



Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Universidad Nacional de La Plata



**Biología y control de la
mariposa europea del
brote del pino
(*Rhyacionia buoliana*
Den. & Schiff.) en la
Patagonia argentina**

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Naturales

Presentada por:

Cecilia Andrea Gomez

**Director: Dr. Reinhard Schopf, Universidad Técnica de Munich
Co-director: Dra. Analía Lanteri, Universidad Nacional de La Plata**

DICIEMBRE DE 2003

A mi esposo Francisco

A la "Nona" Ida

INDICE

| | Nº |
|---|-----------|
| RESUMEN..... | i |
| AGRADECIMIENTOS..... | v |
| 1 INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2 OBJETIVOS..... | 3 |
| 3 AREA DE ESTUDIO..... | 5 |
| 4 METODOLOGÍA..... | 9 |
| 4.1 Estudio de la biología de <i>Rhyacionia buoliana</i>..... | 9 |
| 4.1.1 Análisis de la eficiencia biológica en <i>P. radiata</i> y <i>P. ponderosa</i> | 9 |
| 4.1.1.1 Determinación de la cantidad de alimento consumido por las larvas..... | 10 |
| 4.1.1.2 Eficiencia biológica de las larvas transferidas a un nuevo hospedante..... | 10 |
| 4.1.1.3 Eficiencia biológica de las larvas criadas en sus hospedantes de origen..... | 12 |
| 4.1.2 Estudio de preferencias de oviposición..... | 12 |
| 4.1.3 Crecimiento de las yemas-brotes y caracteres anatómicos de las yemas perforadas..... | 14 |
| 4.1.4 Relevamiento de parasitoides y monitoreo de los niveles de parasitismo..... | 15 |
| 4.2 Caracterización de la emergencia de adultos y de los estados inmaduros..... | 16 |
| 4.2.1 Construcción de un modelo fenológico para predecir el vuelo estacional..... | 16 |
| 4.2.1.1 Método de las capturas en trampas..... | 16 |
| 4.2.1.2 Método del conteo de exuvias..... | 17 |
| 4.2.1.3 Registro de temperaturas..... | 18 |
| 4.2.1.4 Estimación de la temperatura umbral inferior..... | 19 |
| 4.2.2 Metodología para el monitoreo de los estados de desarrollo inmaduros..... | 19 |
| 4.3 Estudio de la variación y estructura genéticas de <i>R. buoliana</i>..... | 21 |
| 4.3.1 Poblaciones monitoreadas y recolección de las muestras..... | 21 |
| 4.3.2 Análisis de isoenzimas..... | 22 |
| 4.3.2.1 Preparación de las muestras..... | 23 |
| 4.3.2.2 Transferencia de las muestras..... | 23 |
| 4.3.2.3 Electroforesis..... | 24 |
| 4.3.2.4 Coloración del gel..... | 24 |
| 4.3.3 Estimación de la variación genética y análisis de la estructura genética poblacional..... | 24 |
| 5 RESULTADOS..... | 25 |
| 5.1 Aspectos centrales de la biología de <i>R. buoliana</i>..... | 25 |
| 5.1.1 Eficiencia biológica de las larvas criadas en <i>P. radiata</i> y <i>P. ponderosa</i> | 25 |
| 5.1.1.1 Modelo de regresión lineal basado en la relación volumen-peso seco de las yemas..... | 25 |
| 5.1.1.2 Eficiencia biológica de las larvas transferidas a un nuevo hospedante..... | 25 |
| 5.1.1.2.1 Infestación artificial en laboratorio..... | 26 |
| 5.1.1.2.2 Análisis de los índices nutricionales y sus relaciones..... | 31 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5.1.1.3 | Eficiencia biológica de las larvas criadas en sus hospedantes de origen..... | 34 |
| 5.1.1.3.1 | Infestación artificial en el campo..... | 34 |
| 5.1.1.3.2 | Análisis de los índices nutricionales y sus relaciones..... | 39 |
| 5.1.1.4 | Aproximación nutricional cuantitativa para <i>R. buoliana</i> : Características organísmicas que influyen en el rendimiento e interacciones entre las tasas y eficiencias nutricionales..... | 39 |
| 5.1.2 | Preferencias de oviposición..... | 40 |
| 5.1.2.1 | Intensidad de oviposición..... | 40 |
| 5.1.2.2 | Algunas observaciones sobre el sistema reproductor femenino en relación con la puesta..... | 45 |
| 5.1.3 | Crecimiento de las yemas-brotos y caracteres anatómicos de las yemas perforadas..... | 45 |
| 5.1.4 | Himenópteros parasitoides y porcentaje de parasitismo..... | 50 |
| 5.2 | Modelo fenológico basado en la acumulación de grados día (GD)..... | 52 |
| 5.2.1 | Relación entre la acumulación de grados día y el vuelo estacional de <i>R. buoliana</i> | 52 |
| 5.2.1.1 | Capturas en trampas..... | 52 |
| 5.2.1.1.1 | Temperatura umbral inferior del estado adulto..... | 54 |
| 5.2.1.1.2 | Modelo fenológico..... | 55 |
| 5.2.1.2 | Conteo de exuvias..... | 60 |
| 5.2.2 | Relación entre los estados de desarrollo inmaduros y los GD acumulados..... | 61 |
| 5.2.2.1 | Estado de huevo..... | 61 |
| 5.2.2.2 | Estado de larva..... | 63 |
| 5.2.2.2.1 | Estadio larval L1..... | 63 |
| 5.2.2.2.2 | Estadio larval L2..... | 66 |
| 5.2.2.2.3 | Estadio larval L3..... | 68 |
| 5.2.2.2.4 | Estadio larval L4..... | 70 |
| 5.2.2.2.5 | Estadio larval L5..... | 73 |
| 5.2.2.2.6 | Estadio larval L6..... | 75 |
| 5.2.2.2.7 | Estado de pupa..... | 77 |
| 5.3 | Variación genética y estructura genética de las poblaciones de <i>R. buoliana</i>.... | 79 |
| 5.3.1 | Sistemas enzimáticos seleccionados..... | 79 |
| 5.3.2 | Variación genética en poblaciones argentinas..... | 79 |
| 5.3.2.1 | Diferenciación genética entre las poblaciones argentinas..... | 82 |
| 5.3.3 | Variación genética en la población alemana de referencia | 83 |
| 6 | DISCUSIÓN..... | 85 |
| 6.1 | Consideraciones sobre la biología de <i>R. buoliana</i>..... | 85 |
| 6.1.1 | Eficiencia biológica de las larvas transferidas a un nuevo hospedante..... | 85 |
| 6.1.2 | Intensidad de oviposición..... | 85 |
| 6.1.2.1 | Efecto de la humedad relativa ambiente en el número de huevos..... | 85 |
| 6.1.2.2 | Influencia de la experiencia de los estados inmaduros y alcance de las preferencias..... | 86 |
| 6.1.3 | Caracteres de las yemas relacionados con la intensidad de ataque..... | 87 |
| 6.2 | Análisis de modelos fenológicos basados en la acumulación de grados día (GD)..... | 88 |
| 6.2.1 | Análisis comparativo entre el modelo propuesto y el construido para el oeste de Oregon..... | 88 |
| 6.2.2 | Análisis comparativo entre el modelo propuesto y los GD acumulados calculados para la VIII Región chilena..... | 90 |

