la manipulación del material. A los ocho días desde la exposición se registró la cantidad de larvas desarrolladas en capullo del parasitoide y la cantidad de huéspedes parasitados. Posteriormente, al emerger los adultos de la filial 1 del parasitoide se registraron la cantidad de individuos y el sexo de cada uno. A partir de los datos obtenidos se estimaron los siguientes parámetros: el parasitismo, definido como la cantidad de larvas del huésped parasitadas por hembra; la fecundidad total, definida como la cantidad de descendientes por hembra (progenie/♀); la fecundidad por huésped, definida como la cantidad de descendientes por huésped por hembra (progenie/huésped/♀) y la proporción sexual, definida como la cantidad de progenie hembra respecto del total de la descendencia.

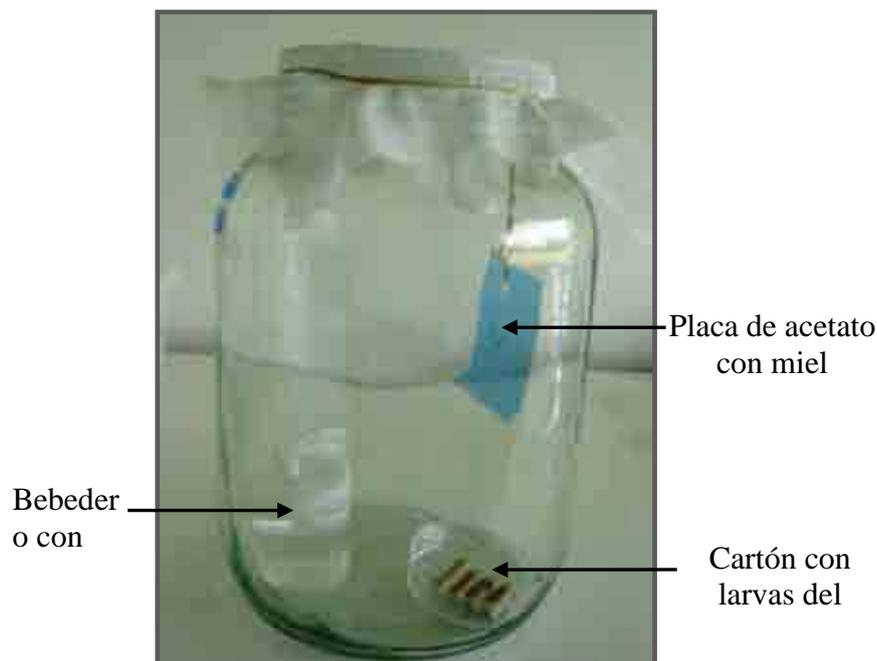


Figura 4.2. Dispositivo usado en las pruebas de toxicidad directa sobre los adultos para evaluar el parasitismo de *M. ridens*.

Análisis estadístico: en el primer ensayo donde se evaluaron 3 productos (Virus de la granulosis de *C. pomonella*, clorantraniliprole y tiacloprid) la supervivencia a las 2, 24 y 48 horas, el parasitismo, la fecundidad total y por huésped fueron evaluados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis por no cumplirse los supuestos del ANOVA, y las medias se compararon con la prueba de comparaciones múltiples de los rankings medios derivada de la prueba de Kruskal-Wallis; la proporción de sexos de la F1 fue evaluada a través de un ANOVA de 1 factor. En el segundo ensayo en el cual se evaluó un solo producto (novaluron) la supervivencia a las 2, 24 y 48 horas, el parasitismo, la fecundidad total y por huésped fueron evaluados mediante la prueba de Man-Whitney U por no cumplirse los supuestos del ANOVA y la proporción de sexos fue evaluada a través de una prueba t-Student. Se consideró en todas las pruebas un $\alpha = 5\%$ y se usó el programa Statistica (Stat Soft, 2000).

Los productos fueron clasificados según el criterio propuesto por la IOBC (Hassan, 1997) en base al porcentaje de reducción de la supervivencia a las 24 horas y al porcentaje de reducción del parasitismo con respecto al control, según la siguiente escala:

- (1) Inofensivo: < 30%;
- (2) Poco perjudicial: 30 - 79%;
- (3) Moderadamente perjudicial: 80 - 99%;
- (4) Perjudicial: > 99%.

Resultados

Evaluación de los principios activos: CpGV, clorantraniliprole y tiacloprid

Efecto sobre la supervivencia

Los productos CpGV y clorantraniliprole no afectaron la supervivencia de los adultos respecto de lo observado en el control para los intervalos de tiempo considerados, mientras que el tiacloprid afectó significativamente la supervivencia de los adultos a tiempos de exposición ≥ 24 h (K-W: $H_{24h} 3, 28 = 24,18$, $p < 0,05$; $H_{48h} 3, 28 = 22,65$ $p < 0,05$) (figura 4.3). A las 48 horas de exposición a tiacloprid la supervivencia media fue mínima (2%). En base a la clasificación de la IOBC según la supervivencia luego de 24 horas de exposición (tabla 4.2) los productos clorantraniliprole y CpGV resultaron

inofensivos y el tiacloprid resultó poco perjudicial (reducción del 76% en la supervivencia respecto del control).

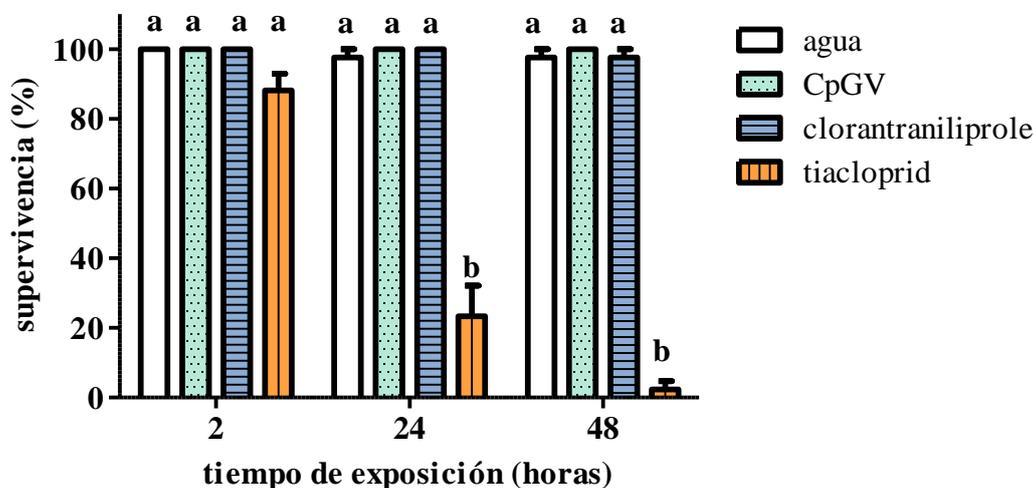


Figura 4.3. Supervivencia (media \pm error estándar) de los adultos de *M. ridens* luego de 2, 24 y 48 horas de exposición a los insecticidas. Las letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada tiempo (prueba de comparaciones múltiples de los rankings medios, $p < 0,05$).

Tabla 4.2. Clasificación de los insecticidas según el porcentaje de reducción en la supervivencia luego de 24 h de exposición (Hassan, 1997).

Producto	Clasificación
CpGV	(1) Inofensivo
clorraniliprole	(1) Inofensivo
tiacloprid	(2) Poco perjudicial

Efecto sobre parámetros reproductivos

Al cabo de 2 horas de exposición a CpGV y clorraniliprole la cantidad de huéspedes parasitados fue similar a la del testigo. Mientras, que con tiacloprid se registró una disminución significativa del parasitismo respecto del control (K-W: $H_{3, 32} = 9,91$ $p = 0,0193$), con valores de $0,25 \pm 0,16$ y $1,63 \pm 0,32$ huéspedes parasitados por hembra (media \pm error estándar) para el tiacloprid y el agua, respectivamente (figura 4.4). Este

último fue clasificado como un producto moderadamente perjudicial en base al porcentaje de reducción del parasitismo (85%) (tabla 4.3).

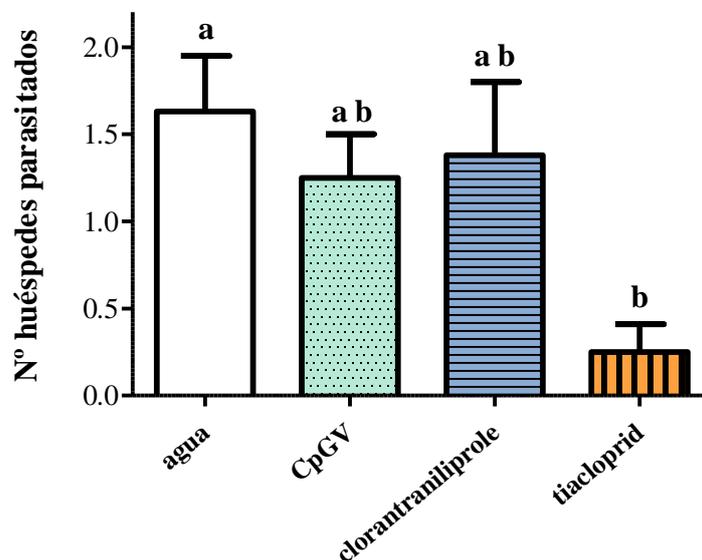


Figura 4.4. Parasitismo (media \pm error estándar) de *M. ridens* luego de 2 horas de exposición a los insecticidas. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba de comparaciones múltiples de los rankings medios, $p < 0,05$).

Tabla 4.3. Clasificación de los insecticidas según el porcentaje de reducción en el parasitismo luego de dos horas de exposición (Hassan, 1997).

Producto	Clasificación
CpGV	(1) Inofensivo
clorantraniliprole	(1) Inofensivo
tiacloprid	(3) Moderadamente perjudicial

El protocolo de la IOBC propone evaluar la toxicidad directa a través del efecto sobre la supervivencia o el parasitismo, como en este trabajo se evaluaron ambos parámetros se consideró para la clasificación final aquel parámetro que resultó más afectado por el insecticida. En base a los datos obtenidos, el parámetro más afectado fue el parasitismo, por lo tanto los productos CpGV y clorantraniliprole fueron catalogados como inofensivos mientras que el tiacloprid resultó moderadamente perjudicial.

Al evaluar otros parámetros biológicos, como la fecundidad total y la fecundidad por huésped, se hallaron valores similares en los adultos expuestos a CpGV y clorantraniliprole respecto del control. Además, la proporción de sexos de la descendencia no presentó diferencias significativas entre los adultos expuestos a estos dos productos y al agua, con valores sesgados hacia las hembras en todos los casos (> 0,5) (tabla 4.4).

Si bien no hubo diferencias significativas en la fecundidad total y por huésped entre las hembras en contacto con tiacloprid y con el agua, los valores obtenidos parecen indicar que el insecticida afectó negativamente a las hembras: de las ocho hembras expuestas al insecticida solo dos dejaron descendencia (mayoritariamente machos) (tabla 4.4). La alta variabilidad entre los individuos puede haber influido en la significancia de la prueba utilizada, en ensayos posteriores se debería aumentar el número de réplicas.

Tabla 4.4. Parámetros biológicos (media \pm error estándar) de las hembras de *M. ridens* luego de 2 horas de exposición a los insecticidas.

Parámetro	Tratamiento			
	Agua	CpGV	clorantraniliprole	tiacloprid
Fecundidad total (progenie/ ♀)	6,63 \pm 1,28 a	7,13 \pm 1,72 a	6,63 \pm 2,44 a	2,25 \pm 1,66 a
Fecundidad por huésped (progenie/huésped/♀)	4,04 \pm 0,95 a	4,81 \pm 0,78 a	3,44 \pm 0,93 a	2,25 \pm 1,66 a
Proporción sexual	0,84 \pm 0,10 a* (n = 7)	0,56 \pm 0,12 a* (n = 7)	0,51 \pm 0,13 a* (n = 6)	/

Letras iguales en las filas indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos (a: prueba de Kruskal Wallis, $p > 0,05$; y a*: Anova, $p > 0,05$).

Evaluación del principio activo novaluron

Efecto sobre la supervivencia

El contacto de los adultos del parasitoide con novaluron no afectó la supervivencia respecto del control en los tiempos de exposición evaluados (figura 4.5). En base a la clasificación propuesta por la IOBC, luego de 24 horas de exposición, este principio activo resultó inofensivo (tabla 4.5.).

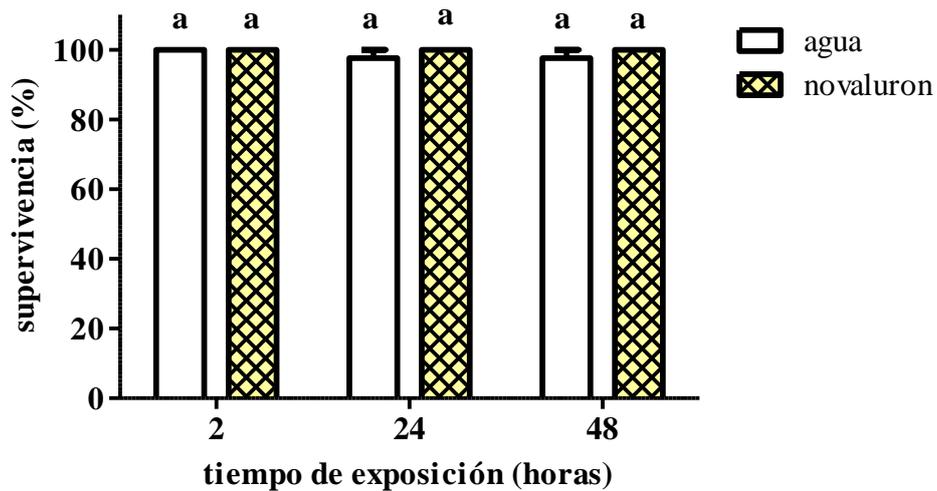


Figura 4.5. Supervivencia (media \pm error estándar) de adultos de *M. ridens* luego de 2, 24 y 48 horas de exposición a novaluron. Las letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo (prueba de Man-Whitney U, $p > 0,05$).

Efecto sobre parámetros reproductivos

Al cabo de 2 horas de exposición a novaluron la cantidad de huéspedes parasitados fue similar a la del testigo (figura 4.6). De acuerdo a este parámetro, el producto activo fue clasificado también como inofensivo (tabla 4.5).

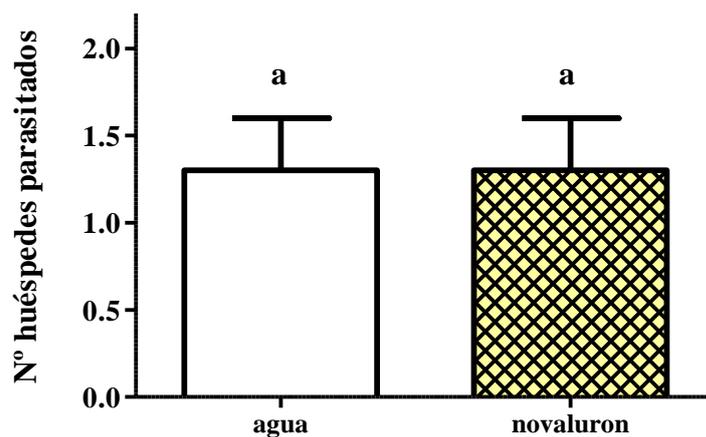


Figura 4.6. Parásitismo (media \pm error estándar) de *M. ridens* luego de 2 horas de exposición a novaluron. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre tratamientos (prueba de Man-Whitney U, $p > 0,05$).

Tabla 4.5. Clasificación del novaluron según el porcentaje de reducción en la supervivencia luego de 24 horas de exposición y el porcentaje de reducción en el parasitismo luego de 2 horas de exposición (Hassan, 1997).

Producto	Parámetro evaluado	Clasificación
novaluron	supervivencia	(1) Inofensivo
novaluron	parasitismo	(1) Inofensivo

Asimismo, al evaluar otros parámetros biológicos como la fecundidad total y por huésped, y la proporción sexual, no se hallaron diferencias significativas entre los valores obtenidos para estas variables en los adultos expuestos a novaluron y al agua (tabla 4.6).

Tabla 4.6. Parámetros biológicos (media \pm error estándar) de las hembras de *M. ridens* luego de 2 horas de exposición a novaluron.

Parámetro	Tratamiento	
	Agua	novaluron
Fecundidad total (progenie/ ♀)	2,75 \pm 0,96 a	2,0 \pm 0,66 a
Fecundidad por huésped (progenie/huésped/♀)	3,88 \pm 1,13 a	2,5 \pm 0,57 a
Proporción sexual	0,64 \pm 0,19 a*	0,52 \pm 0,16 a*

Las letras iguales en las filas indican que no existen diferencias significativas entre tratamientos (a: prueba de Man-Whitney U, $p > 0,05$ y a*: prueba t-Student, $p > 0,05$)

4b) Persistencia de la acción de los productos

Materiales y métodos

En base a los resultados obtenidos en las pruebas de toxicidad directa, solo se evaluó la persistencia del tiacloprid. Para ello se utilizó una parcela experimental de manzanos del IMYZA, INTA Castelar con 13 árboles frutales. Se pulverizaron los árboles a punto de goteo, siete con tiacloprid y seis con agua destilada. Los productos y el agua fueron

asperjados con un equipo de pulverización manual de previa presión de 5 litros marca Giber, y se utilizaron aproximadamente 3 litros de solución por árbol de forma de cubrir toda la superficie foliar hasta una altura de 1,5 m. Se utilizó agua destilada como solvente para preparar la solución de tiacloprid con la dosis recomendada comercialmente para los manzanos (tabla 4.1.) La pulverización se realizó a principios de febrero de 2012 y luego, a los 4, 14 y 29 días se colectó material vegetal de distintas ramas de los arboles tratados. El material utilizado consistió en un trozo terminal de rama de 10 a 15 cm de largo con 4 - 6 hojas, el cual se acondicionó en recipientes de vidrio (6 cm diámetro x 13 cm alto) con tapa de “voile” (figura 4.7). Por recipiente se ubicó una pareja de *M. ridens* \leq 48 horas de edad y se expuso al material vegetal tratado durante 24 horas, con alimento (trazas de miel en tiras de acetato) y agua (tiras de papel absorbente embebidas en agua). Se comprobó que en cada unidad experimental las hembras estuvieran en contacto con la superficie del material vegetal. Transcurrido ese tiempo las hembras aún vivas fueron transferidas a un nuevo dispositivo para evaluar el parasitismo siguiendo la metodología descrita anteriormente en las pruebas de toxicidad directa (figura 4.2). Las condiciones experimentales fueron: 25 ± 2 °C, 40 - 60% HR, ventilación constante e iluminación natural. Para cada tiempo se registró la cantidad de larvas desarrolladas del parasitoide y la cantidad de huéspedes parasitados luego de ocho días desde la exposición. Posteriormente, al emerger los adultos de la filial 1 del parasitoide se registraron la cantidad de individuos y el sexo de cada uno. A partir de los datos obtenidos se estimaron los siguientes parámetros: la fecundidad total, la fecundidad por huésped y el parasitismo, definidos anteriormente en los ensayos de toxicidad directa.