| | |
|---|-----------|
| 6.2.3 Perspectivas, potencialidad y aplicación del modelo en el manejo de la plaga..... | 91 |
| 6.3 Aproximación al conocimiento de la estructura genética de poblaciones de <i>R. buoliana</i>..... | 92 |
| 6.3.1 Comparación entre las poblaciones argentinas de <i>R. buoliana</i> y la población de referencia..... | 92 |
| 6.3.2 Posibles razones que explican la variabilidad genética encontrada en las poblaciones argentinas..... | 93 |
| 6.3.3 Análisis de los valores de F_{st} en relación con los estándares para insectos..... | 95 |
| 7 CONCLUSIONES..... | 96 |
| 8 LITERATURA CITADA..... | 99 |

RESUMEN

La mariposa europea del brote del pino, *Rhyacionia buoliana* Den. & Schiff. (Lepidoptera Tortricidae) es una plaga exótica específica del género *Pinus*, nativa del continente Europeo e introducida en Asia, Norteamérica y Sudamérica, incluyendo Argentina, Chile, Brasil y Uruguay. Su introducción en Argentina (Buenos Aires) se produjo aproximadamente en 1940 habiéndose dispersado en la Mesopotamia, el centro del país y la región de los bosques andinopatagónicos. En esta última se halla desde 1979 y se comporta como univoltina atacando diferentes especies de pinos, con variable intensidad y magnitud de daños. Las larvas se alimentan de los tejidos de las yemas y brotes provocando deformaciones en el fuste y ramas. En las plantas más jóvenes, con menos disponibilidad de brotes, es donde la magnitud de los daños cobra mayor intensidad al aumentar la incidencia del ataque apical.

El incremento del ritmo de forestación con pinos en la región andinopatagónica durante la última década ha aumentado notablemente el riesgo de pérdidas económicas debido a la acción de la mariposa del brote. Dado que se estimaba que la intensidad de ataque y la magnitud del daño eran mayores en *P. radiata* respecto de *P. ponderosa*, y debido a ciertas ventajas silvícolas y tecnológicas de *P. ponderosa*, se acentuó la tendencia a reemplazar la primera especie por la segunda. Sin embargo, a medida que se incrementó la superficie forestada con *P. ponderosa*, ésta comenzó a ser tan atacada como *P. radiata*.

La situación descripta brindó el marco adecuado para plantear un conjunto de objetivos, entre los cuales se destaca la necesidad de profundizar el conocimiento de la biología de *R. buoliana* en plantaciones de *P. ponderosa* y *P. radiata* en la región de los bosques andinopatagónicos. El área de estudio se localizó en la provincia de Chubut. Se otorgó especial énfasis al estudio de la relación insecto-planta hospedante, que se abordó mediante el análisis de la eficiencia biológica del insecto en *P. radiata* y *P. ponderosa* y el examen de las características fenológicas y anatómicas de las yemas-brotes de estas especies. Se estudiaron además otros aspectos biológicos cuyos resultados pudieran servir como sustento científico y técnico para el desarrollo de estrategias de control de la plaga (e.g. relación grados día acumulados-ciclo biológico de la mariposa). Los objetivos principales fueron los siguientes:

- a. Analizar la eficiencia biológica del insecto en *P. radiata* y *P. ponderosa* y examinar las características fenológicas y anatómicas de estas especies.
- b. Estudiar las preferencias de oviposición de hembras de la mariposa obtenidas a partir de larvas desarrolladas en diferentes hospedadores.
- c. Realizar un relevamiento de los himenópteros parasitoides de *R. buoliana* y un monitoreo de los niveles de parasitismo, con vistas al control biológico de la plaga.
- d. Determinar la relación entre grados día acumulados y ciclo biológico de la mariposa, con especial énfasis en el vuelo estacional de los machos, a fin de desarrollar métodos de control basados en la emergencia de adultos..
- e. Analizar la estructura genética poblacional de *R. buoliana* mediante electroforesis de isoenzimas tomando en cuenta poblaciones argentinas asociadas con distintos hospedadores y una población de referencia procedente del área original de distribución de la especie (Alemania).