Figura 4.7. Dispositivos usados en las pruebas de persistencia de la acción de los insecticidas en los adultos de *M. ridens*.

Análisis estadístico: el parasitismo, la fecundidad total y por huésped fueron analizados a través de una prueba t-Student a los 14 y 29 días. La proporción de sexos de la F1 a los 14 días fue evaluada mediante una prueba Man-Whitney U por no cumplirse los supuestos del ANOVA, y a los 29 días fue analizada con una prueba t-Student previa transformación angular de los datos (Sokal, 1981) por no cumplirse el supuesto de normalidad (Lilliford, $p < 0,01$). Se consideró en todas las pruebas un $\alpha = 5\%$ y se usó el programa Statistica (Stat Soft, 2000).

Los productos fueron clasificados según la escala propuesta por la IOBC (Hassan, 1997), donde una reducción en más del 30% del parasitismo con respecto al testigo durante:

- (1) Menos de 5 días, corresponde a un insecticida de vida corta
- (2) Entre 5 y 15 días, corresponde a un insecticida poco persistente;
- (3) Entre 15 y 30 días, corresponde a un insecticida moderadamente persistente;
- (4) Mas de 30 días, corresponde a un insecticida persistente.

Resultados

A los 4 días desde la pulverización todos los adultos expuestos a tiacloprid murieron, mientras que a los 14 y 29 días sobrevivieron todos los individuos expuestos al insecticida. Por lo tanto, no se registró el parasitismo en la primera fecha de evaluación. A los 14 y 29 días desde la pulverización no se hallaron diferencias significativas en el parasitismo entre las hembras expuestas a tiacloprid y al control (figura 4.8).

En base al porcentaje de reducción del parasitismo luego de 24 horas de exposición al insecticida, el tiacloprid resultó **poco persistente** ya que a los 14 días desde la pulverización la reducción en el número de huéspedes parasitados de las hembras expuestas al producto fue menor al 30% respecto del valor obtenido para el control.

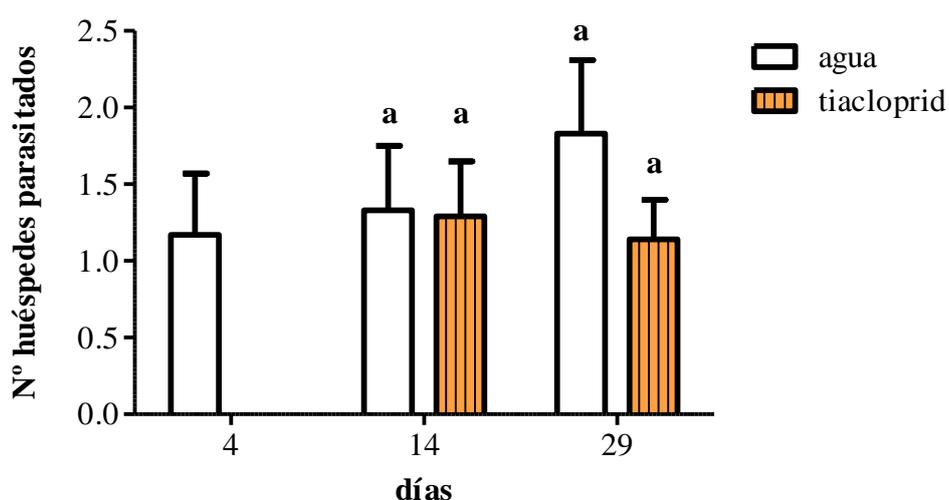


Figura 4.8. Parasitismo (media \pm error estándar) de *M. ridens* luego de 4, 14 y 29 días desde la pulverización con tiacloprid. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre tratamientos a los 14 y 29 días (t-Student, $p > 0,05$).

A los 14 y 29 días se registró también la fecundidad total y por huésped y no se hallaron diferencias significativas entre los valores obtenidos en las hembras expuestas al producto y al agua para cada tiempo. La proporción sexual también resultó similar entre las hembras expuestas a tiacloprid y al agua para cada tiempo (fue sesgada hacia los

machos en todos los casos a excepción de las hembras expuestas a tialcoprid a los 29 días) (tabla 4.7).

Tabla 4.7. Parámetros biológicos (media \pm error estándar) de las hembras de *M. ridens* luego de 14 y 29 días desde la pulverización con tialcoprid.

Parámetro	14 días		29 días	
	Agua	tialcoprid	Agua	tialcoprid
Progenie/hembra	6,33 \pm 1,84 a	5 \pm 1,57 a	6,50 \pm 2,01 a	4,71 \pm 1,60 a
Progenie/hembra/huésped	4,28 \pm 1,02 a	3,14 \pm 1,21 a	3,06 \pm 0,82 a	3,71 \pm 1,49 a
Proporción sexual	0,35 \pm 0,22 a* (n = 5)	0,43 \pm 0,21 a* (n = 5)	0,40 \pm 0,11 a* (n = 5)	0,56 \pm 0,17 a* (n = 5)

Letras iguales en las filas para cada período de tiempo desde la pulverización indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos (t-Student, $p > 0,05$, y a* Man-Whitney U, $p > 0,05$).

Discusión

En el presente trabajo, se evaluó la compatibilidad de uso entre *M. ridens* y algunos insecticidas utilizados para el control de *C. pomonella* en manzanos. Se estudió la toxicidad de los productos solo en los adultos del parasitoide y no en los estados inmaduros, debido a que *M. ridens* ataca a las larvas del 5^{to} estadio de *C. pomonella*, las cuales se encuentran en su capullo ocultas en la corteza de los árboles u hojarasca (Bezemer y Mills, 2003). Por este motivo, se consideró que los estadios inmaduros de *M. ridens* transcurren en sitios protegidos sin contacto o con una muy baja probabilidad de contacto con los insecticidas. Del total de productos evaluados, tres principios activos, **CpGV**, **clorantraniliprole** y **novaluron**, fueron clasificados como **productos inofensivos** en base a las categorías de toxicidad de la IOBC.

El **CarpovirusPlus®** es un insecticida biológico en base al virus de la granulosis de *C. pomonella* (CpGV), que infecta a los estadios larvales de su huésped. Luego de su ingestión los cuerpos de occlusión del virus se desintegran en el medio alcalino del intestino del insecto y se inicia la infección de las células epiteliales del intestino. Posteriormente, la infección se extiende a otros tejidos, como los cuerpos grasos. Las larvas infectadas mueren luego de 5 - 7 días (Steinke y Jehle, 2004). Este producto es específico para *C. pomonella* y otras pocas especies de lepidópteros estrechamente emparentadas (Lacey y Unruh, 2005). En el presente estudio se registró que el contacto

directo con superficies tratadas con el producto no afectó la supervivencia ni los parámetros reproductivos de los adultos de *M. ridens*. Esto concuerda con lo observado en varios trabajos de campo que mencionan que el uso de CpGV para controlar a *C. pomonella* no tuvo un efecto adverso sobre los predadores heterópteros y phitoseidos asociados a la arañuela roja, *Panonychus ulmi* Koch, presentes en montes comerciales de manzanos (Glen *et al.*, 1984); y tampoco resultó perjudicial para especies de arañas (familias: Linyphiidae, Salticidae, Oxyopidae y Clubionidae), predadores heterópteros y parasitoides, mayormente de la familia Encyrtidae, hallados en montes comerciales de perales (Arthurs *et al.*, 2007). Sin embargo, en el caso de los parasitoides podría haber un efecto indirecto del producto a través del huésped infectado, ya que la infección con baculovirus puede interferir con el desarrollo de los parasitoides a través de la competencia por el recurso (Lacey y Unruh, 2005; Mc. William, 2007, Lacey y Shapiro-Ilan, 2008). Si bien en este trabajo no se evaluó este efecto, el virus CpGV y el parasitoide *M. ridens* no compiten directamente por el recurso (huésped) dado que este virus infecta a las larvas neonatas de *C. pomonella* antes de que ingresen en el fruto, mientras que *M. ridens* ataca a las larvas desarrolladas cuando forman su capullo fuera del fruto. Además, la aplicación del virus CpGV provoca en general la muerte de las larvas infectadas rápidamente sin que lleguen a completar su desarrollo (Glen y Clark, 1985; Brain y Glen, 1989; Steinke y Jehle, 2004). Por otro lado, si las hembras de *M. ridens* se encuentran en el campo con huéspedes infectados, es probable que sean capaces de discriminar y optar entre estos y los huéspedes sanos, como se evidenció en otras especies de parasitoides (Caballero *et al.*, 1991; Kyei-Poku y Kunimi, 1997; Lacey *et al.*, 2003).

El **clorantraniliprole** es un principio activo que pertenece al grupo químico de las diamidas antranílicas. Tiene un novedoso modo de acción ya que funciona como activador de los receptores de rianodina afectando el proceso de contracción muscular. Los insectos afectados presentan letargia, parálisis, dejan de alimentarse y finalmente mueren (Cordova *et al.*, 2006). Actúa primeramente por ingestión y en segundo lugar por contacto (Dinter *et al.*, 2008). Este principio activo se caracteriza por su alto nivel de actividad insecticida en un amplio rango de especies de lepidópteros plaga y por su baja toxicidad en mamíferos asociada a su alta selectividad por los receptores de rianodina de los insectos. Asimismo, posee un perfil ecotoxicológico muy favorable y se menciona como un producto seguro también para las aves y organismos acuáticos (Lahm *et al.*, 2007). En el presente estudio no se registraron efectos adversos de este

compuesto en los adultos de *M. ridens*. Esto coincide con lo hallado por otros autores en numerosas especies de enemigos naturales (Dinter *et al.*, 2008; Brugger *et al.*, 2010; Preetha *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2011). Gradish *et al.* (2010) mencionan su baja toxicidad en abejas polinizadoras. Dinter *et al.* (2008) al evaluar el efecto de clorantraniliprole en diversas especies de insectos benéficos, entre ellos parasitoides, ácaros predadores y coccinélidos en una amplia gama de ensayos (pruebas de laboratorio y a campo) demostraron que este principio activo es seguro para numerosas especies de insectos benéficos. Además, en otro extenso estudio donde se evaluó la toxicidad de clorantraniliprole a través de pruebas de laboratorio (por contacto e ingestión) sobre especies de parasitoides pertenecientes a diversas familias de himenópteros (Aphididae, Braconidae, Eulophidae y Icheumonidae) se comprobó que este principio activo es altamente selectivo, al no registrarse efectos adversos en el desempeño de los parasitoides evaluados (Brugger *et al.*, 2010).

El **novaluron** es un principio activo perteneciente al grupo químico de las benzoilfenilureas. Es un regulador de crecimiento que inhibe la síntesis de quitina provocando una deposición anormal de la endocutícula y la muerte del insecto en el momento de la muda. Actúa por ingestión y contacto en larvas de lepidópteros y otras plagas, como las moscas blancas. Además, al tener acción translaminar afecta también a plagas minadoras de hojas (Ishaaya *et al.*, 2003). En el presente trabajo, el novaluron no mostró efectos letales (mortalidad) ni subletales (reducción del parasitismo, disminución de la fecundidad y/o cambios en la razón sexual) en los adultos de *M. ridens*. Acorde a los resultados obtenidos hay varios trabajos que señalan que el novaluron no posee efectos adversos en la fauna benéfica, en diversas especies de parasitoides, ácaros predadores, arañas y “vaquitas” predadoras, y proponen su uso en combinación con los agentes de control evaluados en programas de MIP en diversos cultivos (Cabrera *et al.*, 2005; Maxwell y Fadamiro, 2006; Gashwebeza, 2011). No obstante, existen otros estudios en donde se registraron efectos tóxicos de este compuesto en algunas especies de insectos benéficos como abejas polinizadoras y ciertas especies de predadores y parasitoides (Araya *et al.*, 2005; Cutler *et al.*, 2006; Jandricic *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2010; Hernandez *et al.*, 2011; Hodgson *et al.*, 2011). En particular, en estudios de laboratorio con parasitoides se observó que en *Apanteles glomeratus* L. (Hymenoptera: Braconidae) la exposición directa de los adultos a los residuos de novaluron produjo una disminución significativa de la supervivencia (Araya *et al.*, 2005) y la exposición de los huevos de dos especies del género *Trichogramma*

(Hymenoptera: Trichogrammatidae) provocó una disminución en el porcentaje de emergencia de la filial 1 (Carvalho, 2010; Maia *et al.*, 2010). En estos trabajos se calificó a este producto como moderadamente perjudicial para las especies benéficas evaluadas. Las diferencias registradas en la susceptibilidad de los distintos enemigos naturales a novaluron pueden deberse a diversos factores, entre ellos a la especie de enemigo natural, la sensibilidad diferencial de los estados de desarrollo expuestos, la dosis y vía de exposición (ingestión o a través del contacto directo), la forma de exposición (pruebas de toxicidad en el laboratorio o en el campo) y el tiempo de exposición al producto. Esto pone de manifiesto la necesidad de realizar evaluaciones para cada especie de enemigo natural presente en el sistema con el fin de determinar su compatibilidad con el principio activo novaluron.

Por todo lo expuesto anteriormente, el CpGV, el novaluron y el clorrantraniliprole se consideran insecticidas apropiados para su empleo conjunto con el parasitoide, *M. ridens*, en estrategias de MIP en manzanos para el control de *C. pomonella*. Además, debido a que estos tres insecticidas poseen diferentes modos de acción, su uso alternado en los ciclos de producción puede evitar la aparición de fenómenos de resistencia en la plaga.

Asimismo, los tres productos mencionados poseen una alta selectividad y tienen una categoría toxicológica IV según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) a propósito de los riesgos para la salud humana, lo cual indica que son productos que normalmente no ofrecen peligro (CASAFE, 2011). En suma, estos tres insecticidas se presentan como una alternativa importante frente al uso del metil azinfos, insecticida organofosforado altamente tóxico y ampliamente utilizado en la producción de manzanas y peras.

Por otro lado, el **tiacloprid** fue clasificado como un producto moderadamente perjudicial a partir de los resultados obtenidos en las pruebas de toxicidad directa en los adultos de *M. ridens*. El tiacloprid es un insecticida neurotóxico que pertenece al grupo químico de los cloronicotínicos. Actúa mimetizando la acción de la Acetilcolina, activando los receptores postsinápticos (nicotínicos) de manera persistente. La actividad continua de los neuroreceptores lleva a la sobreestimulación de la sinapsis, provocando excitación, convulsión, parálisis y la muerte del insecto (Thacker, 2002). Tiene buenas características sistémicas y actúa por contacto, y posee una alta actividad insecticida contra plagas chupadoras y masticadoras, como *C. pomonella*. En particular, en esta plaga se constató un buen control de las oviposturas (acción ovicida) conjuntamente con

un rápido efecto de volteo sobre larvas del primer y segundo estadio, y un buen efecto de contacto en las hembras adultas. Además, en estudios electrofisiológicos se observó que este compuesto tiene una eficacia mayor en las neuronas de esta especie, en comparación con otros insecticidas neurotóxicos. Por consiguiente, el tiacloprid es especialmente indicado para el control de *C. pomonella* (Elbert *et al.*, 2001). Respecto a su toxicidad según la clasificación toxicológica de la OMS a propósito de los riesgos para la salud humana tiene una categoría clase II, lo cual indica que es un insecticida moderadamente peligroso (CASAFE, 2011).

En el presente estudio se registraron en las pruebas de toxicidad directa tanto efectos letales de tiacloprid en los adultos de *M. ridens* (disminución significativa en la supervivencia al cabo de 24 h de exposición), como subletales (disminución del parasitismo del 85% luego de 2 h de exposición). Estos resultados concuerdan con numerosos estudios que hallaron efectos perjudiciales de este producto sobre diversas especies de la fauna benéfica. Se hallaron efectos adversos en coleópteros, hemípteros y ácaros predadores (Van de Veire y Tirry, 2003; Katsarou *et al.*, 2009; Olzak y Sekrecka, 2010), y parasitoides de las familias Aphelinidae, Aphidiidae, y Trichogrammatidae (Schuld y Schmuck, 2000; Van de Veire y Tirry, 2003; Tawfiq *et al.*, 2010). Sin embargo, hay otros autores que señalan que el tiacloprid no posee efectos adversos sobre ciertas especies de enemigos naturales, incluyendo varias especies de ácaros predadores (Bostanian *et al.*, 2009; Van de Veire y Tirry, 2003) y una especie de parasitoide braconídeo perteneciente al género *Dolichogenidea* (Newman *et al.*, 2004).

Asimismo, en este trabajo el tiacloprid fue clasificado como un producto poco persistente en razón de los resultados obtenidos en las pruebas de persistencia en el laboratorio. En coincidencia con este resultado Katsarou *et al.* (2009) hallaron que este compuesto mostró efectos tóxicos en pruebas de laboratorio en 3 especies de predadores coccinélidos, donde los efectos adversos se mantuvieron incluso cuando los insectos fueron expuestos a residuos de 8 días desde la aplicación del insecticida. También, en otro estudio se observó que este compuesto resultó altamente tóxico y persistente en una especie de hemíptero predador, y poco persistente en un parasitoide de la familia Aphelinidae (Van de Veire y Tirry, 2003).

Dado que el tiacloprid tuvo un efecto poco persistente sobre los adultos de *M. ridens*, una manera de compatibilizar el uso de ambas herramientas de control sería manejar los tiempos de aplicación del insecticida. En tal sentido, se pueden realizar las aplicaciones cuando la mayoría de los parasitoides se hallan como estados inmaduros

resguardados del contacto directo con el producto. Además, es posible que los adultos de *M. ridens* encuentren refugios en el campo posibilitando su persistencia en las áreas tratadas. Es importante también considerar que hay estudios que sugieren que los residuos de tiacloprid se degradan rápidamente en condiciones de campo (Schuld y Schmuck, 2000; Schmuck, 2001). Finalmente, para implementar el uso conjunto de tiacloprid y el parasitoide *M. ridens* en programas de MIP en pomáceas es fundamental evaluar los efectos de este compuesto sobre el enemigo natural en pruebas de campo y estudiar el desarrollo estacional de *M. ridens* en la región del Alto Valle de Río Negro.

Conclusiones del capítulo 4

- ✓ Los principios activos CpGV, novaluron, y clorantraniliprole no afectaron la supervivencia ni el parasitismo de los adultos de *M. ridens*. Por lo tanto el uso de estos productos es compatible con el empleo del parasitoide en programas MIP.
- ✓ El tiacloprid provocó una disminución significativa en la supervivencia de los adultos y afectó su parasitismo. Pero, al evaluar su persistencia, los residuos de este producto resultaron progresivamente menos nocivos, y, al cabo de 14 días no se registraron efectos adversos en el parasitismo.
- ✓ El uso conjunto de tiacloprid y *M. ridens* en estrategias MIP requiere de una correcta sincronización entre la aplicación del insecticida y el ciclo de vida del parasitoide.

CAPÍTULO 5

Colonización y establecimiento de
los enemigos naturales
en el campo



Introducción

Un paso crítico en la implementación de un programa de control biológico clásico, luego de la multiplicación de los enemigos naturales exóticos en el laboratorio, es la colonización de éstos en el campo. La colonización se define como el proceso de manipulación y liberación de los enemigos naturales exóticos en el campo para conseguir su establecimiento y dispersión en el nuevo ambiente. La capacidad de los organismos benéficos para establecerse en un nuevo hábitat está condicionada por diversos factores, incluyendo factores intrínsecos (factores genéticos, el estado de desarrollo de los individuos liberados, etc.) y extrínsecos (métodos de liberación, manejo de los sitios de liberación, etc.). El manejo de los sitios es de suma importancia e implica la búsqueda de lugares con presencia regular de la plaga y altas densidades, sin uso de insecticidas, y además que no estén aislados de forma de permitir que los enemigos naturales se dispersen a nuevas áreas donde esté presente su hospedador.

Las poblaciones de insectos requieren de condiciones favorables para su reproducción y desarrollo cuando se establecen en nuevos ambientes. La temperatura es uno de los factores climáticos clave que afecta el establecimiento y la dispersión, junto con las precipitaciones (cantidad y distribución), la humedad y el fotoperíodo. Para sobrevivir en un área nueva, los insectos exóticos deben ser capaces de sobrevivir a los extremos físicos de calor y frío, humedad y sequía del sitio donde son liberados. Uno de los principales factores que se deben evaluar en un potencial enemigo natural es su capacidad de adaptarse a las condiciones propias de ese nuevo hábitat donde se desarrolla la plaga y el cultivo.

Luego, de la liberación de los enemigos naturales exóticos en el campo, sus poblaciones deben ser monitoreadas para determinar si logran establecerse con éxito en el nuevo ambiente. El establecimiento se define como la presencia de una población reproductiva del enemigo natural luego de transcurrido un año o más desde su última liberación y sin nuevos aportes de individuos. Si la liberación se realiza en una región con climas extremos, como inviernos con bajas temperaturas o largos períodos de sequías, la población del enemigo natural debe sobrevivir al periodo más desfavorable antes de que pueda confirmarse su establecimiento. El establecimiento puede evaluarse realizando muestreos en la población de la plaga para registrar la presencia de las nuevas especies liberadas. Las muestras se deben tomar durante el primer año desde el inicio de las liberaciones en los sitios donde se liberó a los enemigos naturales para

determinar si los agentes sobreviven y se reproducen en la misma temporada de su liberación. En los siguientes años es necesario tomar nuevas muestras para determinar si los enemigos naturales han sido capaces de sobrevivir y si han logrado establecerse con éxito (Van Driesche y Bellows, 1996).

El objetivo de este capítulo fue evaluar la colonización y el establecimiento de los entomófagos en el Alto Valle de Río Negro. Para ello se realizaron liberaciones en condiciones de confinamiento para estudiar la reproducción de los parasitoides en condiciones de semi-campo en parcelas experimentales de manzanos. Posteriormente, se realizaron liberaciones abiertas de los enemigos naturales con el fin de evaluar su establecimiento en montes de pomáceas de la región del Alto Valle de Río Negro.

5.a) Evaluación de la reproducción de *Mastrus ridens* y *Ascogaster quadridentata* en condiciones de semi-campo a través de liberaciones confinadas en parcelas de manzanos.

Una vez que se obtuvo la autorización de la Dirección Nacional de Protección Vegetal del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) para la liberación de *M. ridens* y *A. quadridentata* en el campo y que se obtuvieron suficientes ejemplares de los insectos en el laboratorio, se realizaron liberaciones de adultos de ambos enemigos naturales en jaulas de confinamiento en montes de manzanos con la presencia de *C. pomonella*. Estos estudios tuvieron como objetivo evaluar de forma preliminar la capacidad de los agentes de control biológico recientemente introducidos para reproducirse en las condiciones ambientales locales y ajustar las técnicas de manejo de los enemigos naturales.

Materiales y métodos

Los estudios se desarrollaron en una parcela experimental de manzanos en el IMYZA, INTA Castelar. Se liberaron adultos de los parasitoides provenientes de las crías mantenidas en el IILB en jaulas de confinamiento con la presencia del huésped.

Si bien, originalmente, también se liberaron parasitoides en jaulas confinadas en una parcela experimental de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Alto Valle en 2005, debido a la pérdida parcial y/o total del material (rotura y robo de las jaulas) no se obtuvieron resultados de estas liberaciones.

M. ridens

A fines de febrero y principios de marzo de 2005, en el INTA Castelar, en una parcela de manzanos se seleccionaron 4 árboles al azar y se dispusieron jaulas de confinamiento (jaulas de “voile” de 90 cm x 140 cm) abarcando una o dos ramas por árbol (figura 5.1 A). Por jaula se liberaron 25 parejas de adultos de *M. ridens* de 2 - 3 días de edad y sin contacto previo con el huésped y se colocaron pequeñas placas de acetato (4 x 3 cm) con trazas de miel como alimento (figura 5.1 D). La actividad del parasitoide se evaluó mediante el empleo de “fajas centinela” (figura 5.1 E), a razón de 5 por jaula. Estas

consistían en tiras de cartón corrugado (2 cm ancho) plegadas, contenienddo cada una 20 larvas del último estadio de *C. pomonella* provenientes del laboratorio. Se realizaron dos exposiciones de los parasitoides a sus huéspedes: una primera exposición de 4 días, luego de la cual se retiraron y recambiaron las fajas centinela. Mientras que la segunda exposición fue de 8 días. Diariamente las jaulas fueron revisadas y se registró la presencia y actividad de los parasitoides. Transcurrido el tiempo de exposición las fajas centinelas fueron retiradas de las jaulas y acondicionadas en el laboratorio dentro de recipientes plásticos (10 cm x 8 cm) con tapa de “voile”. Los recipientes fueron mantenidos en una cámara de cría en condiciones controladas: temperatura 25 ± 3 °C, humedad de 40 - 60% e iluminación natural hasta la emergencia de los adultos. Se registraron la cantidad de larvas del huésped parasitadas y no parasitadas, y al emerger los adultos de la filial 1 de *M. ridens* se registró la cantidad de individuos y el sexo de cada uno. A partir de los datos obtenidos se estimaron los siguientes parámetros:

- a. el porcentaje de parasitismo, definido como:

$$\frac{\text{cantidad larvas parasitadas}}{\text{cantidad larvas expuestas}} \times 100$$

En el cálculo de este parámetro se excluyeron del análisis las larvas del huésped que se encontraron muertas.

- b. la progenie, definida como el total de individuos obtenidos de la filial 1,
 c. la proporción sexual, definida como la cantidad de progenie hembra respecto del total de la descendencia.

A. quadridentata

En enero de 2007 se colocaron 4 jaulas de confinamiento en el INTA Castelar en una parcela de manzanos, una por árbol siguiendo la metodología descrita para *M. ridens*. En cada jaula se liberaron 10 - 14 hembras y 5 - 7 machos adultos de 1 - 2 días de edad, sin contacto previo con el huésped, y se colocaron acetatos (4x3 cm) con miel como alimento (figura 5.1 B y C). Además, por jaula se ubicaron 5 manzanas (4 - 5 cm) con huevos de *C. pomonella* ≤ 24 h. edad durante dos días, las que fueron atadas en las ramas de los árboles. Las manzanas fueron previamente infestadas en el laboratorio, siendo expuestas durante 1 día en jaulas con adultos de *C. pomonella*. Luego del periodo de exposición, se retiraron las frutas de las jaulas y para evaluar el parasitismo

se realizó la disección de los huevos del huésped en el laboratorio, empleando una lupa binocular y utilizando una gota de solución fisiológica como diluyente. Se registró la cantidad de huevos del huésped no parasitados y parasitados, y en estos últimos se contabilizó la cantidad de huevos del parasitoide por huevo del huésped. Se estimó el porcentaje de parasitismo como:

$$\frac{\text{cantidad huevos parasitados}}{\text{cantidad huevos expuestos}} \times 100$$



Figura 5.1. Liberaciones confinadas de *M. ridens* y *A. quadridentata*. **A.** Aspecto general de parcela experimental de manzanos del INTA Castelar. **B. y C.** Detalle del interior de la jaula de liberación de *A. quadridentata*, donde se observan las manzanas con los huevos de la plaga (flechas naranjas) y los acetatos con el alimento (flechas negras). **D.** Interior de una jaula de liberación de *M. ridens* donde se observan las fajas centinelas con larvas del huésped (flecha azul). **E.** Detalle de una faja centinela conteniendo larvas de *C. pomonella* en su interior.

Resultados y discusión

M. ridens

Durante el ensayo, las temperaturas medias registradas variaron entre un máximo de $27,6 \pm 4,2$ °C (rango: 23 - 34,8 °C), y un mínimo de $14,8 \pm 4,5$ (rango: 6,6 - 21,3 °C). La humedad relativa varió entre 52 y 85% y se registraron intensas lluvias durante dos días consecutivos alcanzando 83 mm de precipitaciones (serie datos meteorológicos del Instituto de Clima y Agua, CRN, INTA Castelar). En la primera exposición los valores de parasitismo de *M. ridens* por jaula oscilaron entre 41 y 63% (figura 5.2), siendo el promedio del porcentaje de parasitismo de $49,7 \pm 4,7$ larvas de *C. pomonella* parasitadas/jaula. La progenie media por jaula fue de $74 \pm 4,65$ adultos (media \pm error estándar) (tabla 5.1) y la proporción de sexos fue sesgada hacia las hembras en todas las jaulas ($> 0,5$) (tabla 5.1). La proporción de sexos de *M. ridens* sobre *C. pomonella* aquí obtenida (valores entre 0,52 - 0,68) concuerda con datos previos para esta especie en condiciones de laboratorio, donde se menciona una proporción de sexos sesgada hacia las hembras ($0,61 \pm 0,04$ hembras/progenie total) (Bezmer y Mills, 2003). Los valores de parasitismo obtenidos en este trabajo en condiciones de semi-campo (promedio: $49,7 \pm 4,7\%$ larvas huésped parasitadas) se hallaron en el rango del valor obtenido para la población de esta especie que se mantiene en condiciones controladas de laboratorio en el IILB (parasitismo: $43,4 \pm 2\%$ larvas huésped parasitadas) (Capítulo 1 de la presente tesis).

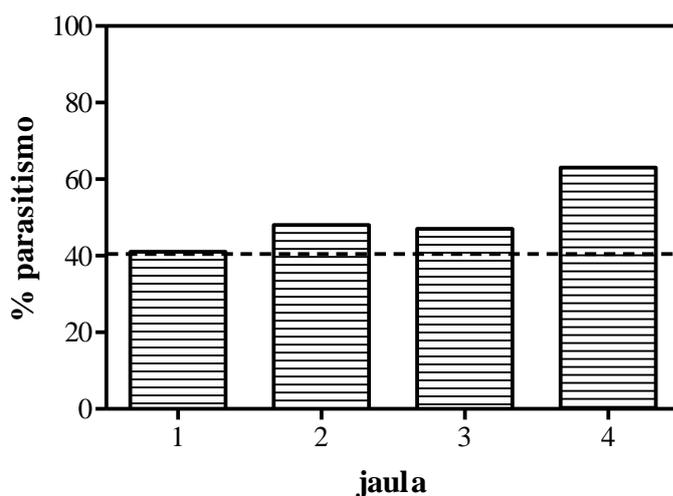


Figura 5.2. Porcentaje de parasitismo de *M. ridens* en el primer período de exposición en las jaulas de confinamiento en una parcela experimental de manzanos.

Tabla 5.1. Progenie y proporción de sexos de *M. ridens* en el primer período de exposición en jaulas de confinamiento en una parcela experimental de manzanos.

Jaula	Progenie total	Proporción de sexos
1	77	0,68
2	85	0,52
3	71	0,59
4	63	0,57

En el segundo período de exposición la progenie obtenida fue menor, de $11 \pm 2,90$ individuos (media \pm error estándar). Los bajos valores de descendencia del parasitoide registrados en este período pueden deberse a la mortalidad de los individuos asociada a las intensas lluvias registradas durante dos días (83 mm), luego de las cuales no se observaron individuos vivos. Además, en este período se registraron escapes en 2 jaulas de confinamiento. Debido a los pocos individuos obtenidos de la filial 1 del parasitoide en este periodo no se calculó el porcentaje de parasitismo y la proporción sexual.

A. quadridentata

Durante el ensayo, las temperaturas medias registradas variaron entre una máxima de $29,9 \pm 0,9$ °C (rango: 29 - 30,8 °C), y una mínima de $20,7 \pm 0,9$ (rango: 19,8 - 21,6 °C). La humedad relativa varió entre 80 y 85%, y se registraron lluvias durante 2 días con un total de 11 mm de agua acumulados (serie datos meteorológicos del Instituto de Clima y Agua, CRN, INTA Castelar). Los valores de parasitismo registrados para esta especie fueron \geq al 60% (figura 5.3), con un valor promedio del porcentaje de parasitismo de $73,5 \pm 4,3\%$ huevos de *C. pomonella* parasitados/jaula. En todas las jaulas se registraron eventos de superparasitismo (presencia de más de un huevo del parasitoide por huevo del huésped), y se observó un máximo de 4 huevos del parasitoide/huevo del huésped. El porcentaje de huevos del huésped con eventos de superparasitismo fue cercano al 40% de los huevos expuestos en dos de las jaulas de liberación (tabla 5.2). En los parasitoides el comportamiento de superparasitismo ha sido registrado en numerosas especies. En ciertas situaciones este comportamiento puede resultar beneficioso, como en el caso de las hembras de endoparasitoides que atacan hospederos recientemente parasitados, con las defensas disminuidas (Godfray, 1994). En *A. quadridentata* este tipo de comportamiento ha sido observado en condiciones controladas de laboratorio (Cox, 1932; Rosemberg, 1934). En el presente estudio se confirmó este fenómeno en condiciones de confinamiento en el campo, en huevos de *C. pomonella*. Este tipo de comportamiento depende de factores como la tasa de encuentro del parasitoide con huéspedes parasitados y no parasitados, y de características internas del parasitoide (estado nutricional, cantidad de huevos maduros, etc.) (Godfray, 1994). En este estudio, la presencia de eventos de superparasitismo podría deberse a que la cantidad de huevos de *C. pomonella* ofrecidos fue reducida, se expusieron un promedio de $51 \pm 12,8$ huevos del huésped (tabla 5.2) durante 2 días a un grupo de 10 - 14 hembras en cada jaula, y en estudios realizados en esta tesis (capítulo 2) se registró que las hembras de esta especie tienen una fecundidad promedio diaria de 22,27 huevos/hembra/día en condiciones de laboratorio. Además, el mayor valor de porcentaje de huevos del huésped superparasitados se observó en la jaula donde la cantidad de huevos del huésped ofrecida fue menor (13 huevos del huésped).

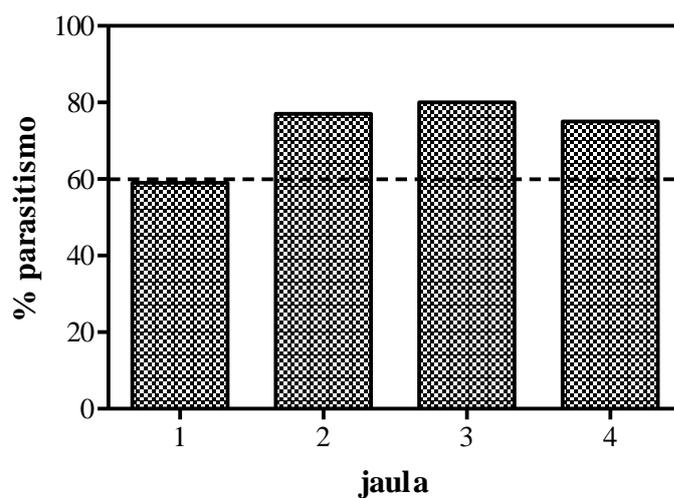


Figura 5.3. Porcentaje de parasitismo de *A. quadridentata* en las jaulas de confinamiento en una parcela experimental de manzanos.

Tabla 5.2. Porcentaje de huevos del huésped superparasitados por *A. quadridentatata* (HSP) (media \pm EE), cantidad de huevos de *C. pomonella* (CP) expuestos por manzana (media \pm EE) y por jaula en la liberación confinada en una parcela experimental de manzanos.

Jaula	% HSP	Huevos CP/ manzana	Huevos CP/jaula
1	5,6 \pm 3,4	12,2 \pm 4,7	61
2	29,3 \pm 7,4	14 \pm 3,7	70
3	41,3 \pm 7,2	12 \pm 4,8	60
4	44,4 \pm 5,6	4,3 \pm 1,2	13

En conclusión, los adultos de *M. ridens* y *A. quadridentata*, provenientes de las líneas de cría de laboratorio del IILB, se mantuvieron activos y fueron capaces de reproducirse en presencia del huésped en condiciones de semi-campo en manzanos durante la época estival en la región metropolitana de la provincia de Buenos Aires, con temperaturas máximas de $27,6 \pm 4,2$ °C para *M. ridens* y de $29,9 \pm 0,9$ °C para *A. quadridentata*. Los valores de parasitismo registrados para ambas especies fueron altos: con valores $\geq 40\%$ de parasitismo de *M. ridens* en todas las jaulas, y con valores superiores al 70% de parasitismo de *A. quadridentata* en el 75% de las jaulas. La información existente sobre el parasitismo de los enemigos naturales nativos es escasa y los entomófagos citados son especies generalistas u oportunistas (Botto, 2003; Torrén y Tortosa, 2005). En el Alto Valle de Río Negro se destaca la presencia de *Goniozus legneri*, que es un ectoparásitoide generalista (Garrido *et al.*, 2005). Para esta especie se mencionan valores menores al 8% de parasitismo (rango: 0,5 - 7,5%), en condiciones de semi-campo (jaulas de “voile” 30x40 cm) durante la temporada estival y en una parcela experimental de manzanos del Alto Valle de Río Negro (Garrido, 2010). Si bien los resultados se refieren a diferentes especies y fueron realizados en localidades distintas con condiciones ambientales particulares, se resalta la importancia de incorporar en el sistema de producción local a los parasitoides de *C. pomonella* recientemente importados en el país, con el propósito de fortalecer el gremio de enemigos naturales presentes en la región. En el siguiente apartado de la tesis se describe la colonización de las especies exóticas en el sistema de producción local.