Para evaluar la *eficiencia biológica de la mariposa en P. radiata y P. ponderosa* se llevaron a cabo una serie de ensayos de laboratorio y de campo. En condiciones de laboratorio se infestaron artificialmente más de

100 plantas de cada una de las especies, implantando larvas pre- y posthibernantes tanto en su hospedante de origen como en un nuevo hospedante; en el campo fueron infestadas 60 plantas con larvas pre- y posthibernantes en sus hospedantes de origen. La evaluación realizada permitió estimar el impacto del ataque del insecto y el rendimiento de las larvas expresado en términos de supervivencia, mortalidad y de determinados índices nutricionales. Los ensayos mostraron que las larvas en general “aceptan” el hospedante en el que son implantadas a pesar de provenir de otra especie forestal, pero su eficiencia es variable. La eficiencia en la conversión del alimento ingerido de *R. buoliana* es baja y está comprendida entre 5% y 19%. Asimismo son también bajas la tasa relativa de consumo y la tasa relativa de crecimiento promedio, mientras que el crecimiento de las larvas es inferior en relación con la cantidad de alimento que ingieren. Por otra parte, los resultados destacan la importancia del tamaño de las yemas-brotes en la magnitud del impacto del daño ocasionado por las larvas, pues a pesar de que el consumo es significativamente superior en *P. ponderosa*, esto se compensa por el mayor tamaño de las yemas en esta especie.

Para estudiar las *preferencias de oviposición* de las hembras desarrolladas en diferentes hospedantes, se realizaron una serie de ensayos de laboratorio empleando jaulas de cría, en las que fueron liberados adultos de ambos sexos, los cuales se sometieron a tratamientos de elección simultánea entre las dos especies forestales y de no elección entre diferentes hospedantes. La preferencia de las hembras se midió contando el número de huevos depositados en cada planta. Las hembras fueron luego disecadas bajo lupa para registrar el estado de los ovarios con respecto a la cantidad de ovocitos no ovipuestos y las reservas del cuerpo graso. Los resultados indicaron que las hembras de *R. buoliana* prefieren ovipositar en la especie hospedante de la cual proceden siempre que se les ofrezcan hospedantes alternativos. En caso contrario depositan sus huevos sobre la especie de *Pinus* ofertada, demostrando que no son altamente selectivas en este sentido y que la experiencia previa de los estados inmaduros influye en este comportamiento. En lo que al cuerpo graso respecta, éste se reduce parcial o totalmente y queda conformado por pequeños paquetes de células muy pequeñas e irregulares, a causa de la demanda y del consumo energético. En los ovarios quedan siempre ovocitos remanentes, y en algunos casos incluso en los ductos laterales y oviducto común, evidenciando que las hembras podrían continuar con la oviposición durante algún tiempo. Las hembras que depositan un menor número de huevos son las que conservan un mayor número de ovocitos remanentes y por el contrario, aquellas que no depositan huevos conservan los ovarios plenos de ovocitos.

El estudio de las *características fenológicas de las especies hospedantes* estuvo referido principalmente a aquellas que pudiesen propiciar una mayor incidencia de ataque. Para ello se efectuó el monitoreo del crecimiento de más de 200 yemas-brotes de *P. radiata* y *P. ponderosa*, distribuidas en plantas de una y otra especie con diferente intensidad de ataque. Complementariamente se llevó a cabo el estudio de los cambios histológicos y el desarrollo del sistema de canales resiníferos en yemas atacadas. Los resultados mostraron que el crecimiento de las yemas-brotes es diferente en ambos hospedantes y tendría influencia en la incidencia del ataque. En *P. radiata*, la velocidad de crecimiento de las yemas-brotes condiciona el grado de ataque a la planta. El parénquima de las yemas es el tejido en el que se evidencian los mayores cambios producidos por el ataque de las larvas. Las células modificaron su forma, sentido de división, engrosaron sus paredes y presentan numerosos gránulos. Por lo contrario, las yemas-brotes de *P. ponderosa* están mejor defendidas en cuanto al desarrollo estructural del sistema primario de defensa.

El relevamiento de himenópteros parasitoides y el monitoreo del comportamiento de los niveles de parasitismo se realizaron durante tres años consecutivos, en una plantación con alta densidad de la plaga e intensidad de ataque. El único parasitoide registrado fue el himenóptero braconídeo *Orgilus obscurator* y en la última temporada se detectaron algunos ejemplares del hiperparasitoide *Perissocentrus* sp. El parasitismo mostró un incremento importante en las sucesivas temporadas, pues en tanto el primer porcentaje registrado fue 6%, aumentó a 57% en el último año. En las pupas no se encontraron parasitoides pero sí casos de predación.

Para determinar la relación entre la acumulación de grados día y el ciclo biológico de la mariposa del brote, se monitorearon los sucesivos estados de desarrollo de la mariposa y el vuelo de los adultos en el campo, mediante trampas de feromonas, al tiempo que se efectuó un registro diario de temperatura ambiente, todo ello durante un período de cuatro años consecutivos. Este monitoreo permitió construir un modelo fenológico para predecir el vuelo estacional del insecto a partir de la primera captura de los machos, que se encuentra en una etapa de validación informal. El seguimiento sistemático del ciclo biológico en el área de estudio posibilitó estimar la temperatura umbral inferior de los distintos estados/estadios de desarrollo de *R. buoliana*, que fueron insumos del modelo. Los resultados permiten también predecir el inicio de los estadios L1, L2, L3 y L4 a partir de las temperaturas acumuladas calculadas desde la captura del primer macho en las trampas.