5.b) Evaluación de la colonización y el establecimiento de *Mastrus ridens* y *Ascogaster quadridentata* en montes de pomáceas de la región del Alto Valle de Río Negro.

Materiales y métodos

Se realizaron múltiples liberaciones de *M. ridens* y *A. quadridentata* desde 2005 a 2010 en montes frutales en la principal región productora de pomáceas de Argentina, el Alto Valle de Río Negro.

Área de trabajo

El Alto Valle de Río Negro está ubicado entre los 38° 40` y 39° 20` de latitud sur y entre 60° 30` y 66° 30` al oeste del meridiano de Greenwich, tiene forma de “Y” y se encuentra limitado a ambos lados por barrancas de formación sedimentaria. El valle se extiende a lo largo de 65 km junto al río Neuquén, 50 km junto al río Limay y 120 km del curso superior del río Negro, y abarca las ciudades de Cipolletti, General Roca, Villa Regina y otras ciudades menores (figura 5.4)

El clima es continental, templado y árido. La temperatura media anual del área de estudio es de 15,5°C, con máximas medias que oscilan entre 13,4°C (junio) y 30,4°C (enero) y mínimas medias entre -0,7°C (julio) y 13,1°C (enero). Los valores extremos alcanzan su máximo en enero (38,7°C) y su mínimo en junio (-10,3°C). La precipitación media anual es de 190 mm concentrada principalmente en invierno. Se registran heladas primaverales y predominan los vientos del Oeste y Sudoeste, con mayor intensidad en primavera y verano. Para disminuir el impacto del viento sobre los cultivos, se disponen “cortinas” de álamos. Las heladas constituyen, junto con la sequía, uno de los factores de mayor importancia en su acción perjudicial en los cultivos (Cichón y Fernández, 2003; Worcel, 2006)

El área productiva comprende unas 100 000 ha bajo riego de las cuales 46 980 están cultivadas con frutales de pepita, distribuidas en alrededor de 3 400 explotaciones agrícolas (Villareal *et al.*, 2010).



Figura 5.4. Mapa geopolítico donde se indica con un círculo rojo a la región del Alto Valle de Río Negro. Fuente: Instituto Geográfico Militar de la República Argentina

En relación con el manejo sanitario de los montes de pomáceas, existe en la región una diversidad de situaciones. Coexisten montes en riesgo fitosanitario (manejo fitosanitario deficiente) y montes en situación de abandono (sin manejo fitosanitario) con montes frutales donde se aplican estrategias de control de plagas, los que representan más del 90% de la superficie cultivada. En estos últimos es importante diferenciar a los montes con producción orgánica (sin utilización de insecticidas de síntesis) de los montes con producción convencional que aplican insecticidas de síntesis con un calendario fijo, con 10 - 11 aplicaciones por temporada (incluyendo insecticidas organofosforados de amplio espectro) y también de los montes con un manejo integrado que emplean la técnica de confusión sexual (TCS) combinada con el uso racional de insecticidas, con 4 - 5 aplicaciones de insecticidas selectivos, los que corresponden a la mayor superficie

cultivada con pomáceas del valle (Cichón, *et al.*, 2001b; INTA, 2008; Villareal *et al.*, 2010)

Sitios de liberación

Se seleccionaron 6 montes frutales de pomáceas en Gral. Roca y en las localidades linderas. Los montes seleccionados eran montes abandonados que presentaban las siguientes características: no tuvieron aplicación de insecticidas y poseían especies arbustivas y malezas; a excepción del monte utilizado en la última temporada de liberación que fue un monte de producción orgánica (figura 5.5). Los sitios de liberación fueron numerados de 1 a 6 y sus principales características se presentan en la tabla 5.3.



Figura 5.5. Chacras donde se liberaron a *M. ridens* y *A. quadridentata* en el Alto Valle de Río Negro. **A y B.** chacra 1. **C, D, E y F.** chacra 3. **G.** chacra 6. **H e I.** chacra 5.

Tabla 5.3. Características de los sitios de liberación de *M. ridens* y *A. quadridentata*, correspondientes a seis montes frutales de la región.

Nombre chacra	Numeración	Localidad	Fruta	superficie cuadro (ha)
162	1	J. Gómez	manzana-pera	0,68
Miras Trabalon	2	Gral. Roca	manzana	0,36
Antolini	3	Gral. Roca	manzana	0,53
Fernández	4	Cervantes	manzana	0,3
Sánchez	5	Allen	manzana	0,96
Gordillo	6	Allen	pera	1,39

Colonización de los enemigos naturales

Se liberaron adultos de *M. ridens* y *A. quadridentata* provenientes de las crías mantenidas en el IILB. Los insectos fueron transportados por tierra hasta los sitios de liberación, y para su envío fueron acondicionados en recipientes plásticos (10 cm de alto y 8 cm de diámetro con tapa de “voile”) a razón de 100 individuos por recipiente. Los recipientes se acondicionaron con papel absorbente humedecido con agua y trazas de miel como alimento, y durante el traslado se mantuvieron en contenedores térmicos con refrigerantes (figura 5.7.A).

Los adultos de ambos parasitoides fueron liberados periódicamente durante las temporadas de producción de pomáceas en la región (septiembre-abril), en las parcelas seleccionadas (tabla 5.4.). *M. ridens* fue liberado cada 15 días, y se liberaron adultos (hembras y machos) de 2 - 4 días de edad, los que previamente a su envío habían sido almacenados en frío ($11,5 \pm 2$ °C) desde su emergencia para obtener cantidades suficientes de insectos. En las temporadas posteriores al 2006/07 no se liberaron adultos de esta especie debido a su baja disponibilidad en el laboratorio. Los adultos de *A. quadridentata* inicialmente fueron liberados en cinco fechas por temporada. Luego, a partir de la temporada 2007/08 se ajustó la metodología de liberación y se redujo el número de liberaciones a tres por temporada en concordancia con los picos de huevos de *C. pomonella* que se registran en la región (figura 5.6) (Cichón y Fernández, 2003). Además, en la 1^{ra} temporada (2005/06) se liberaron adultos de *A. quadridentata* que

fueron almacenados en frío ($11,5 \pm 2$ °C) desde su emergencia hasta 2 a 5 días. Mientras que en las temporadas posteriores, debido a que se observó mortalidad en los individuos almacenados en frío, se utilizaron adultos que fueron recolectados el mismo día de su envío o, en su defecto, el día anterior. En la temporada 2008/09 no se liberaron adultos de *A. quadridentata* debido a su escasa disponibilidad en el laboratorio.

Tabla 5.4. Liberaciones de *M. ridens* (MR) y *A. quadridentata* (AQ) en el Alto Valle de Rio Negro de 2005 a 2010. Para AQ se indica la cantidad total de individuos liberados de ambos sexos.

Temporada	Chacra	Enemigo natural	Parcelas liberación	Período de liberación (n° de liberaciones)	Adultos liberados por parcela
2005/06	1	MR	2	noviembre a marzo (9)	830 ♀ y 510 ♂
		AQ	1	noviembre a marzo (5)	365
	2	MR	1	noviembre a marzo (9)	725 ♀ y 555 ♂
		AQ	2	noviembre a marzo (5)	365
2006/07	3	MR	1	septiembre a diciembre (7)	425 ♀ y 440 ♂
		AQ	1	septiembre a febrero (5)	490
	4	MR	1	septiembre a diciembre (7)	500 ♀ y 440 ♂
		AQ	1	septiembre a febrero (5)	490
2007/08	3	AQ	1	diciembre a febrero (3)	490
	5	AQ	1	diciembre a febrero (3)	470
2009/10	6	AQ	2	diciembre a febrero (3)	220

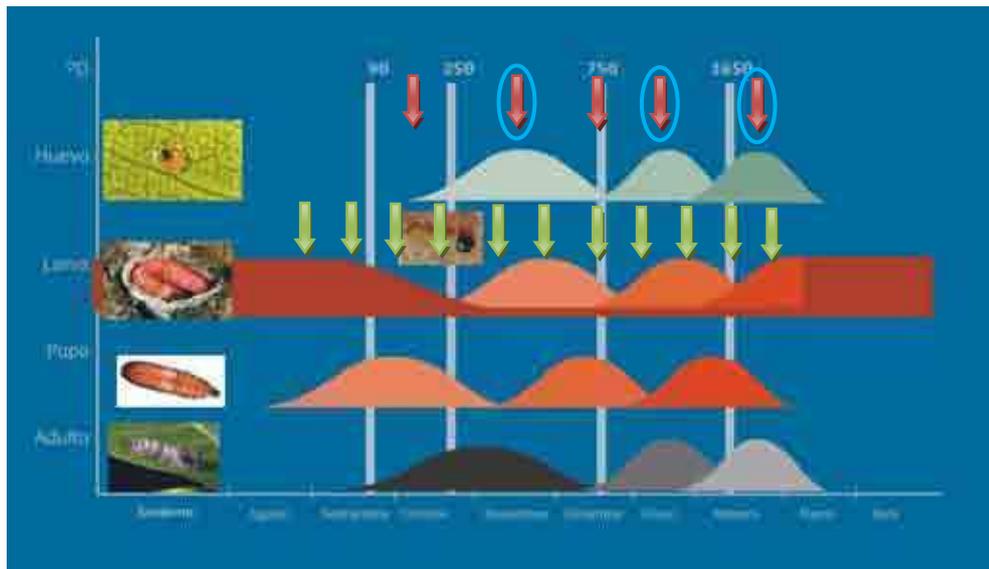


Figura 5.6. Desarrollo estacional de *C. pomonella* en el Alto Valle de Río Negro (gráfico tomado de Cichón y Fernández, 2008). Se indican con flechas rojas las fechas de liberación de *A. quadridentata* y resaltadas con círculos las liberaciones a partir de la temporada 2006/07 en coincidencia con los picos de huevos de la plaga. Las flechas verdes indican las liberaciones de *M. ridens*.

Monitoreo

Se realizaron monitoreos periódicos de los adultos y las larvas de *C. pomonella* para estimar su abundancia poblacional. Para el monitoreo de los adultos de la plaga se usaron trampas combo (de 3 mg de coldemone + 3 mg de kairomona) ubicadas en el tercio superior de los árboles (figura 5.7.D). Las trampas se colocaron poco antes de la emergencia de los primeros adultos (primera generación), en coincidencia con la floración del manzano de la variedad *Red Delicious* (última semana de septiembre), hasta la cosecha (febrero/marzo). Las trampas se revisaron 1 vez por semana, registrándose el número de adultos de *C. pomonella* capturados.

Para el monitoreo de la abundancia de las larvas de la plaga y para estimar la presencia y abundancia de los enemigos naturales se colocaron “fajas trampa” de cartón corrugado en los sitios de liberación. Las fajas consistieron en tiras de cartón de 8 - 10 cm de ancho, que se doblaron por la mitad juntando los extremos, de forma tal que la parte acanalada del cartón quedara hacia adentro (figura 5.7 B y C). De este modo las larvas de *C. pomonella* que migran fuera de los frutos se ubican en los orificios del cartón en busca de un lugar donde tejer el capullo y transformarse en pupas. Las fajas se

ubicaron en el tronco o rama principal de los árboles frutales, dependiendo de la carga de frutas, y a razón de una faja por árbol. Una vez que se retiraron las fajas del campo, estas fueron transportadas al IILB. En el laboratorio, las fajas fueron almacenadas en frío ($11,5 \pm 2$ °C) en bolsas de polietileno negras hasta su revisión. Se registró por faja la cantidad de larvas de *C. pomonella* parasitadas, muertas y no parasitadas. Las larvas de *C. pomonella* parasitadas por *A. quadridentata* se identificaron de acuerdo con su menor tamaño (Cox, 1932), mientras que en el caso de *M. ridens*, al ser un ectoparásito, se registró la presencia de huevos, larvas, o pupas del parasitoide sobre las larvas del huésped. Las larvas del huésped parasitadas por ambas especies se dispusieron en cajas de Petri de plástico (5,5 cm) acondicionadas con tiras de cartón corrugado de 2 x 4 cm, hasta la emergencia de los adultos, y se mantuvieron en una cámara en condiciones controladas (25 ± 2 °C, 40 - 70% HR e iluminación natural). Los adultos obtenidos fueron identificados por especie de parasitoide y se determinó el sexo de cada ejemplar. Cuando fue posible, de acuerdo a la disponibilidad de material suficiente, se estimó la proporción sexual, definida como la cantidad de hembras respecto del total de adultos emergidos. Con los datos obtenidos se estimó el **porcentaje de parasitismo** para cada especie de parasitoide como:

$$\frac{n^{\circ} \text{ larvas } C.pomonella \text{ parasitadas por especie de parasitoide}}{n^{\circ} \text{ de larvas de } C.pomonella \text{ colectadas}} \times 100$$

Las larvas del huésped muertas por causas desconocidas se excluyeron en el cálculo del porcentaje de parasitismo ya que no fue posible identificar la causa de su muerte y si estuvieron o no parasitadas.



Figura 5.7. Colonización de *M. ridens* y *A. quadridentata* en el Alto Valle de Río Negro. **A.** Recipientes de envío y liberación de los adultos en el campo. **B y C.** Colocación de fajas trampa en el tronco de los árboles frutales. **D.** Trampa combo para captura de adultos de *C. pomonella*.

Los monitoreos con “fajas trampa” se realizaron en la misma temporada de liberación de los enemigos naturales para evaluar si los agentes liberados sobrevivían y se reproducían durante la temporada y, en años subsiguientes, para evaluar si los insectos liberados se establecían en el campo y estudiar su dispersión.

En los monitoreos en la misma temporada de liberación, las fajas trampa se ubicaron siguiendo una disposición concéntrica alrededor del árbol de liberación. En la tabla 5.5 se detallan los muestreos para cada temporada. En la 1^{ra} temporada (2005/06) por parcela se colocaron 50 fajas por sitio para *M. ridens* y 13 fajas para *A. quadridentata*. Inicialmente las fajas se recambiaron a lo largo de la temporada en función del ciclo de vida de cada especie para conocer el desarrollo estacional de los insectos en el campo. Para *M. ridens* se recambiaron cada 15 días y para *A.*

quadridentata cada 25 días. Posteriormente, a partir de la temporada 2006/07, debido a la muy baja captura de larvas de *C. pomonella* obtenidas en las fajas durante los meses de septiembre a enero, se ajustó y unificó el criterio de muestreo para ambos parasitoides: se colocaron 25 fajas trampa (figura 5.8) hacia el final de la temporada (febrero-marzo), permaneciendo en el campo hasta la cosecha. Las fajas permanecieron en el campo por al menos 15 días para obtener una mayor captura de larvas del huésped, mayoritariamente de larvas diapausantes, de acuerdo con el desarrollo estacional de la plaga en la región (Cichón y Fernández, 2003).

Tabla 5.5. Monitoreos con faja trampa en la misma temporada de liberación de *M. ridens* (MR) y *A. quadridentata* (AQ) en el Alto Valle de Río Negro de 2005 a 2010. A partir de la temporada 2006/07 se ajustó el sistema de monitoreo para las dos especies de parasitoides.

Temporada	Chacra	Enemigo natural	Parcelas liberación	Período de monitoreo	Monitoreos (cantidad fajas/monitoreo)
2005/06	1	MR	2	noviembre a abril	12 (50)
		AQ	1	noviembre a abril	7 (13)
	2	MR	1	noviembre a abril	12 (50)
		AQ	2	noviembre a abril	7 (13)
2006/07	3	MR	1	febrero	2 (25)
		AQ	1	febrero	2 (25)
	4	MR	1	febrero	2 (25)
		AQ	1	febrero	2 (25)
2007/08	3	AQ	1	febrero a marzo	3 (25)
	5	AQ	1	febrero a marzo	3 (25)
2009/10	6	AQ	2	enero a marzo	4 (25)

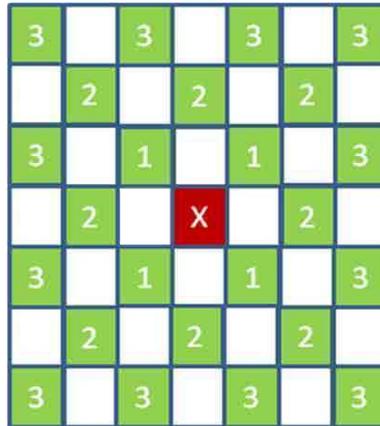


Figura 5.8. Diseño de muestreo concéntrico con fajas trampa. En rojo se indica el centro de liberación de los enemigos naturales y en verde los árboles con faja trampa (25). La numeración indica los árboles con faja trampa que forman los cuadrados a distancias crecientes del árbol de liberación.

En los monitoreos en los años subsiguientes a la liberación de los enemigos naturales se colocó un mayor número de fajas por sitio de forma de abarcar una superficie mayor del monte frutal. Las mismas se ubicaron siguiendo una disposición regular asentada en el patrón “árbol de por medio” (un árbol con faja y el siguiente en la misma fila sin faja). Se colocaron las fajas trampa hacia el final de la temporada (febrero-marzo), permaneciendo en el campo por alrededor de 15 días. En las temporadas 2008/09 y 2009/10 se realizaron monitoreos en la única chacra donde hubo una continuidad del cultivo y de las condiciones de manejo del monte frutal, la chacra 3, y se ubicaron alrededor de 60 fajas por fecha de monitoreo (tabla 5.6). Posteriormente, en la última temporada de evaluación (2010/11) se realizó un monitoreo más extenso para estudiar la dispersión de los parasitoides. Se colocaron en total 1 660 fajas distribuidas en 7 charcas de la zona, incluyendo la chacra 1 y 3, y otros cinco montes de manzanos en las cercanías a las chacras de liberación (chacras 7 a 11) donde se liberó y recobró a los parasitoides previamente. La cantidad de fajas trampa por sitio fue variable y dependió de la extensión del cuadro de implantación de los frutales de cada sitio, de la presencia de fruta en los árboles y de la disponibilidad de tiempo (tabla 5.6).

Tabla 5.6. Monitoreos con faja trampa realizados en las temporadas posteriores a la liberación de los parasitoides en el Alto Valle de Río Negro de 2008 a 2011. En la última temporada de evaluación (2010/11) se amplió el área de muestreo.