Para analizar la estructura genética poblacional de *R. buoliana* se practicaron análisis electroforéticos de isoenzimas sobre más de 200 larvas procedentes de tres poblaciones argentinas asociadas con *P. radiata* y *P. ponderosa*. Estos análisis permitieron, en primer término, desarrollar y ajustar el protocolo más adecuado para el estudio de la especie en particular, dado que no se contaba con antecedentes previos. Los ocho loci analizados evidenciaron escasa variación genética, pues sólo 25% de los mismos es polimórfico, correspondiendo a los locus ME y EST-2 con dos alelos identificados. En estas poblaciones se comprobó la desviación de las proporciones de equilibrio de Hardy-Weinberg debida a un gran déficit de heterocigotos y expresada en los elevados valores del coeficiente de endogamia. Estos resultados contrastaron sensiblemente con los obtenidos para la población alemana de referencia, asociada a *P. sylvestris*. En este caso, los 10 loci analizados en más de 150 organismos monitoreados fueron polimórficos y la diversidad génica resultó ser el doble de la correspondiente a las poblaciones argentinas. De la misma manera el déficit de heterocigotos (Fis) fue inferior al de las poblaciones argentinas. En este marco, el efecto fundador o el escaso tiempo de divergencia adquieren relevancia como una de las posibles explicaciones de las diferencias halladas entre las poblaciones de una y otra región geográfica.

A modo de síntesis cabe destacar que el mayor grado de susceptibilidad a la mariposa del brote, atribuido a *P. radiata*, se relaciona principalmente con el menor tamaño de sus yemas, que las larvas llegan a consumir casi completamente, de modo tal que la magnitud del daño observado es mayor que en *P. ponderosa*. En esta última las yemas-brotes se encuentran mejor defendidas debido al gran desarrollo del sistema de canales, en tanto que en *P. radiata* el crecimiento más lento de las mismas predispone a la planta para una mayor incidencia de ataque.

Otros resultados de los estudios biológicos, como la baja selectividad de las hembras de la mariposa para oviponer en una u otra especie de pino, la similar eficiencia biológica de las larvas criadas en

dichos huéspedes, y la falta de diferenciación genética de las poblaciones asociadas con *P. ponderosa* y *P. radiata*, demuestran que ambas especies forestales son igualmente susceptibles de ser atacadas por el insecto. Es por eso que a medida que se extendió la superficie forestada con *P. ponderosa*, la magnitud del ataque comenzó a ser semejante a la observada en plantaciones de *P. radiata*. La causa de este cambio debe buscarse entonces en la mayor disponibilidad espacial y temporal de uno de los huéspedes y no en aspectos relacionados con la selectividad o preferencia por parte del insecto.

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento a todas las instituciones que colaboraron para el cumplimiento de esta investigación: el apoyo financiero se inició en Alemania con una beca otorgada por el Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) y continuó en Argentina con una beca de postgrado del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). El subsidio otorgado por la Fundación Internacional para la Ciencia (IFS) de Suecia permitió solventar la toma de datos para todo el trabajo. Asimismo el Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP) me brindó el lugar de trabajo dentro del Área de Protección Forestal.

En la lista de nombres hay muchas personas que posibilitaron el desarrollo de esta investigación. Le agradezco al Dr. Reinhard Schopf por abrirme las puertas de su instituto en Alemania y apoyarme en todo momento a través de la vasta distancia que nos separa. Estoy singularmente agradecida a la Dra. Analía Lanteri por su incondicional apoyo desde el comienzo del trabajo, su permanente disposición a solventar dudas y resolver problemas. Sus comentarios siempre resultaron valiosos aportes que en muchos casos permitieron redimensionar el trabajo.

Deseo también agradecer muy especialmente al Dr. Mario Rajchenberg, “el jefe”, quien me recibió en Esquel y me apoyó desde un principio en el difícil camino que significó emprender sola una nueva línea de investigación. Mario fue un estímulo local permanente durante todo este proceso formativo, para dimensionar tanto los aspectos formales como la seriedad y responsabilidad que conlleva una empresa de estas características. El Dr. Axel Gruppe con quien hice mis primeras experiencias en bioensayos y a quien debo mis conocimientos sobre electroforesis fue quien posibilitó la incorporación de la genética a mi trabajo. Por todo ello le manifiesto mi reconocimiento. Quiero asimismo agradecer muy especialmente a Ana Lilia Nowak, nuestro “cable a tierra” en Alemania, Beate Rauscher y a todos los compañeros del Instituto de Zoología Aplicada de Munich con quienes compartí dos lindos años.

Mi agradecimiento también para los Dres. Leonardo Gallo y Mario Pastorino de la Unidad de Genética Forestal del INTA Bariloche por su compromiso y constante colaboración durante mi trabajo con isoenzimas. Lo hago extensivo a todos los miembros de esta unidad que me asistieron durante mi trabajo allí como así también al INTA en carácter institucional por haberme permitido realizar los estudios electroforéticos. El Ing. Oscar Troncoso me asistió en todo lo referente a anatomía e histología vegetal, y fue quien practicó gran parte de los cortes con micrótopo. El Ing. Horacio Claverie compaginó la imagen satelital para incluirla en el trabajo. A ambos les agradezco enormemente su ayuda. Mi reconocimiento para las “chicas”, Marcela Hartel y Fernanda Ríos, que me acompañaron y sufrieron en mis salidas de campo y me ayudaron con el procesamiento de las muestras.

Le agradezco sentidamente a mi amiga y compañera Alina Greslebin quien me contuvo con largas charlas y contribuyó a crear el clima de trabajo especial en “nuestro” laboratorio. A “Malaura” Bessio por los mates reparadores del día y a mis otros compañeros del CIEFAP Liliana, Florencia, Ludmila, Marcela, María del Carmen, Maxi, Daniel, Caro, Patricia y Carlos que de una u otra forma colaboraron durante esta investigación. Gracias a los técnicos Luciano Taladriz y Martín Honorato por su apoyo en las tareas de campo, al INTA Trevelin, a los Sres. Eggman, Vargas y Concha por permitirme trabajar en sus plantaciones. También les agradezco a los integrantes de la Universidad Nacional de la Patagonia

Eduardo Nuñez por facilitarme plantas para los ensayos y Roy Gwrzyn por brindarme información meteorológica.

Hacia el final mi inmensa gratitud para quienes son los primeros, mis padres Luisa y Juan Carlos, por facilitarme el camino y mi hermano Leo, que me acompañó en mis primeras experiencias en investigación y de una u otra manera ha representado siempre un gran apoyo.