Temporada	Sitio	Localidad	Total fajas	Situación manejo
2008/09	chacra 3	Gral. Roca	205*	monte abandonado
2009/10	chacra 3	Gral. Roca	69	monte abandonado
2010/11	chacra 1	J. Gómez	603	monte experimental con empleo de insecticidas
	chacra 3	Gral. Roca	385	monte abandonado
	chacra 7	J. Gómez	150	monte convencional
	chacra 8	Gral. Roca	37	monte convencional
	chacra 9	Gral. Roca	282	monte abandonado
	chacra 10	Gral. Roca	103	monte convencional
	chacra 11	Cervantes	100	monte convencional

*Se hicieron 3 monitoreos en esta temporada

Resultados y discusión

Los sitios de liberación de los enemigos naturales se muestran en la figura 5.9. En total se liberaron en la región alrededor de 2 500 ♂ y 3 300 ♀ de *M. ridens* y 3 400 individuos de *A. quadridentata* en seis chacras desde el 2005 al 2009 (chacras 1 a 6).



Figura 5.9. Sitios de liberación de *M. ridens* y *A. quadridentata* en el Alto Valle de Río Negro. Los puntos de marcación rojos indican las chacras donde se liberó y recobró a los parasitoides y los puntos de marcación celestes indican las chacras donde se liberó a los parasitoides pero no hubo recobro. Imagen tomada del Google Earth, Inav/geosistemas SRL en 2015.

El porcentaje de parasitismo por faja obtenido en la temporada de liberación de los enemigos naturales en las distintas chacras fue variable, el máximo parasitismo de *M. ridens* registrado fue alrededor del 12% y para *A. quadridentata* fue del 8% (tabla 5.7). Además, hubo sitios donde no se recobraron a los parasitoides. Las liberaciones pueden fallar por numerosas razones, algunas de las cuales están relacionadas con el agente liberado (estado nutricional, estatus de apareamiento, edad, etc.), otras con el sitio o comunidad receptora (aspectos asociados al manejo del monte frutal) o con las técnicas usadas (liberación de adultos almacenados en frío, recipientes usados para almacenamiento y liberación, etc.). En este estudio, los sitios de liberación presentaron diferencias en cuanto a la variedad cultivada, el estado nutricional y de desarrollo de los frutales y las prácticas culturales de manejo del cultivo (frecuencia de riego y poda).

Un aspecto importante asociado al sitio de liberación o comunidad receptora que puede afectar la colonización de los enemigos naturales es la abundancia de la especie hospedera (Van Driesche y Bellows, 1996). En particular, para la región del Alto Valle de Río Negro se menciona que si se capturan una o más larvas de *C. pomonella* por

árbol (faja) se espera una presión alta de la plaga en montes productivos (SINAVIMO, 2004). Además, en una chacra con un manejo fitosanitario adecuado, que se corresponde con una densidad baja de la plaga, se espera una captura de adultos en trampa de feromonas por semana en promedio ≤ 1 individuo; mientras que en un monte abandonado las capturas de adultos pueden alcanzar los 20 individuos por semana (Ing. D’Herve, F. de FunBaPa, comunicación personal). En este trabajo es importante destacar que si bien los valores de las capturas de adultos en las trampas combo y la captura de larvas *C. pomonella* en las fajas trampa fueron variables entre los sitios evaluados, en todas las parcelas de liberación se evidenció una alta densidad de la plaga. Las capturas de adultos en las trampas presentaron valores promedio mayores a 3 adultos/trampa/semana y las capturas promedio de larvas fueron mayores a 1,5 larvas/faja en la mayoría de los sitios (chacras 1 a 4) (tabla 5.7). En las chacras 5 y 6 los valores de capturas de larvas de *C. pomonella* fueron muy bajos ($< 0,6$) (tabla 5.7) y esto estuvo asociado a la escasez de fruta en los árboles. La carga de frutos en los manzanos y perales puede verse afectada por factores climáticos al momento de floración, como las heladas, y por factores asociados al manejo del cultivo, como la poda de fructificación (Benítez *et al.*, 2005). En el caso particular de estas chacras (5 y 6) la ausencia de parasitismo de los enemigos naturales puede relacionarse con la muy baja abundancia de larvas de *C. pomonella* registrada en las fajas trampa. En las chacras 1, 2 y 4 si bien se recobraron a los enemigos naturales durante la temporada de su liberación no fue posible evaluar el progreso de su establecimiento por diversas razones que son ajenas a este estudio, que van desde parcelas en donde se secaron los árboles frutales hasta cambios de cultivo (tabla 5.7).

Tabla 5.7. Resumen de los resultados obtenidos en los monitoreos durante la temporada de liberación de los enemigos naturales de 2005 a 2010 en el Alto Valle de Río Negro. En la cuarta columna se muestra el rango del porcentaje de parasitismo promedio por faja obtenido por chacra para cada fecha de monitoreo.

Chacra	Temporada	Especie de enemigo natural liberada	Porcentaje parasitismo/faja (n = fajas)	Larvas CP/faja (M ± EE)	Adultos CP/semana (M ± EE)	Situación de manejo posterior a liberación de los parasitoides
1	2005/06	MR y AQ	MR: 0 - 7,6 (50) AQ: 0 (13)	1,9 ± 0,3	6,5 ± 1,7	uso insecticidas
2	2005/06	MR y AQ	MR: 0 - 12,4 (50) AQ: 0 (13)	8,29 ± 1,2	8,3 ± 2,2	cambio cultivo: siembra alfalfa
3	2006/07	MR y AQ	MR: 0 (25) AQ: 0,3 - 3,7 (25)	16,2 ± 1,2	10,5 ± 2	continuidad monte sin uso de insecticidas
4	2006/07	MR y AQ	MR: 0 (25) AQ: 0 - 7,9 (25)	5,7 ± 0,6	6,6 ± 1,2	cambio cultivo: siembra alfalfa
5	2007/08	AQ	AQ: 0 (25)	0,2 ± 0,01	8,2 ± 1,2	monte seco
6	2009/10	AQ	AQ: 0 (25)	0,5 ± 0,08	3,9 ± 0,8	producción orgánica

Abreviaturas usadas: MR = *Mastrus ridens*, AQ = *Ascogaster quadridentata* y CP = *Cydia pomonella*

Debido a la continuidad del monte frutal sin la aplicación de insecticidas y con un mínimo de cuidados culturales (riego y poda), en la chacra 3 fue posible evaluar el progreso en el establecimiento de los parasitoides durante 5 temporadas consecutivas (2006 - 2011). En esta chacra en la primera temporada de evaluación (2006/07) se liberaron adultos de ambos parasitoides mientras que en la siguiente temporada, de acuerdo a la disponibilidad de insectos en el laboratorio, se liberaron solo individuos de *A. quadridentata*. Inicialmente, en la temporada 2006/07, los niveles de parasitismo de *A. quadridentata* por faja fueron bajos (valores promedio menores al 4%) (figura 5.10.A) y el porcentaje de fajas que presentó signos de parasitismo fue del 22% (tabla 5.8). En esta temporada no se registró la presencia de *M. ridens*; mientras que en la segunda temporada sí se recobraron adultos de esta especie luego de un año de su liberación a campo, con niveles cercanos al 3% de parasitismo promedio por faja, sugiriendo la presencia de una población reproductiva activa capaz de sobrevivir durante el invierno (establecimiento temporal). Los valores de parasitismo de *A. quadridentata* en la segunda temporada (2007/08) resultaron mayores (rango promedio: 6 - 38%) a los registrados para esta especie en la temporada anterior; además el porcentaje de fajas en las que se observó parasitismo fue también mayor, llegando al

39% de los árboles muestreados. Posteriormente, en la tercer temporada de evaluación (2008/09) se recobraron adultos de *A. quadridentata* con niveles de parasitismo superiores o iguales al 5%, a un año de su última liberación en el campo, indicando que esta especie también fue capaz de sobrevivir durante el invierno en la región. Asimismo, en las dos últimas temporadas de evaluación (2009/10 y 2010//11) se registraron niveles de parasitismo de *M. ridens* cercanos al 3% y de *A. quadridentata* superiores al 20% (figura 5.10.A). En relación con la proporción sexual, los valores registrados para ambos parasitoides muestran un sesgo de la descendencia hacia los machos (valores < 0,5). Los valores obtenidos para *M. ridens* fueron cercanos a 0,4 hembras/total adultos obtenidos, mientras que para *A. quadridentata* los valores fueron menores, entre 0,12 y 0,38 hembras/total adultos (tabla 5.8).

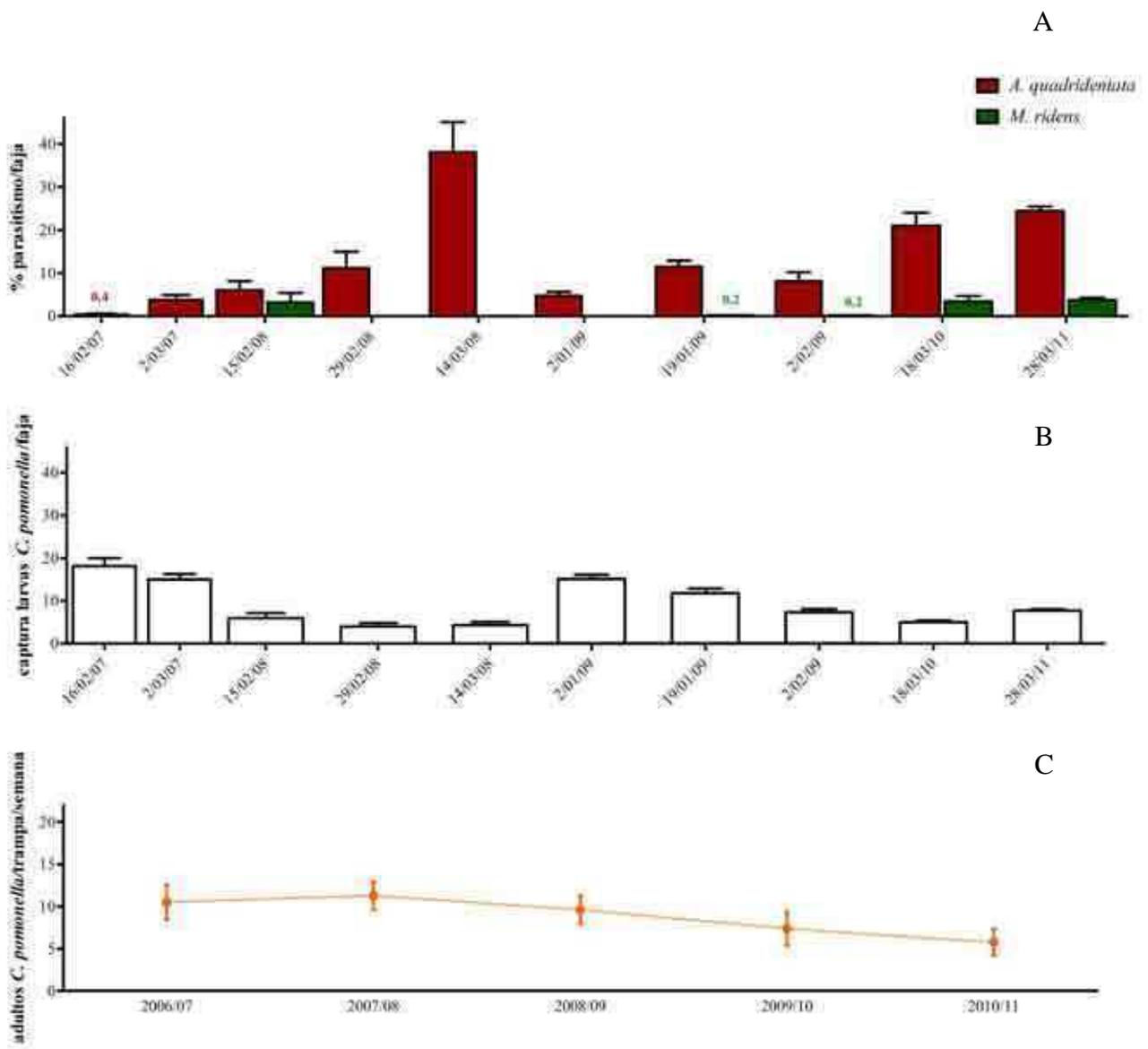


Figura 5.10. Evaluación del establecimiento de *A. quadridentata* y *M. ridens* en la chacra 3 en cinco temporadas consecutivas de 2006 a 2011. **A-** Niveles de parasitismo de *A. quadridentata* y *M. ridens* por faja trampa (media \pm error estándar). **B-** Captura de larvas de *C. pomonella* en las fajas trampa (media \pm error estándar). **C-** Captura semanal de adultos de la plaga en las trampas combo (media \pm error estándar).

Tabla 5.8. Proporción sexual y porcentaje de fajas que presentaron parasitismo de *A. quadridentata* (AQ) y de *M. ridens* (MR) en la chacra 3 de 2006 a 2011.

Temporada	Proporción sexual (n)	Porcentaje fajas con parasitismo
2006/07	s/d*	AQ = 22
2007/08	s/d*	AQ = 39 MR = 9
2008/09	AQ = 0,38 (84) MR = s/d	AQ = 56 MR = s/d*
2009/10	AQ = 0,34 (64) MR = 0,43 (23)	AQ = 56 MR = 12
2010/11	AQ = 0,12 (542) MR = 0,41 (153)	AQ = 70 MR = 17

*s/d sin datos

En conclusión, las poblaciones de *M. ridens* y *A. quadridentata* han persistido en el nuevo ambiente (chacra 3). Los niveles de parasitismo de *M. ridens* obtenidos fueron variables en el tiempo con valores cercanos al 3% al cabo de cinco temporadas. El parasitismo de *A. quadridentata* fue también variable pero los valores registrados resultaron superiores a los obtenidos para *M. ridens*, alcanzando niveles mayores al 20% de parasitismo en la última temporada de evaluación (figura 5.10.A). Los datos obtenidos sugieren que ambas especies se establecieron exitosamente en el campo de acuerdo con lo mencionado por Van Driesche y Bellows (1996), estos autores proponen que el establecimiento es exitoso si los enemigos naturales se recobran en temporadas sucesivas, al menos luego de dos años desde su liberación, y sin nuevos aportes de insectos en regiones con inviernos con bajas temperaturas.

Asimismo, la chacra 3 presentó un alto nivel de infestación de la plaga a lo largo del período de evaluación (2006 - 2011). Las capturas de larvas de *C. pomonella* en las fajas trampa fueron variables, con valores promedio ≥ 5 larvas/faja (figura 5.10.B). Al inicio de la evaluación se observaron los máximos valores (cercanos a las 16 larvas de la plaga en promedio por faja) (2006/07), mientras que hacia el final de la evaluación se registraron valores bajos de capturas, de alrededor de 7 larvas promedio por faja (2010/11). Igualmente, la captura de adultos de *C. pomonella* en las trampas de feromonas presentó valores promedio mayores a los 4 individuos por semana y se observó una tendencia decreciente desde el inicio de la evaluación, donde se liberó a los

enemigos naturales, hasta el final de la evaluación, al cabo de cinco temporadas (figura 5.10.C). Si bien la captura de adultos de lepidópteros en trampas de feromonas puede verse afectada por diversos factores como el viento, la temperatura, el tipo de emisor, etc. (Cichón *et al.*, 2001a, Cichón y Fernández, 2003), la disminución registrada en las capturas durante el periodo de evaluación podría estar asociada, entre otros factores, a la presencia de una población activa de los parasitoides, los que presentaron niveles altos de parasitismo (mayor abundancia relativa) hacia el final de la evaluación. También hay que destacar que el porcentaje de fajas colectadas con signos de parasitismo fue aumentando a lo largo del período de evaluación, en *M. ridens* este valor llegó al 17% en la última temporada de evaluación y en *A. quadridentata* fue del 70%, es decir, más de la mitad de las fajas colectadas presentaron signos de parasitismo (tabla 5.8). Aunque estos resultados son promisorios es necesario realizar futuros estudios y evaluar la eficacia de los enemigos naturales para controlar a la plaga en el nuevo ambiente. Este tipo de evaluación supone el empleo de métodos experimentales o de manipulación para crear dos situaciones: sitios con la presencia de los enemigos naturales y otros solo con la presencia de la plaga (Van Driesche y Bellows, 1996).

En cuanto a los valores de parasitismo registrados en otros estudios para *M. ridens* hay que mencionar que este enemigo natural ha sido ampliamente utilizado en programas de control biológico de *C. pomonella* en Estados Unidos. Las experiencias descritas son diversas pero en términos generales los valores de parasitismo registrados en la misma temporada de liberación fueron muy variables con sitios donde no se recobró al parasitoide (con 0% de parasitismo) hasta sitios donde se mencionan altos niveles de parasitismo, llegando al 60% (Epstein *et al.*, 2003; Unruh, 1997; Caprile y Mills, 2005; Mills, 2005b). Si bien en este trabajo también se obtuvieron niveles de parasitismo variables, con sitios donde no hubo parasitismo, los valores máximos no superaron el 12%. (tabla 5.7). Las diferencias en los niveles de parasitismo registrados para esta especie pueden asociarse a las singularidades de cada estudio ya que las experiencias descritas difieren en cuanto al número de insectos liberados por sitio, la cantidad de liberaciones, la fecha de liberación, la intensidad de monitoreo (cantidad de fajas trampa por sitio), la permanencia de las fajas en el campo y también en cuanto a las características de los sitios de liberación: montes con diversas especies frutales (manzanos, perales y nogales) y diferentes situaciones de manejo del cultivo. Del mismo modo, el clima preponderante en cada región es un factor importante que puede afectar el desempeño de los enemigos naturales en el nuevo ambiente (Van Driesche y

Bellows, 1996). No obstante estas diferencias es importante destacar que mientras que en este estudio, la cantidad de insectos liberados por sitio fue del orden de los cientos de insectos, en las liberaciones realizadas en Estados Unidos la cantidad de insectos liberados fue superior (rango: 1 000 – 8 000 insectos por sitio). Además, si bien se menciona que este parasitoide se estableció exitosamente en varios estados de Estados Unidos como California, Washington y Oregón, no hay datos disponibles sobre los niveles de parasitismo de esta especie a lo largo de los años. En relación con los resultados obtenidos en este estudio, se considera importante evaluar en futuras investigaciones algunos factores que favorezcan el desempeño de *M. ridens* en el Alto Valle de Río Negro. La disponibilidad de alimento puede afectar el desempeño de los parasitoides adultos en el campo, extendiendo la vida reproductiva de las hembras (Wäckers, 2003). En tal sentido, dado que se trata de una especie sinovigénica cuyas hembras adultas necesitan alimentarse para que maduren los huevos (Bezemer y Mills, 2001) sería importante evaluar la disponibilidad y abundancia de las fuentes de nutrientes presentes en el cultivo. Las flores silvestres, las nectarinas extra florales, la presencia de homópteros y la secreción de melaza, la cobertura del suelo y la vegetación de los bordes son potenciales fuentes de recursos nutritivos para los enemigos naturales en el campo (Van Driesche y Bellows, 1996).