A mis hijos Antonella y Lionel; quienes son y serán mi reserva anímica y a quienes en primer lugar debo mis disculpas por las horas de juego no compartidas y el “humor” de los últimos tiempos. A mi esposo mi eterno agradecimiento por *todo*, porque sin él este trabajo nunca habría comenzado.

Biología y control de la mariposa europea del brote del pino (*Rhyacionia buoliana* Den. & Schiff.) en la Patagonia argentina

1 INTRODUCCIÓN

La mariposa europea del brote del pino (*Rhyacionia buoliana* Den. & Schiff., Lepidoptera Tortricidae) es una plaga específica del género *Pinus*, cuyas larvas se alimentan de los tejidos de las yemas y brotes provocando deformaciones en el fuste y ramas. Tal como su nombre vulgar lo indica es nativa del continente europeo desde donde amplió su distribución desde principios del siglo XIX hacia diferentes países dentro del mismo continente, Asia y Norteamérica (Escherich 1931). Los daños y pérdidas económicas adquirieron relevancia hasta aproximadamente la década del 80 en países como Alemania, España, Austria, Polonia, República Checa, Canadá y Estados Unidos, donde por diferentes razones los brotes epidémicos se hicieron cada vez más esporádicos y manejables. Éstos países son los que han aportado, a través de investigaciones de diferente naturaleza, gran parte de la información que sirvió de base para manejar la plaga cuando fue introducida en Sudamérica.

En Argentina *R. buoliana* ingresó en la provincia de Buenos Aires y desde allí se distribuyó en tres regiones principales: Mesopotámica, del Centro y Patagónica desde donde continuó su dispersión natural y/o humana (Brewer *et al.* 1968). Su presencia en la Patagonia Andina se remite a 1979, donde desde un foco inicial situado en una plantación de *Pinus radiata* (D. Don) de la localidad de Dina Huapi, provincia de Río Negro, continuó su avance hacia el norte y sur de la región cordillerana (Klasmer *et al.* 1999). Tal como ha ocurrido con otras plagas, desde nuestra región se introdujo en Chile estimativamente en la misma época -en la zona de Ensenada, en Llanquihue- a través de plantas infestadas de *P. contorta* (Engelm.) (Cimma Bozo 1986, Vallejos Moran 1992, Baldini y Alvarez de Araya 1998).

Su ciclo biológico en la región andino-patagónica es anual y la infestación ocurre en las diferentes especies de pinos existentes, con variable intensidad de ataque y magnitud de daños. Las plantaciones que corren mayor riesgo son aquellas cuya edad oscila entre tres y 12 años (Robredo 1970), dado que las plantas tienen menor cantidad de brotes incrementando así la posibilidad de ataque al brote apical. En lugares para recreación hemos observado que los daños reducen el valor estético, pues en las plantas más grandes se destacan brotes laterales curvados que son frecuentemente quebrados por el viento. Los incrementos poblacionales de *R. buoliana* que se registraron en los últimos seis años están relacionados con el aumento de la superficie forestada en la última década, principalmente en las provincias de Neuquén y Chubut (Carabelli *et al.* 2000). Resulta evidente que este logro del sector forestal trajo consigo un incremento del riesgo de pérdidas económicas tal como ha sucedido en las plantaciones de Chile, predominantemente constituidas por *P. radiata* (Baldini *et al.* 1993, Baldini y Alvarez de Araya 1998 e Ide y Lanfranco 1994).

En Chile *R. buoliana* se extendió rápidamente y ocupó casi toda la superficie forestada, haciendo uso de un recurso muy abundante y sin enemigos naturales que pudieran controlar sus poblaciones (Lanfranco *et al.* 1997). Afortunadamente su comportamiento ha sido menos agresivo en la Patagonia argentina, debido a que no existe una continuidad espacial de las plantaciones de pinos y a que el insecto se

introdujo conjuntamente con un parasitoide larval, el braconido *Orgilus obscurator* (Ness.), que actuó desde entonces como agente de control biológico de la plaga.

Un aspecto que se ha tomado en consideración para el manejo de *R. bouliana* se refiere a la vulnerabilidad de las distintas especies de pinos. La intensidad de ataque y la magnitud del daño han sido generalmente mayores en *P. radiata* que en *P. ponderosa* (Dougl. ex Laws), hecho que sumado a ciertas ventajas silvícolas y tecnológicas, contribuyó a que durante varios años se hiciera el reemplazo de plantaciones de la primera especie por la segunda. Las causas de este diferente grado de vulnerabilidad estarían relacionadas con caracteres fenotípicos como el tamaño y crecimiento de las yemas (Gomez 2001) y, probablemente, con diferencias en el sistema de canales resiníferos y propiedades de la resina de ambas especies. No obstante, registros sobre la susceptibilidad de *P. ponderosa* al ataque de la plaga obtenidos en diferentes regiones del mundo, indican que puede darse un amplio rango de variación en dicha susceptibilidad (Schröder 1966; Miller y Heikkinen 1959). En concordancia con estos registros, en la región cordillerana de Argentina hemos constatado que a medida que se incrementó la superficie forestada con *P. ponderosa*, esta especie comenzó a ser tan atacada como *P. radiata*.