Acerca de los niveles de parasitismo aquí obtenidos para *A. quadridentata* en la temporada de su liberación como se mencionó anteriormente, los valores fueron variables, llegando a niveles de 8% de parasitismo (tabla 5.7) y en temporadas posteriores a su liberación se alcanzaron niveles de hasta 24% de parasitismo (figura 5.10.A). A nivel mundial esta especie se encuentra ampliamente distribuida en el centro de Europa y fue introducida en Estados Unidos en la década de 1920 y en Nueva Zelanda y Australia a principios del siglo pasado, llegando a establecerse en estos países. En la bibliografía hay numerosos trabajos que destacan la presencia de esta especie en Nueva Zelanda, Canadá y España como parasitoide de *C. pomonella* (Mc Lellam, 1972; Tomkins *et al.*, 1987; Suckling *et al.*, 2002; Miñarro y Dapeña, 2004). Los trabajos hacen mención del parasitismo natural de *A. quadridentata* en montes frutales con diversas situaciones de manejo productivo. En Nueva Zelanda se citan niveles de parasitismo variables entre las diferentes regiones y dentro de las mismas, con mayor presencia en la zona sur, donde se registraron valores entre 0 - 18% de parasitismo en chacras abandonadas (Tomkins *et al.*, 1987; Suckling *et al.*, 2002). En Canadá se registraron niveles de parasitismo entre 6 - 34% en chacras comerciales y

árboles silvestres, con los mayores niveles asociados a estos últimos (Mc Lellam, 1972); y en España en chacras experimentales se hallaron niveles de parasitismo entre 2 y 21% (Miñarro y Dapeña, 2004). Es importante destacar que los máximos niveles de parasitismo hallados estuvieron asociados a montes silvestres o chacras abandonadas, sugiriendo la importancia de estos sitios como reservorios naturales para la especie. A pesar de que los estudios difirieren en aspectos como las condiciones climáticas asociadas a cada región y la variedad de frutales y condiciones de manejo del cultivo; en términos generales, los niveles de parasitismo aquí registrados se encuentran en el rango de los valores hallados en otros países donde *A. quadridentata* está ampliamente distribuida y es un parasitoide frecuente de *C. pomonella*.

Por otro lado, en el extenso monitoreo realizado en la última temporada de evaluación (2010/11) que abarcó siete chacras de la región (figura 5.11), se registró parasitismo de ambas especies de enemigos naturales en dos sitios, la chacra 3 y en la chacra vecina a esta, la chacra 9, ambos sitios correspondieron a montes frutales abandonados. En la chacra 9 se observaron valores de parasitismo promedio de 2,5% de *M. ridens* y 7% de *A. quadridentata* y en la chacra 3, los valores registrados fueron superiores (figura 5.10.A). En los dos montes, los niveles de capturas de larvas de la plaga en fajas trampa fueron altos, los valores de la chacra 3 fueron mencionados anteriormente (figura 5.10.B) y la chacra 9 presentó una captura de larvas de *C. pomonella* mayor a los 10 individuos promedio por faja. En los restantes cinco sitios de monitoreo no se registró la presencia de los parasitoides. Estos sitios correspondieron a montes frutales donde se aplicaron insecticidas durante la temporada de producción, cuatro montes con manejo convencional y un monte experimental (tabla 5.6). En estas chacras los valores de capturas promedio de larvas de la plaga en las fajas trampa fueron muy variables (rango: 0,03 - 14,6 larvas *C. pomonella*/faja). Esto estuvo asociado a las situaciones heterogéneas de manejo productivo de las chacras evaluadas, con montes con una buena estrategia de manejo, donde las capturas fueron bajas (menores a una larva de *C. pomonella*/faja) y montes en peores condiciones de manejo, donde los valores de capturas superaron las 5 larvas/ faja en promedio.

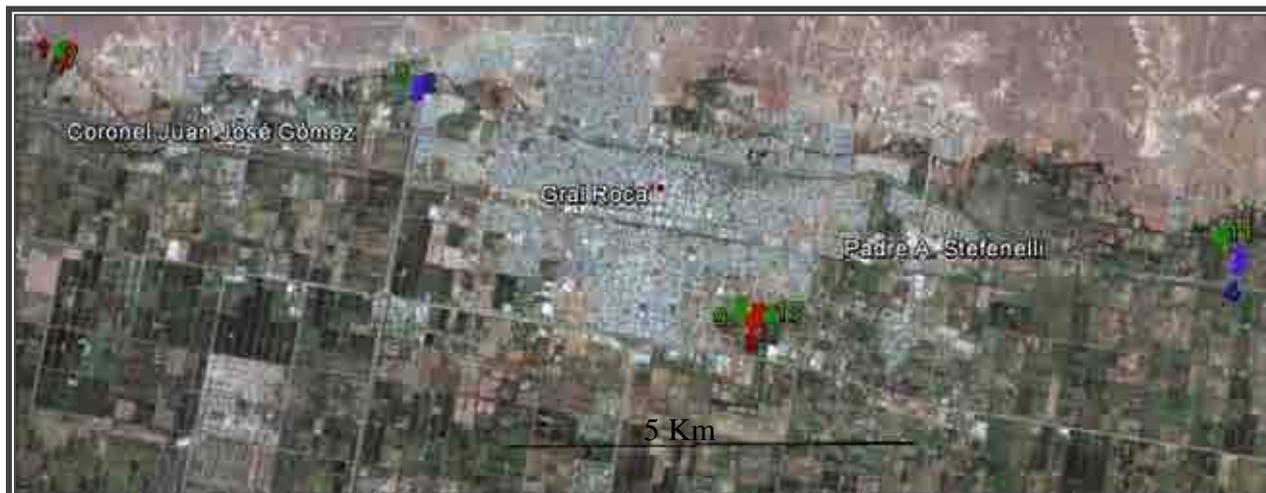


Figura 5.11. Sitios de monitoreo de *M. ridens* y *A. quadridentata* en la última temporada de evaluación (2010 - 2011) en el Alto Valle de Río Negro. Los puntos de marcación rojos indican las chacras donde se liberó y recobró a los parasitoides en temporadas pasadas y donde hubo monitoreo (sitios 1 y 3) y los puntos de marcación verdes indican los nuevos sitios a donde se extendió el monitoreo de los parasitoides (sitios 7, 8, 9, 10 y 11). También se indican en violeta los sitios donde hubo recobro de los enemigos naturales en temporadas pasadas pero donde luego hubo un cambio de cultivo y no se realizó el monitoreo en la última temporada (sitios 2 y 4). Imagen tomada del Google Earth, Inav/geosistemas SRL en 2015.

Con respecto a la dispersión de los parasitoides en la región, los datos obtenidos en la última temporada de evaluación (2010/11) sugieren que las poblaciones de los enemigos naturales presentes en los sitios de liberación no se propagaron hacia los montes productivos de los alrededores. Las aplicaciones de insecticidas pueden actuar como una barrera química que impide la dispersión de los parasitoides hacia nuevas áreas, restringiendo su colonización a los sitios sin tratamientos químicos (Van Driesche y Bellows, 1996). En el caso de *A. quadridentata* no hay información acerca de los efectos nocivos de los insecticidas que se utilizan en la actualidad en la producción de pomáceas; entonces, sería valioso evaluar la toxicidad de algunos insecticidas sobre este enemigo natural. Mientras que para *M. ridens*, en la presente tesis (capítulo 4), se obtuvo información sobre la toxicidad de cuatro insecticidas y se observó que solo el tiacloprid, un insecticida neurotóxico mostró efectos perjudiciales sobre los adultos del parasitoide pero resultó ser moderadamente persistente. Como se mencionó oportunamente, para complementar los resultados obtenidos en este trabajo será necesario evaluar otros principios activos y desarrollar pruebas en el campo.

Otro aspecto que puede afectar la dispersión de los agentes de control en la región es la baja densidad de la plaga presente en los montes comerciales que poseen un

buen manejo fitosanitario. Algunas características de *C. pomonella*, como su estatus de plaga clave del cultivo, el daño directo que ocasiona y la existencia de restricciones cuarentenarias en algunos mercados externos sitúan el nivel del umbral de daño económico aceptable en valores muy bajos (1% de frutos afectados o dañados) (Cichón *et al.*, 2001b). Es posible entonces, que la densidad poblacional de la plaga en los montes productivos con un buen manejo sanitario no sea suficiente para sostener o posibilitar el establecimiento de los enemigos naturales exóticos.

En esta región, la mayor superficie cultivada con pomáceas corresponde a montes productivos donde se aplican medidas de control fitosanitario y en los que los niveles de daño de carpocapsa promedian el 1% en manzanos (rango: 0,10 - 2,5% de daño), y una pequeña superficie está representada por los montes abandonados o en riesgo fitosanitario, los que se caracterizan por presentar altas densidades de la plaga y un porcentaje de daño mayor al 10% en manzanos (Villarreal *et al.*, 2010). Si bien el Programa Nacional de Supresión de carpocapsa (PNSC) prevé la erradicación de estos sitios (SENASA, 2004) la implementación de esta normativa no es fácil de llevar a la práctica exitosamente; y en la actualidad, alrededor del 4% de la superficie cultivada con manzanas corresponde a montes abandonados y en riesgo fitosanitario (Cichón *et al.*, 2006; Villarreal *et al.*, 2010). En este escenario, los montes abandonados o en riesgo fitosanitario se presentan como una buena opción donde colonizar a los enemigos naturales en la región. Estos sitios pueden servir como reservorios naturales de las especies exóticas y en ellos los parasitoides pueden contribuir a bajar la presión de la plaga a nivel global, disminuyendo la cantidad de adultos de *C. pomonella* que potencialmente migran desde estos sitios hacia los montes productivos de los alrededores.

Asimismo, hay que destacar que el contexto actual de la fruticultura regional representa un entorno favorable para el desarrollo de herramientas de control de plagas alternativas, amigables con el medio ambiente, como el control biológico. A partir de la implementación del Programa Nacional de Supresión de carpocapsa en la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén en el 2006 se extendió el uso de la técnica de Confusión Sexual (TCS) como tecnología de base, combinada con el control químico (uso de insecticidas selectivos) y cultural (Cichón *et al.*, 2006; Villarreal *et al.*, 2010). En este sentido el empleo de *M. ridens* y *A. quadridentata* como agentes de control biológico constituye una herramienta novedosa para el control de *C. pomonella* en la región.

Finalmente, este estudio representa un primer paso importante para la implementación de un programa de control biológico de la polilla de la manzana mediante la introducción de *M. ridens* y *A. quadridentata* en la región del Alto Valle de Río Negro. En el futuro se plantea la necesidad de ampliar el área de colonización de los enemigos naturales, de abordar el estudio del establecimiento de los parasitoides en distintos sistemas productivos presentes en la región (montes comerciales con diferentes estrategias de manejo) y evaluar el impacto de los enemigos naturales en la población de la plaga.

Conclusiones del capítulo 5

- ✓ Los parasitoides exóticos, *M. ridens* y *A. quadridentata* se reprodujeron exitosamente en el campo, adaptándose a las condiciones ambientales regionales.
- ✓ Ambas especies lograron establecerse en el campo, con niveles de parasitismo cercanos al 3% para *M. ridens* y superiores al 20% para *A. quadridentata*, al cabo de 3 y 4 temporadas respectivamente desde su última liberación en el campo.
- ✓ Los montes de pomáceas abandonados o en riesgo fitosanitario, con una alta infestación de la plaga, un mínimo cuidado cultural (riego y poda) y con abundante fruta a cosecha representan una excelente opción donde colonizar a los parasitoides en la región.

CONCLUSIONES FINALES



Los resultados aquí presentados han contribuido a mejorar el conocimiento de los enemigos naturales exóticos, *M. ridens* y *A. quadridentata*, lo que permitirá en un futuro facilitar el empleo de estas especies a través de la implementación de un programa de control biológico clásico de *C. pomonella*.

De la investigación realizada se desprenden las siguientes conclusiones generales:

- ✓ Se aportó información de interés para la cría en condiciones controladas de los enemigos naturales y su huésped.
- ✓ Se realizaron aportes novedosos sobre aspectos básicos de la biología de *A. quadridentata*. Se establecieron los principales parámetros biológicos y poblacionales de esta especie sobre *C. pomonella* en condiciones controladas de laboratorio.
- ✓ Se contribuyó con el conocimiento sobre el desempeño y la preferencia de *M. ridens* por distintas especies de huéspedes, observándose que *G. molesta* es un huésped apto para el desarrollo del parasitoide, si bien su huésped preferido fue *C. pomonella*.
- ✓ Se contribuyó con el conocimiento sobre la susceptibilidad de *M. ridens* a cuatro insecticidas usados habitualmente en la producción de pomáceas. Los productos CpGV, novaluron y clorantraniliprole resultaron inofensivos por consiguiente, se considera que su uso es compatible con el empleo del parasitoide en estrategias de manejo integrado de plagas.
- ✓ La colonización de los parasitoides exóticos fue exitosa, lográndose el establecimiento de ambas especies en el Alto Valle de Río Negro.

BIBLIOGRAFÍA



- Agiidam, H. R., Y. Fathipour, D. C. Kontodimas, G. Radjabi & M. Rezapanah. 2009. Age-Specific Life Table Parameters and Survivorship of an Iranian Population of the Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) at Different Constant Temperatures. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 102 (2): 233 - 240.
- Abdullaev, E. 1972. *Mastrus* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) - a parasite of caterpillars of the apple codling moth. *Uzbekskii Biologicheskii Zhurnal* I: 64 - 65.
- Araya, J. E., A. Sanhueza & M. A. Guerrero. 2005. Efecto de varios insecticidas sobre adultos de *Apanteles glomeratus* (L.), parasitoide de larvas de la mariposa blanca de la col, *Pieris brassicae* L. *Bol. San. Veg. Plagas.* 31: 617 - 622.
- Arthurs, S. P., L. A. Lacey & E. R., Miliczky. 2007. Evaluation of the codling moth granulovirus and spinosad for control and impact on non-target species in pear orchards. *Biol. Control.* 41: 99 – 109.
- Audemard, H. 1991. Population dynamics of the codling moth. En: van der Geest, L. P. S and Evenhuis, H. H. (eds.), *Tortricid Pest. World Crop Pests.* Elsevier Science, Amsterdam, the Netherlands, pp. 329 - 338.
- Bakker, K., J. J. M. van Alphen, F. H. D. van Batenburg, N. van der Hoeven, H. W. Nell, W. T. F. H. van Strien-van Liempt & T. C. J. Turlings. 1985. The function of host discrimination and superparasitization in parasitoids. *Oecologia.* 67: 572 - 576.
- Basso, C. 2002. Producción masiva de enemigos naturales entomófagos. En: Basso C. y A. Ribero (ed.), *Enemigos naturales como reguladores de las poblaciones de insectos. Biodiversidad, conservación y manejo.* Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de la República de Uruguay, 99 - 110 pp.
- Batiste, W. C. & W. H. Olson. 1973. Codling moth: mass production in controlled-environment rearing units. *J. Econ. Entomol.* 66: 383 – 388.
- Bautista, R. C. & E. J. Harris. 1997. Effect of insectary rearing on host preference and oviposition behavior of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata*. *Entomol. Exp. Appl.* 83: 213 - 218.
- Bell, H. A., G. C. Marris, A. J. Prickett & J. P. Edwards. 2005. Influence of host size on the clutch size and developmental success of the gregarious ectoparasitoid *Eulophus pennicornis* (Nees) (Hymenoptera: Braconidae) attacking larvae of the tomato moth *Lacanobia oleracea* (L.) (Lepidoptera: Noctunidae). *J. Exp. Biol.* 208: 3199 - 3209.

- Bénédet F., T. Leroy, N. Gauthier, C. Thibaudeau, E. Thibout & S. Renault. 2002. Gustatory sensillia sensitive to protein kairomones trigger host acceptance by an endoparasitoid. *Proc. R. Soc. London. Ser B* 269: 1879 - 1886.
- Benítez, C. E., H. R. Castro, A. P. Ricca & S. R. Vaudagna. 2005. Peras y Manzanas: factores que afectan la calidad de los frutos. Ediciones INTA, Buenos Aires. 394p.
- Bezemer, T. M & N. J. Mills. 2003. Clutch size decisions of a gregarious parasitoid under laboratory and field conditions. *Anim. Behav.* 66: 1119 - 1128.
- Bezemer, T. M. & N. J. Mills. 2001. Host density responses of *Mastrus ridibundus*, a parasitoid of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Biol. Control.* 22: 169 - 175.
- Bezemer, T. M., J. A. Harvey & N. J. Mills. 2005. Influence of adult nutrition on the relationship between body size and reproductive parameters in a parasitoid wasp. *Ecol. Entomol.* 30: 571 - 580.
- Bloem, S., K. A. Bloem & A. L. Knight. 1998. Assessing the quality of mass-reared codling moths (Lepidoptera: Tortricidae) by using field release-recapture tests. *J. Econ. Entomol.* 91: 1122 - 1130.
- Blommers, L. H. M. 1994. Integrated pest management in European apple orchards. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 213 - 241.
- Borden, A. D. 1931. Some field observations on codling moth behavior. *J. Econ. Entomol.* 24: 1137 - 1145.
- Bostanian, N. J., H. A. Thistlewood, J. M. Hardman, M-C Laurin & G. Racetten. 2009. Effect of seven new orchard pesticides on *Galendromus occidentalis* in laboratory studies. *Pest Manag. Sci.* 65 (6): 635 – 639.
- Botto, E. N. 2002. Selección de enemigos naturales para su empleo en control biológico aplicado (CBA). En: Basso C. & A. Ribero (ed.), *Enemigos naturales como reguladores de las poblaciones de insectos. Biodiversidad, conservación y manejo.* Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de la República de Uruguay, 65 - 77 pp.
- Botto, E. N. 2003. Enemigos naturales entomófagos de la polilla de la manzana *Cydia pomonella* (L) (Lepidoptera: Tortricidae). En: Cichón, L.I & D.E. Fernández. 2003. *Curso de capacitación: Biología y control de carpocapsa *Cydia pomonella* (L.).* INTA Alto Valle, Río Negro. 82 pp.
- Boyce, H. R. 1936. Laboratory breeding of *Ascogaster carpocapsae* Vier. with notes on biology and larval morphology. *Can. Entomol.* 48: 241 - 246.