Las estrategias para el manejo integrado de la plaga que se han desarrollado exitosamente en Chile involucran acciones en el marco del control químico, biológico y silvícola acompañadas del marco legal regulatorio (CONAF 1993, De Ferrari Fontecilla 1997). La aplicación de productos químicos del grupo de los piretroides se lleva a cabo cuando la intensidad de infestación es muy alta y se desea disminuir drásticamente la densidad poblacional para aplicar otro método de control más efectivo a largo plazo - tal como el control biológico-, o bien en el caso de los plantines en viveros. Dado que el insecto permanece protegido dentro del brote la mayor parte de su ciclo de vida, la aplicación de insecticidas se efectúa principalmente sobre los adultos cuando éstos alcanzan un 30- 40% del vuelo (*Goycoolea com. pers.*) y también sobre las larvas de los estadios uno y dos que son los que permanecen más expuestos fuera de los brotes. El control biológico implementado utiliza un complejo de parasitoides nativos e introducidos y también favorece la acción de diferentes grupos de predadores invertebrados y vertebrados (Lanfranco *et al.* 1997). Mientras tanto, el manejo silvicultural favorece el cierre temprano de las copas de los árboles y contempla el corte manual de brotes infestados en superficies pequeñas (De Ferrari Fontecilla 1997).

En el marco de esta descripción con alcances geográfico y biológico, resulta necesario ofrecer una breve descripción del ciclo de vida de la especie, la que al mismo tiempo facilita la contextualización de la investigación realizada. La hembra deposita sus huevos en verano preferentemente en los brotes nuevos, las larvas de los estadios uno y dos se alimentan de la base de las acículas y luego el segundo estadio larval penetra en las yemas nuevas y se alimenta en su interior. Cuando la yema ha sido parcial o totalmente ahuecada, la larva se dirige a otra yema y continúa alimentándose hasta el invierno, en que entra en dormancia como larva del estadio tres y/o cuatro. Estas larvas reanudan su actividad cuando la temperatura asciende a 15°C o más durante tres o cuatro días consecutivos y migran hacia la parte alta de las copas continuando con su alimentación en el interior de las yemas hasta alcanzar el último (sexto) estadio. La pupación ocurre en el interior de la yema aproximadamente durante octubre-noviembre y la emergencia de los adultos se inicia aproximadamente a principios de diciembre y continúa hasta comienzos de febrero dependiendo siempre de las condiciones climáticas.

La emergencia de los adultos puede predecirse mediante diferentes procedimientos: a) monitoreo de las pupas, método que asume que el primer vuelo ocurrirá cuando se alcance el 80% de pupas y el 20% de larvas (Regan *et al.* 1991); b) construcción de las curvas de emergencia monitoreando los estados de desarrollo presentes y las exuvias de pupas; y c) cálculo de grados día. Los dos métodos indicados en primer término son muy laboriosos y requieren personal entrenado, además de un alto grado de infestación en la plantación. Ambos procedimientos resultan poco prácticos dadas las características de las plantaciones de la zona andino-patagónica de Argentina, donde el monitoreo está a cargo de personal de campo que fundamentalmente se ocupa de la vigilancia, sin entrenamiento para el relevamiento ni el reconocimiento de problemas fitosanitarios. El método del cálculo de los grados día, por el contrario, puede constituir una herramienta de factible aplicación, con la que el personal del lugar puede familiarizarse rápidamente. Si la relación que se obtiene es estadísticamente significativa se puede utilizar para aumentar la eficiencia del control químico.

La adaptación del método de los grados día a las condiciones ambientales y logísticas locales, con la finalidad de contribuir al control de la plaga, es uno de los tres aspectos centrales que ha abordado esta investigación. Complementariamente, el análisis precedente de la situación regional ha puesto de manifiesto la necesidad de profundizar el conocimiento de la biología de *R. buoliana* en plantaciones de *P. radiata* y *P. ponderosa* en Patagonia, con especial énfasis en la relación insecto-planta hospedante. También producto de este análisis en relación con el aumento gradual de la incidencia sobre *P. ponderosa* se efectuaron estudios de aproximación al conocimiento de la estructura genética de *R. buoliana* sobre poblaciones argentinas y una población patrón tomada como referencia proveniente del área de distribución originaria de la especie.

2 OBJETIVOS

La concepción fundamental de este trabajo se basó en dos aspectos relevantes a nivel regional: el reemplazo gradual de plantaciones de *P. radiata* por *P. ponderosa* y el registro de incrementos poblacionales de *R. buoliana* sobre la especie reemplazante a medida que se ha ido incrementando su superficie cultivada. Tanto este aumento en la disponibilidad del recurso como ciertas características biológicas de la plaga en estrecha asociación con el hospedante podrían ser los causantes del incremento poblacional registrado sobre plantaciones de *P. ponderosa*. Este marco permitió plantear los objetivos de la investigación en tres campos principales referidos a la biología, control de la especie plaga y estructura genética. Seguidamente se enuncian tales objetivos precedidos de una breve descripción contextual.

En lo referido a la biología, el énfasis fue dado a estudiar la eficiencia biológica asociada con ambas especies de hospedantes, tarea que se llevó a cabo mediante la infestación artificial de plantas de *P. radiata* y *P. ponderosa* y el seguimiento de los estados de desarrollo inmaduros del insecto en el campo. En íntima relación con este aspecto se estudió si *R. buoliana* tiene preferencias de oviposición por una u otra especie de pino en relación con su procedencia o bien puede oviponer indistintamente en ambas especies. La respuesta a este planteo se canalizó mediante ensayos de preferencias de oviposición efectuados en laboratorio.

En forma complementaria se abordó el estudio de características fenológicas y anatómicas de ambas especies de pino para analizar la relación insecto – planta. El crecimiento de yemas y brotes en relación con el ciclo del insecto y el desarrollo de los canales de resina fueron monitoreados en terreno. Se consideró importante incluir el estudio anatómico mencionado en último término al considerar la función como barrera que cumple la resina frente al ataque y su influencia en la capacidad de la planta para defenderse. Para ello se observaron cortes efectuados con micrótopo y se analizaron las características más relevantes de los canales resiníferos en ambas especies. La identificación de parasitoides y monitoreo de los niveles de parasitismo fueron también incluidos en el estudio mediante la recolección de brotes infestados en el campo y la posterior cría y/o disección del material en el laboratorio.