- Brain, P. & D. M. Glen. 1989. A model of the effect of codling moth granulosis virus on *Cydia pomonella*. *Ann. Appl. Biol.* 115: 129 - 140.
- Brown, R. L. 1979. The valid generic and tribal names for the codling moth, *Cydia pomonella* (Olethreutinae: Tortricidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 72: 565 - 567.
- Brugger, K. E., P. G. Cole, I. C. Newman, N. Parker, B. Scholz, P. Suvagia, G. Walker & T. G. Hammond. 2010. Selectivity of chlorantraniliprole to parasitoid wasps. *Pest Manag. Sci.* 66: 1075 – 1081.
- Caballero, P., E. Vargas-Osuma & C. Santiago-Alvarez. 1991. Parasitization of granulovirus infected and noninfected *Agrotis segetum* larvae and the virus transmission by three hymenopteran parasitoids. *Entomol. Exp. Appl.* 58: 55 - 60.
- Cabrera, A. R., A. C. R. Cloyd & E. R. Zaborski. 2005. Lethal and sub-lethal effects of novaluron (Pedestal) on the soil-dwelling predatory mite, *Stratiolaelaps scimitus* (Womersley) (Acari: Mesostigmata: Laelaptidae) under laboratory conditions. *J. Entomol. Sci.* 40: 47 - 53.
- Caprile, J. & N. Mills. 2005. Biological Control of Codling Moth: Parasitoids Releases in Walnuts, Apples, Pears. En: Reports of the 79th Annual Western Orchard Pest & Disease Management Conference (WOPDMC) 6 pp.
- Cariac, M. J., A. A. Ferrero & T. Stadler. 2003. Effects of crude plant extracts and mineral oil of the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, 29: 471 - 479.
- Carvalho, G. A., M. S. Godoy, D. S. Parreira, O. Lasmar, J. R. Souza & V. F. Moscardini. 2010. Selectivity of growth regulators and neonicotinoids for adults of *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Rev. Colomb. Entomol.* 36 (2): 195 - 201.
- CASAFE, 2011. Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina. Ed. Cámara de sanidad agropecuaria y fertilizantes, Buenos Aires, Argentina.
- Charles, J. G., W. R. M. Sandanayaka, A. Chhagan & N. E. M. Page-Weir. 2013a. Host selection behavior in *Mastrus ridens*, a gregarious ectoparasitoid of the codling moth, *Cydia pomonella*. *BioControl* 58: 493 - 503.
- Charles, J. G., W. R. M. Sandanayaka, A. Chhagan & N. E. M. Page-Weir. 2013b. Survival of the gregarious ectoparasitoid *Mastrus ridens* on codling moth, *Cydia pomonella*, and non-target species. *BioControl* 58: 505 - 513.

- Chong, J. H. & R. D. Oetting. 2006. Host stage selection of the mealybug parasitoid *Anagyrus spec. nov. near sinope*. Entomol. Exp. Appl. 121: 39 - 50.
- Cichón L., D. Fernández, C. Alemany, H. Cancio & R. 2006. Bloques de productores vecinos para el control de la carpocapsa. Rev. Divulgación: Fruticultura y diversificación. Nº 50: 10 - 14.
- Cichón, L. I & D. E. Fernández. 2003. Curso de capacitación: Biología y control de carpocapsa *Cydia pomonella* (L.). INTA Alto Valle, Río Negro. 82 pp.
- Cichón, L. & D. Fernández. 2008. Biología de la carpocapsa (*Cydia pomonella*) en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén. En: Sanidad vegetal: http://inta.gob.ar/documentos/biologia-de-la-carpocapsa-cydia-pomonella-en-el-alto-valle-de-rio-negro-y-neuquen-1/at_multi_download/file/biologiacarpo.pdf
- Cichón, L., D. Fernández & D. Raffo. 2001b. Carpocapsa, la plaga clave. Manzanas y perales del Valle. IDIA XXI Nº 1 frutales de pepita: 96 - 99.
- Cichón, L., D. Fernández, D. Raffo, & T. Balivian. 2001a. Técnica de Confusión Sexual. Pautas para la técnica de confusión sexual en los valles de Río Negro y Neuquén. Ediciones EEA INTA Alto Valle. General Roca. Argentina 55 pp.
- Clausen, C. P., 1978. Familia: Olethreutidae, 211-218 pp. En C. P. Clausen (ed.), Introduced parasites and predators of arthropod pests and weeds: a world review. Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Washington, D.C., Agriculture Handbook Nº 480.
- Cordova, D., E. A. Benner, M. D. Sacher, J. J. Rauh, J. S. Sopa, G. P. Lahm, T. P. Selby, T. M. Stevenson, L. Flexner, S. Gutteridge, D. F. Rhoades, L. Wu, R. M. Smith & Y. Tao. 2006. Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. Pest. Biochem. Phys. 84: 196 – 214.
- Cossentine, J. E., L. B. M. Jensen & K. C. Eastwell, 2005. Incidence and transmission of a granulovirus in a large codling moth [*Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae)] rearing facility. J. Invert. Pathol. 90: 187 – 192.
- Cox, J. A. 1932. *Ascogaster carpocapsae* Vier. – an important larval parasite of the codling moth and oriental fruit moth. N. Y. State Agric. Exp. Sta. Tech. Bull. 188: 3 - 26.
- Cox, J. A. & D. M. Daniel. 1935. *Ascogaster carpocapsae* Viereck in relation to arsenical sprays. J. Econ. Entomol. 28: 113 - 120.

- Cucchi, N. J. A. & V. C. Becerra. 2007. Manual de tratamientos fitosanitarios para cultivos de clima templado bajo riego, sección II: frutales de pepita y nogal. Ediciones INTA, Mendoza, Argentina. 687 pp.
- Cutler, G. C., C. D. Scott-Dupree, J. H. Tolman & C. R. Harris. 2006. Toxicity of the insect growth regulator novaluron to the non-target predatory bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). Biol. Control. 38: 196 – 204.
- Danks, H. V. 2004. The roles of insect cocoons in cold conditions. Eur. J. Entomol. 101: 433 – 437.
- Day, W. H. 1994. Estimating Mortality Caused by Parasites and Diseases of Insects: Comparisons of the Dissection and Rearing Methods. Environ. Entomol. 23 (3): 543 - 550.
- De Bach, P. 1977. Lucha Biológica contra los Enemigos Naturales de las plantas. Cambridge University Press. 399 pp.
- Denlinger, D. L. 2008. Why study diapauses?. Entomol. Research. 38: 1 - 9.
- Devotto, L., C. del Valle, R. Ceballos & M. Gerding. 2010. Biology of *Mastrus ridibundus* (Gravenhorst), a potencial biological control agent for area-wide management of *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). J. Appl. Entomol. 134 (3): 163 - 274.
- Devotto, L., D. Arribillaga, C. del Valle & M. Gerding. 2009. Establecimiento del parasitoide *Mastrus ridibundus* (Hym. Ichneumonidae), enemigo natural de la polilla de la manzana, en la XI región de Chile. En: Actas del 2º Simposio Chileno de Control Biológico, Chillan. pp.75.
- Dinter, A., K. Brugger, A. Bassi, N. M. Frost & M. D. Woodward. 2008. Chlorantraniliprole (DPX-E2Y45, DuPont™ Rynaxypyr®, Coragen® and Altacor® insecticide) - a novel anthranilic diamide insecticide - demonstrating low toxicity and low risk for beneficial insects and predatory mites. IOBC/wprs Bulletin. 35: 128 - 135.
- Domini, S., B. Mauricio & N. Zunino. 2011. Aproximaciones sobre la agricultura familiar diversificada en el Alto Valle de Río negro en el contexto actual. En: Actas de las VII Jornadas Interdisciplinarias de Estudios Agrarios y Agroindustriales. Buenos Aires, 1 al 4 de noviembre de 2011.
- Dosier, H. L. & H. G. Butler. 1929. Notes on the rearing of *Ascogaster carpocapsae*, a braconid parasite of the codling moth. J. Econ. Entomol. 22: 954 - 957.

- Dyck, V. A. 2010. Rearing codling moth for the sterile insect technique. FAO Plant Production and Protection Paper 199. Ediciones FAO-IAEA. 195pp.
- Elbert, A., A. Buchholz, U. Ebbinghaus-Kintscher, C. Erdelen, R. Nauen & H. J. Schnorbach. 2001. The biological profile of thiacloprid- a new chloronicotinyl insecticide. Bayer 54: 185 - 208.
- Epstein, D. L., L. J. Gut & A. L. Douglas. 2003. Release and establishment of *Mastrus ridibundus* (Gravenhorst), a biological control agent of the codling moth. NCR-125 Arthrop Biological Control- State Report. Disponible en: <http://www.ncera125.ent.msu.edu/StateRpts2003MI.htm>
- Espul, J. C. & G. L. Troilo. 1986. Nuevos parásitos sobre *Carpocapsa pomonella* (L.) Observaciones en el Valle de Uco, Provincia de Mendoza. En: Jornadas Fitosanitarias Argentinas VI. Alto Valle de Río Negro, Río Negro, 1986. pp. 177 - 180.
- FAO, "Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación". 1996. Código de conducta para la importación y liberación de agentes exóticos de control biológico. Roma, Italia. 21pp.
- Fernandes, F. L., L. Bacci & M. S. Fernandes. 2010. Impact and selectivity of insecticides to predators and parasitoids. EntomoBrasilis. 3: 1 - 10.
- Gandolfi, M., L. Mattiacci & S. Dorn. 2003. Mechanisms of behavioral alterations of parasitoids reared in artificial systems. J. Chem. Ecol. 29 (8): 1871 - 87.
- Garrido, S. 2010. Efecto secundario de insecticidas biológicos, naturales y botánicos sobre la mortandad y capacidad de parasitoidismo de *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethylidae) en manzanos del Alto Valle de Río Negro. Tesis de maestría inédita. Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Ciencias Naturales.
- Garrido, S., L. Cichón, D. Fernández & C. Azevedo. 2005. Primera cita de la especie *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethylidae) en el Alto Valle de Río Negro, Patagonia Argentina. Rev. Soc. Entomol. Argent. 64: 14 - 16.
- Gashawbeza, A. 2011. Effect of the insect growth regulator novaluron on diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), and its indigenous parasitoids. Crop Prot. 30: 1087-1090.
- Gates, S. 1993. Self and conspecific superparasitism by the solitary parasitoid *Antrocephalus pandens*. Ecol. Entomol. 18: 303 - 309.

- Geier, P. 1957. Observations sur les parasites du Carpocapse (*Cydia pomonella* L.) près de Genève. Rev. Suisse de Zool. 64 (26): 497 - 525.
- Geier, P. W. & D. T. Briese. 1978. The demographic performance of a laboratory strain of codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). J. Appl. Ecol. 15: 679 - 696.
- Giganti, H. E., G. L. Dapoto & J. D. Vermeulen. 2007. Manejo integrado de plagas de los frutales de pepita. En: Sozzi, G. O. (ed), Árboles frutales: ecofisiología, cultivo y aprovechamiento, Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires, 531 - 580 pp.
- Glen, D. M. & J. Clark. 1985. Death of *Cydia pomonella* larvae and damage to apple fruit, after field application of codling moth granulosis virus. Entomol. Exp. Appl. 38: 93 - 96.
- Glen, D. M., C. W. Wiltshire, N. F. Milsom & P. Brain. 1984. Codling moth granulosis virus: effects of its use on some other orchard arthropods. Ann. Appl. Biol. 104: 99 - 106.
- Godfray, H. C. J. 1994. Parasitoids. Behavioral and evolutionary ecology. Princeton University Press, New Jersey, USA. 473p.
- Gradish, A. E., C. D. Scott-Dupree, L. Shipp, C. R. Harris & G. Ferguson. 2010. Effect of reduce risk pesticides for use in greenhouse vegetable production on *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae). Pest Manag. Sci. 66 (2): 142 - 146.
- Gu, H., J. Hughes & S. Dorn. 2006. Trade-off between mobility and fitness in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). Ecol. Entomol. 31: 68 - 74.
- Guenelon, G. H., J. C. Audemard, M. A. Fremond e I. Ammari. 1981. Progrès réalisés dans l'élevage permanent du Carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.) sur milieu artificiel. Agronomie. 1 (1): 59 - 64.
- Guillebeau, P. 2004. The pesticide Paradox in IPM: Risk-Benefit Analysis. En: Koul O., G. S. Dhaliwal and Cuperus, G. W. (eds.), Integrated Pest Management: potential, constraints and challenges. CABI publishing, 169 - 184 pp.
- Gut, L. L. 1993. Integrated Pest Management Overview. En: Beers, E. H., Brunner J. F., Willet M. J. and Warner G. M. (ed.), Orchard Pest Management a resource book for the Pacific Northwest, 17 - 27 pp.
- Hackerman, J., A. S. Rott, & S. Dorn. 2007. How two different host species influence the performance of a gregarious parasitoid: host size is not equal to host quality. J. Anim. Ecol. 76: 376 - 383.

- Hackerman, J., A. S. Rott, & S. Dorn. 2008. Consequences of mixed species infestation on the searching behavior and parasitism success of a larval parasitoid. *Biocontrol* 53: 725 - 736.
- Hajek, A. 2004. *Natural Enemies and Introduction to Biological Control*. Cambridge University Press. 378 pp.
- Hansen, L. D. & R. F. Harwood. 1968. Comparisons of Diapause and Nondiapause Larvae of the Codling Moth, *Carpocapsa pomonella*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 61 (6): 1611 - 1617.
- Hassan, S. A. 1997. Métodos padronizados para testes de selectividade, com ênfase em *Trichogramma*. En: J.R. Postali Parra & Zucchi R. A. (eds.), *Trichogramma e o controle biológico aplicado*, FEALQ Brasil, pp. 207 - 233.
- Hassan, S. A., F. Bigler, P. Blaisinger, H. Bogenschutz, J. Brun, P. Chiverton, E. Dikler, M. A. Easterbrook, P. J. Edwards, W. D. Englert, S. I. Firth, P. Huang, C. Inglesfield, F. Klingauf, C. Kuhner, M. S. Ledieu, E. Naton, P. A. Oomen, W. P. J. Overmeer, P. Plevoets, J. N. Reboulet, W. Rieckmann, L. Samsoe-Petersen, S. W. Shires, A. Stabuli, J. Stevenson, J. J. Tuset, G. Vanwetswinkel & A. Q. Van Zon. 1985. Standard methods to test the side-effects of pesticides on natural enemies of insects and mites developed by the IOBC/WPRS Working Group Pesticides and Beneficial Organisms. *Bulletin OEPP/EPPO* 5: 214 - 255.
- Hathaway, D. O., A. E. Clint & B. A. Butt. 1971. Development and fecundity of codling moth reared on artificial diets or immature apples. *J. Econ. Entomol.* 64: 1088 - 1090.
- Hennessey, R. D., N. Mills & T. Unruh. 1995. Field release of an exotic parasitic wasp, *Mastrus ridibundus* (Hymenoptera: Ichneumonidae), for biological control of codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae), in the United States. *Environmental Assessment* 4 pp.
- Hentz, M. G., P. C. Ellsworth, S. E. Naranjo & T. F. Watson. 1998. Development, longevity, and fecundity of *Chelonus* sp. nr. *Curvimaculatus* (Hymenoptera: Braconidae), an egg-larval parasitoid of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *Environ. Entomol.* 27: 443 - 449.
- Hernández, R., M. Harris, T-X. Liu. 2011. Impact of insecticides on parasitoids of the leafminer, *Liriomyza trifolii*, in pepper in south Texas. *J. Insect Sci.* 11: 1 - 14.

- Hodgson, E. W., T. L. Pitts-Singer & J. D. Barbour. 2011. Effects of the insect growth regulator, novaluron on immature alfalfa leafcutting bees, *Megachile rotundata*. J. Insect Sci. 11 (43): 1 - 10.
- Honda, T & Y. Kainoch. 1998. Age-related fecundity and learning ability of the egg-larval parasitoid *Ascogaster reticulatus* Watanabe (Hymenoptera: Braconidae). Biol. Control. 13: 177 - 181.
- Horstmann, K. 2009. Revisionen von Schlupfwespen-Arten XIII. Mitteilungen der Muenchner Entomologischen Gesellschaft. 99: 37 - 44.
- Hougaard, E. & N. Mills. 2006. The influence of host deprivation and egg expenditure on the rate of dispersal of a parasitoid following field release. Biol. Control 37: 206 - 213.
- Hougaard, E. & N. Mills. 2007. Influence of host deprivation and egg expenditure on the patch and host-finding behavior of the parasitoid wasp *Mastrus ridibundus*. J. Insect Behav. 20 (2): 229 - 246.
- Hougaard, E., T. M. Bezemer & N. Mills. 2005. Effects of host deprivation and egg expenditure on the reproductive capacity of *Mastrus ridibundus*, an introduced parasitoid for the biological control of the codling moth in California. Biol. Control. 33: 96 - 106.
- Huang, J., W. Shun-fan & Y. Gong-yin. 2011. Evaluation of Lethal Effects of Chlorantraniliprole on *Chilo suppressalis* and Its Larval Parasitoid, *Cotesia chilonis*. Agr. Sci. China. 10 (7): 1134-1138.
- Huddleston, T. 1984. The Palearctic species of *Ascogaster* (Hymenoptera: Braconidae). Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Ent. 49 (5): 341 - 392.
- INTA. 2008. Residuos y tolerancias de insecticidas para el control de carpocapsa. Consejos oportunos. Ed. INTA Alto Valle. Año 2 n°20. 4pag.
- Ishaaya, I., S. Kontsedalov & A. R. Horowitz. 2003. Novaluron (Rimon), a novel IGR: potency and cross-resistance. Arch. Insect Biochem. 54: 157 - 164.
- Jacas, J. A. & E. Viñuela. 1994. Analysis of a laboratory method to test the effects of pesticides on adult females of *Opius concolor* (Hym., Braconidae), a parasitoid of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Dip., Tephritidae). Biocontrol Sci. Techn. 4: 147 - 154.
- Jackson, C. G., J. S. Delph & E. G. Neemann. 1978. Development, longevity, and fecundity of *Chelonus blackburni* (Hym.: Braconidae) as a parasite of *Pectinophora gossypiella* (Lep.: Gelechiidae). Entomophaga. 23: 35 - 42.