Un aspecto no menos importante que los anteriores, una vez que se constató la carencia de información científica al respecto, fue aquel relacionado con medidas de control para el manejo de la plaga. En consecuencia mi tarea se centró en determinar la relación entre la acumulación de grados día y el ciclo biológico de *R. buoliana*, con especial énfasis en el vuelo estacional de los machos, con la finalidad de aplicar tal relación al desarrollo de métodos de control basados principalmente en la emergencia de adultos. Para ello se monitorearon los sucesivos estados de desarrollo, el vuelo de los adultos en terreno mediante trampas de feromonas, al tiempo que se efectuó un registro diario de temperatura ambiente, todo ello durante un período de cuatro años consecutivos.

La inquietud que permitió profundizar el conocimiento sobre la estructura genética de *R. buoliana* asociada con *Pinus* sp. desde hace varias generaciones, se generó al esbozar la hipótesis de que era factible que existiesen diferencias genéticas entre las poblaciones que atacan a una y otra especie de pino. Con esta finalidad se llevaron a cabo análisis electroforéticos de isoenzimas de poblaciones argentinas asociadas con ambos hospedantes y de una población europea de referencia.

A modo de síntesis se enumeran a continuación los objetivos destacados del estudio:

1. Analizar la eficiencia biológica del insecto en *P. radiata* y *P. ponderosa* y examinar las características fenológicas y anatómicas de estas especies.
2. Estudiar las preferencias de oviposición del insecto plaga proveniente de diferentes hospedantes.
3. Realizar un relevamiento de los himenópteros parasitoides de *R. buoliana* y un monitoreo de los niveles de parasitismo, con vistas al control biológico de la plaga.
4. Determinar la relación entre la acumulación de grados día y el ciclo biológico de la mariposa del brote con especial énfasis en el vuelo estacional de los machos para ser usada en el desarrollo de métodos de control basados principalmente en la emergencia de adultos.
5. Estudiar la estructura genética de *R. buoliana* asociada con *Pinus* sp. desde hace varias generaciones.

3 ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio incluye diferentes plantaciones de las especies *P. radiata* y *P. ponderosa* ubicadas en la provincia de Chubut (Figura 3.1). La alta frecuencia de recolección de datos hizo que por razones de distancia las plantaciones ubicadas en la provincia de Neuquén no fueran incorporadas a este trabajo de tesis. No fue posible seleccionar plantaciones situadas en la provincia de Río Negro, con mayor proximidad al foco inicial de ataque de la plaga, pues están constituidas por árboles de altura considerable, ya podados, en los que la observación y el acceso a los brotes infestados resultan singularmente dificultosos. Por otra parte, en estas plantaciones que soportaron mayor intensidad de infestación cuando se introdujo la plaga, se realizan periódicamente liberaciones de parasitoides en el marco de estudios de control biológico.

Para la selección de los sitios de relevamiento y de recolección del material se realizó un intenso trabajo previo durante los meses de septiembre y octubre de 1999, que consistió en la recopilación de información y detección de posibles forestaciones. Esta tarea, que se basó en los datos proporcionados por la Dirección General de Bosques y Parques (DGBYP) de la provincia de Chubut y por los técnicos de la Estación General San Martín del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), ubicada en el paraje “Las Golondrinas” –en el límite preciso con la provincia de Río Negro–, contempló el tipo de manejo silvícola practicado en las plantaciones, superficie, especie, edad y la ejecución de acciones de control mediante la liberación de parasitoides.

El relevamiento concluyó con la preselección de siete forestaciones que se detallan a continuación conjuntamente con una breve caracterización:

- a) Plantación de *P. radiata* en Dina Huapi (Río Negro), de 16 años de edad con manejo silvícola (raleo y poda reciente) y 50 hectáreas de extensión. Esta plantación debió excluirse por haberse podado durante la temporada de invierno.
- b) Plantación de *P. radiata* en Epuyén (Chubut), de 15 años de edad sin manejo silvícola y 15 hectáreas de superficie.
- c) Plantación de *P. ponderosa* en Epuyén, de siete años de edad, aún sin manejo silvícola.
- d) Plantación mixta de *P. radiata* y *P. ponderosa* en la Laguna La Zeta (Chubut) de 18 y 10 años de edad respectivamente, con manejo silvícola que involucra parte de su superficie y 5 hectáreas de extensión.
- e) Plantación de *P. radiata* en Esquel (Chubut) con edad entre 13- 16 años, precaria intervención silvícola y 3 hectáreas de superficie.
- f) Plantación de *P. ponderosa* en Esquel, con edad entre 10-12 años, sin manejo silvícola y 1 hectárea de extensión.
- g) Plantación de *P. ponderosa* con algunos ejemplares aislados y más grandes de *P. radiata* y *P. contorta* en Trevelin (Chubut), con edad entre 10- 12 años, sin manejo silvícola y 10 hectáreas de superficie.