- Jandricic, S., C. D. Scott-Dupree, A. B. Broadbent, C. R. Harris & G. Murphy. 2006. Compatibility of *Atheta coriaria* with other biological control agents and reduced- risk insecticides use in greenhouse floriculture integrated pest management programs for fungus gnats. *Can. Entomol.* 138: 712 - 722.
- Jervis, M. A. & M. J. W. Copland. 1996. The life cycle. En: *Insect Natural Enemies*. Jervis, M. and N. Kidd (eds.). Chapman & Hall. 491 pp.
- Jumean, Z., R. Gries, T. Unruh, E. Rowland & G. Gries. 2005. Identification of the larval aggregation pheromone of the codling moth, *Cydia pomonella*. *J. Chem. Ecol.* 31 (4): 911 - 924.
- Kainoch, Y. 1982. Searching behavior and oviposition of the egg-larval parasitoid, *Ascogaster reticulatus* Watanabe (Hymenoptera: Braconidae). *Appl. Ent. Zool.* 17 (2): 194 - 206.
- Kainoch, Y. 1999. Parasitoids. En Hardie J. & Minks, A. K. (eds.), *Pheromones of Non-Lepidopteran Insects Associated with Agricultural Plants*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, 383 - 404 pp.
- Katsarou, I., A. Martinou, D. P. Papachristos & D. Zoaki. 2009. Toxic effects of insecticide residues on three aphidophagous coccinellid species. *Hell. Plant Protect. J.* 2: 101 - 106.
- Khani, A., S. Moharramipour , M. Barzegar & H. Naderi-Manesh. 2007b. Comparison of fatty acid composition in total lipid of diapause and non-diapause larvae of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Insect Sci.* 14: 125 - 131.
- Khani, A., S. Moharramipour & M. Barzegar. 2007a. Cold tolerance and trehalose accumulation in overwintering larvae of the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Eur. J. Entomol.* 104: 385 - 392.
- Kulmann, U. & N. J. Mills. 1999. Exploring the biodiversity of Central Asia to assess specialized parasitoids for biological control of Apple pests in Europe and North America. *Integrated Protection in Orchard. IOBC/wprs Bulletin.* 22 (6) 1 - 6.
- Kyei-Poku, G. K. & Y. Kunimi. 1997. Effect of entomopoxvirus infection of *Pseudaletia separata* larvae on the oviposition behavior of *Cotesia kariyai*. *Entomol. Exp. Appl.* 83: 93 - 97.
- La Rossa, R. & N. Kahn. 2003. Dos programa de computadora para confeccionar tablas de vida y fertilidad y calcular parámetros biológicos y demográficos en áfidos (Homoptera: Afitoidea). *RIA* 32 (3): 127 - 142.

- Lacey, L. A. & D. I. Shapiro-Ilan. 2008. Microbial Control of Insect Pests in Temperate Orchard Systems: Potential for Incorporation into IPM. *Annu. Rev. Entomol.* 53: 121 - 144.
- Lacey, L. A. & T. h Unruh. 2005. Biological control of codling moth (*Cydia pomonella*, Lepidoptera: Tortricidae) and its role in integrated pest management, with emphasis on entomopathogens. *Monografia. Vedia* 12 (1): 33 - 60.
- Lacey, L. A., R. U. Unruh & H. L. Headrick. 2003. Interactions of two idiobiont parasitoids (Hymenoptera: Ichneumonidae) of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) with the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *J. Invertebr. Pathol.* 83: 230 - 239.
- Lahm, G. P., T. M. Stevenson, T. P. Selby, J. H. Freudenberger, D. Cordova, L. Flexner, C. A. Bellin, C. M. Dubas, B. K. Smith, K. A. Hughes, J. G. Hollingshaus, C. E. Clark & E. A. Benner. 2007. Rynaxypyre: A new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17: 6274 – 6279.
- Laumann, R. A., A. A. Ferrero & T. Stadler. 2000. Comportamiento de selección de larvas de *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) por el parasitoide *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethyilidae) *Bol. San. Veg. Plagas*, 26: 551 - 558.
- Lawrence, P. O. 1990. The Biochemical and Physiological Effects of Insect Host Development and Ecology of Their Insect Parasites: An Overview. *Arch. Insect Biochem.* 13: 217 - 228.
- Leppä, N. C. & W. R. Fisher. 1989. Total quality control in insect mass production for insect pest management. *J. Appl. Ent.* 108: 452 - 461.
- Lloyd, D. C. 1960. A study of the codling moth and its parasites in California. *Sci. Agr. (Canadá)*. 24: 456-473.
- Loewy, M., V. Kira, G. Carvajal, A. Venturino & A. D'Angelo. 1999. Groundwater contamination by Azinphos Methyl in the Northern Patagonia region (Argentina). *Sc. Tot. Environ.* 225: 211 - 218.
- Mac Lellan, C. R. 1972. Codling moth populations under natural, integrated and chemical control on apple in Nova Scotia (Lepidoptera: Olethreutidae). *Can. Ent.* 104: 1397 - 1404.

- Maia, J. B., G. A. Carvalho, M. I. S. Leite, R. Lopes de Oliveira & L. Makyamas. 2010. Selectivity of insecticides used in corn crops to adult *Trichogramma atopovirilia* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Rev. Colomb. Entomol.* 36 (2): 202 - 206.
- Martínez, L. 2004. El control de calidad en la cría de insectos. En: Martínez B. N., H. B. Mojica & C. C. Palacio (eds), *Cría de Insectos Plaga y Organismos Benéficos*, 35 - 56 pp.
- Maxwell, E. M. & H. Y. Fadamiro. 2006. Evaluation of several reduced-risk insecticides in combination with an action threshold for managing lepidopteran pest of cole crops in Alabama. *Fla. Entomol.* 89(2): 117 - 126.
- Mc. William, A. 2007. Environmental Impact of Baculovirus. FAO. R7299_FTR_anx3. En: http://www.fao.org/docs/eims/upload/agrotech/2003/R7299_FTR_anx3.pdf
- Mead-Briggs, M., A. K. Brwon, M. P. Candolfi, M. J. M. Coulson, M. Miles, M. Moll, K. Nienstedt, M. Schuld, A. Ufer & E. McIndoe. 2000. A laboratory test for evaluating the effects of plant protection products on the parasitic wasp, *Aphidius rhopalosiphi* (DeStephani-Perez) (Hymenoptera: Braconidae). En: *Guidelines to evaluate side-effects of plant protection products to non-target arthropods*. IOBC, BART and EPPO Joint Initiative. IOBC/WPRS. Candolfi M. P., Blumel S., Forster R., Bakker F. M., Grimm G., Hassan S. A., Heimbach U., Mead-Briggs M. A., Reber B., Schmuck R., Vogt H. (eds.) 158 p.
- Messenger, P. S. 1964. Use of life tables in a bioclimatic study of an experimental aphid-braconid wasp host-parasite system. *Ecology.* 45: 119 - 131.
- Messenger, P. S., F. Wilson & M. J. Whitten. 1976. Variation, Fitness, and Adaptability of Natural Enemies. En Huffaker, C. B. & Messenger, P. S (eds.), *Theory and practice of biological control*, 209 - 227 pp.
- Mills, N. J. 2005a. A classical biological control of codling moth: the California experience. En: *Second International Symposium on Biological Control of Arthropods*, Davos (2): 126 - 131.
- Mills, N. J. 2005b. Selecting effective parasitoids for biological control introductions: Codling moth as a case of study. *Biol. Control* 34: 274 - 282.
- Mills, N. J., E. Hougardy, E. Julier, C. Pickel, W. Bentley, J. Grant & S. Wulfert. 2004. Enhancing the biological control of codling moth in walnuts. *Walnut Research Reports*. 2003. Sacramento, CA. 321 - 331.
- Miñarro, M.; & E. Dapena. 2004. Parasitoides de carpocapsa *Cydia pomonella* en plantaciones de maznanos de Asturias. *Bol. San. Veg. Plagas* 30: 507 - 517.

- Moreno Mari, J. & R. Jiménez Peydro. 1992. Estudio de la capacidad reproductora y longevidad de las hembras de *Phanerotoma (Phanerotoma) ocularis* Kohl (Hym., Braconidae). Bol. San. Veg. Plagas. 18: 625 - 629.
- Moyano de Leone, M. I & D. S. Ruberti. 2007. Manejo integrado de plagas de los frutales de carozos. En: Sozzi, G. O. (ed), Árboles frutales: Ecofisiología, cultivo y aprovechamiento. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires, 619 - 632 pp.
- Newman, I. C., J. T.S. Walker & D. J. Rogers. 2004. Mortality of the leafroller parasitoid *Dolichogenidea tasmanica* (Hym.: Braconidae) exposed to orchard pesticides residues. N Z Plant Protect. 57: 8 - 12.
- Nordlund, D. A. 1998. Capacity and Quality: Keys to success in the mass rearing of biological control agents. Nat. Enemies Ins. 20 (4): 169 - 179.
- Olszak, R. W. & M. Sekrecka. 2010. Influence of thiacloprid and spiroticlofen on survival and fecundity of predatory mite *Typhlodromus pyri* Scheut. (Phytoseiidae). IOBC/wprs Bulletin. 55: 69 - 72.
- Preetha, G., J. Stanley, S. Suresh & S. Kuttalam. 2009. Toxicity of selected insecticides to *Trichogramma chilonis*: Assesing their safety in rice ecosystem. Phytoparasitica 37: 209 - 215.
- Quintana, G. 2003. Uso de microorganismos para el control biológico de plagas: virus de la granulosis de *Cydia pomonella* (CpGV). En: Cichón, L.I & D.E. Fernández. 2003. Curso de capacitación: Biología y control de carpocapsa *Cydia pomonella* (L.). INTA Alto Valle, Río Negro. 82 pp.
- Quintana, G., H. F. Rizzo & F. Mc Kay. 1997. Morfología y Biología de los estados de desarrollo de *Cydia pomonella* (L.) en crías de laboratorio. RIA. 28 (2): 49 - 63.
- Rabinovich, J. E. 1980. Introducción a la ecología de poblaciones animales. Editorial Continental, México. 313 p.
- Reed-Larsen, D. A. & J. J. Brown, 1990. Embryonic castration of the codling moth, *Cydia pomonella* by an endoparasitoid, *Ascogaster quadridentata*. 1990. J. Insect. Physiol. Vol. 36 (2): 111-118.
- Rivers, D. B. & D. L. Denlinger. 1995. Fecundity and development of the ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* are dependent host quality. Entomol. Exp. Appl. 76: 15 - 24.
- Rock, C. G. 1967. Aseptic rearing of the codling moth on synthetic diets: Ascorbic acid and fatty acid requirements. J. Econ. Entomol. 60 (4): 1002 - 1005.

- Rogers, D. J. & C. J. Winks. 1993. Quality control in laboratory-reared codling moth at Mt Albert Research Centre, Auckland, New Zealand, pp. 13–21. En: G. Nicoli, M. Benuzzi and N.C. Leppla, eds. Proc. 7th Workshop of the IOBC Global Working Group “Quality Control of Mass Reared Arthropods”, 13–16 September 1993, Rimini, Italy (<http://users.ugent.be/~padclerc/AMRQC/proceedings>).
- Rosemberg, H. T. 1934. The biology and distribution in France of the larval parasites of the codling moth, *Cydia pomonella* L. Bull. Ent. Res. 25: 201-256.
- Salt, G. 1934. Experimental Studies in insect parasitism. II- Superparasitism. Proc. R. Soc. Lond. 122 (B): 455 - 476.
- Salt, G. 1935. Experimental studies in Insect Parasitism. III- Host selection. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 117 (805): 413 - 435.
- Salt, G. 1937. The Sense used by *Trichogramma* to Distinguish between Parasitized and Unparasitized Hosts. Proc. R. Soc. Lond. 122 (B): 57 - 75.
- Salt, G. 1940. Experimental studies in insect parasitism. VIII: the effects of different hosts on the parasite *Trichogramma evanescens* Westw. Proc. R. Soc. Lond. 15 (A): 81 - 95.
- Schmuck, R. 2001. Ecotoxicological profile of the insecticide thiacloprid. Bayer 54: 161 - 184.
- Schuld, M. y R. Schmuck. 2000. Effects of Thiacloprid, a new chloronicotinyl insecticide, on the egg parasitoid *Trichogramma cacaoeciae*. Ecotoxicology. 9 (3): 197 - 205.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agropecuaria (SENASA). 2004. Resolución N° 1269/2004: Programa Nacional de Supresión de Carpocapsa. En: <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1038&io=4757> (consultada en mayo 2014)
- Shaw, R. S. 1983. A Taxonomic Study of Nearctic *Ascogaster* and a Description of New genus *Leptodrepana* (Hymenoptera: Braconidae). Entomography. 2: 1 - 54.
- Siekman G., B. Tenhumberg & M. A. Keller. 2001. Feeding and survival in parasitic wasps: sugar concentration and timing matter. Oikos. 95: 425 - 430.
- Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas (SINAVIMO) - Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). 2010. Frutales:

- Manzano. En: <http://www.sinavimo.gov.ar/en/node/2070> (consultada mayo 2010).
- Sokal, R. R. & J. F. Rohlf. 1981. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 2nd ed., W. H. Freeman and Company, San Francisco, 859 pp.
- Southwood, T. R. E. 1994. *Ecological methods, with particular reference to the study of insect populations*. Chapman & Hall editions. 524pp.
- Speight, M. R., M. D. Hunter & A. Watt. 1999. *Ecology of Insects concepts and applications*. Blackwell Science. Chapter 10: Insect Pest Management. 247 - 294 pp.
- Statsoft, 2000. *Statistica for Windows*. Computer program manual. StatSoft Inc., Tulsa, USA.
- Steineke, S. B & J. A. Jhele. 2004. Investigating the horizontal transmission of the *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV) in a model system. *Biol. Control*. 30: 538 - 545.
- Subba Rao, B. R. & G. K. V. Gowda. 1961. Effect of temperature and humidity on the fecundity and longevity of *Chelonus rufus* Lyle (Braconidae: Hymenoptera). *Proc. Indian Acad. Sci.* 54: 241 - 250.
- Suckling, D. M., A. R. Gibb, G. M. Burnip & N. C. Delury. 2002. Can Parasitoid sex Pheromones help in Insect Biocontrol? A Case of Study of Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) and Its Parasitoid *Ascogaster quadridentata* (Hymenoptera: Braconidae). *Environ. Entomol.* 31 (6): 947 - 952.
- Sweetman, H. L. 1936. *The Biological Control of Insect*. Comstock Publishing Company. 461 pp.
- Tang, Y. & P. M. Marsh. 1994. A taxonomic study of the genus *Ascogaster* in China (Hymenoptera: Braconidae: Cheloninae). *J. Hym. Res.* Vol. 3: 279 - 302.
- Tawfiq, M. Al Antary, M. A. Ateyyat & B. M. Abussamin. 2010. Toxicity of Certain Insecticides to the Parasitoid *Diaeretiella rapae* (Mcintosh) (Hymenoptera: Aphidiidae) and its Host, the Cabbage Aphid *Brevicoryne brassicae* L. (Homoptera: Aphididae). *Aus. J. Basic Appl. Sci.* 4(6): 994 - 1000.
- Taylor, A. D. 1988. Host effects on larval competition in the gregarious parasitoid *Bracon hebetor*. *J. Anim. Ecol.* 57: 163 - 172.
- Thacker, J. R. M. 2002. *An introduction to arthropod pest control*. Cambridge University Press. 343pp.

- Tomkins, A. R., D. R. Pennan & R. B. Chapman. 1987. Overwintering of codling moth larvae in an abandoned Canterbury apple orchard. *New Zeal. Entomol.* (10): 40 - 44.
- Torréns, J. & O. Tortosa. 2008. Redescrición de *Mastrus ridibundus* (Hymenoptera: Ichneumonidae), parasitoide introducido en la Argentina para el control de *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 67 (3 - 4): 109 - 112.
- Towns, H. K. 1969. The genera of Ichneumonidae. *Mem. Amer. Ent. Ins.* 12 (2):1-537.
- Tunca, H.; C. Ozkan & N. Kilincert. 2010. Temperature dependent development of the egg-larval parasitoid *Chelonus oculator* on the factitious host, *Ephestia cautella*. *Turk J. Agric. For.* 34: 421 - 428.
- Unruh, T. R. 1997 Mass releases of two Eurasia parasitoids of codling moth. En: *Proceedings of the 71st Annual Western Orchard Pest & Disease Management Conference (WOPDMC)* 71: 42.
- van Alphen, J. J. M. & M. E. Visser. 1990. Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 59 - 79.
- Van de Veire, M. & L. Tirry. 2003. Side effects of pesticides on four species of beneficials used in IPM in glasshouse vegetable crops: “worst case” laboratory test. *Pesticides and Beneficial Organisms IOBC/wprs Bulletin.* 26 (5): 41 - 50.
- Van Driesche, R. G. & T. S. Bellows. 1996. *Biological Control*. Chapman & Hall editions. 539pp.
- Vargas, R. I., M. Ramadan, T. Hussain, N. Mochizuki, R. C. Bautista y J. D. Stark. 2002. Comparative demography of six fruit fly (Diptera: Tephritidae) parasitoids (Hymenoptera: Braconidae). *Biol. Control.* 25: 30 – 40.
- Villarreal, P., S. Mattei, M. Villegas Nigra & G. Forchetti. 2010. Evaluación del impacto del programa nacional de carpocapsa en la fruticultura de pepita de los valles irrigados de la Norpatagonia. FUNBAPA Ed. Río Negro, Argentina. 77pp.
- Vinson, S. B. 1976. Host selection by insect parasitoids. *Annu. Rev. Entomol.* 21: 109 - 133.
- Vinson, S. B. & G. F. Iwantsch. 1980. Host suitability for insect parasitoids. *Annu. Rev. Entomol.* 25: 397 - 419.

- Visser, M. E., B. Luyckx, H. Nell & G. J. H. Boskamp. 1992. Adaptive superparasitism in solitary parasitoids: marking of parasitized hosts in relation to the pay-off from superparasitism. *Ecol. Entomol.* 17: 76 - 82.
- Wäckers, F. L. 2003. The effect of food supplements on parasitoid-host dynamics. En: Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Arthropods, Honolulu, Hawaii (ed. R.G.Van Driesche), pp. 226 – 231. US Department of Agriculture, Forest Service, Morgantown, WV.
- Wäckers, F. L., C. J. van Rijn & G. E. Heimpel. 2008. Honeydew as a food source for natural enemies: making the best of a bad meal? *Biol. Control.* 45: 176 - 184.
- Walter, G. H. 2003. *Insect Pest Management and Ecological Research*. Cambridge University Press. 387 pp.
- Worcel, G. 2006. Diagnóstico Regional del Alto Valle de Río Negro. Proyecto FAO TCP/ARG/3002. En: <http://www.sagpya.mecon.gov.ar>.
- Zaviezo, T. & N. Mills (2000). Factors influencing the evolution in clutch size in a gregarious insect parasitoid. *J. Anim. Ecol.* 69: 1047 - 1057.
- Zenil, M., P. Liedo, T. Williams, J. Valle, J. Cancino & P. Montoya. 2004. Reproductive biology of *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae) on *Ceratitis capitata* and *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae). *Biol. Control.* 29: 169 – 178.