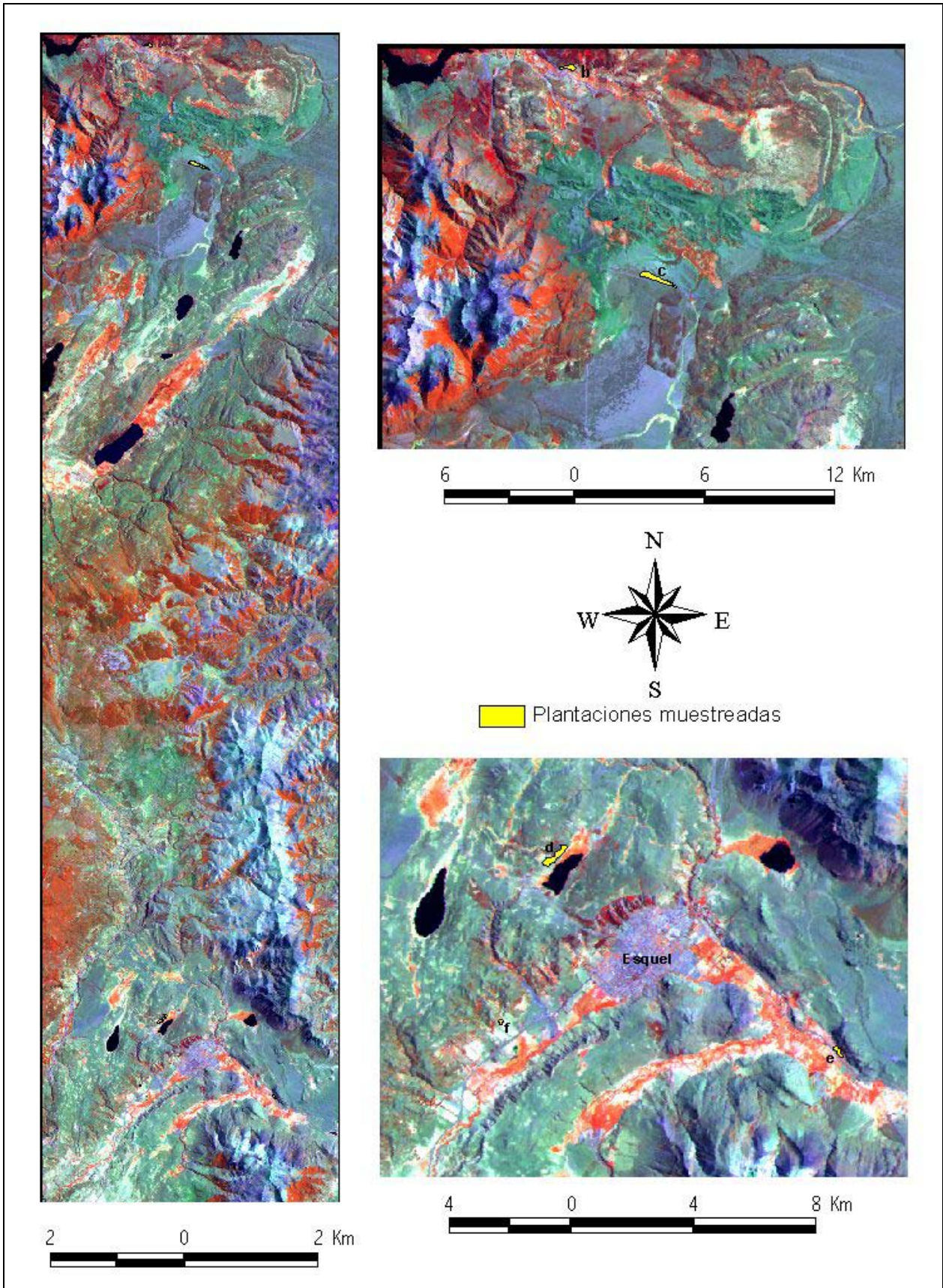


Figura 3.1. Ubicación de los sitios de muestreo en el área de estudio en la provincia de Chubut.

Para cada una de las líneas de investigación planteadas se seleccionaron finalmente diferentes sitios atendiendo a cuatro requisitos principales: a) ubicación alejada de los lugares experimentales de liberación de parasitoides, b) alto nivel de infestación -dado que para uno de los estudios las plantaciones seleccionadas deberían tolerar un muestreo destructivo durante al menos tres años-, c) antigüedad del ataque superior a los cuatro años y d) fácil acceso y garantía de protección para la instalación de casetas meteorológicas.

A continuación se describe cada uno de los estudios realizados con una caracterización más detallada de los sitios de muestreo.

Análisis de la eficiencia biológica en el campo

Estos estudios se realizaron en la plantación **d** –Laguna La Zeta, Chubut- (43°28' L.S. y 71°35' L.O.) en la que coexisten rodales de ambas especies y de diferente edad. Dos situaciones deben destacarse: el irregular trazado de los caminos cortafuegos y la extracción de madera, que de acuerdo con información proporcionada por profesionales de la DGByP, se realiza en forma ilegal. El sotobosque es principalmente de pastos.

Estudios de preferencias de oviposición

Durante la primera temporada en que se realizaron los ensayos se recolectaron brotes infestados de las plantaciones **c** –Epuyén, Chubut- (42°30' L.S. y 71°32' L.O.), **d** (recolección de plantas de *P. radiata* únicamente), **e** –Esquel, Chubut- (43°34' L.S. y 71°24' L.O.) y **g** –cercana a la localidad de Trevelin, Chubut, propiedad de la Estación Experimental Agroforestal (EEA) del INTA- (43°05' L.S. y 71°31' L.O.), mientras que durante la segunda temporada sólo se recolectaron de las plantaciones **e** y **g**. La plantación **c** se caracteriza por el ataque intenso y focalizado en un sector muy reducido que incluye plantas de aspecto achaparrado, algunas de ellas con su parte apical clorótica y en vías de desecación. En la segunda temporada de recolección se detectaron pocos brotes infestados en proporción al total de individuos presentes, cuya detección insumía demasiado tiempo de muestreo, motivo por el cual este sitio fue excluido. Es probable que el intenso muestreo destructivo realizado durante el año anterior haya favorecido y acelerado un proceso de decaimiento poblacional que ya estaba en curso.

Una gran cantidad de brotes infestados de *P. radiata* de la plantación **d**, descrita precedentemente, fue colectada de pequeños rodales de esta especie que presentaban una elevada intensidad de ataque. Sin embargo, estos rodales fueron podados en la temporada siguiente, hecho que comprometió ostensiblemente el acceso a los brotes más elevados, con lo cual esta plantación debió también excluirse para muestreos posteriores.

Estudios de fenología, relevamiento de parasitoides y monitoreo de los niveles de parasitismo

Estos estudios se llevaron a cabo en la plantación **e**. Si bien la especie predominante es *P. radiata*, ubicado en el centro se encuentra un rodal pequeño de *P. ponderosa* entre 10- 12 años de edad con variable intensidad de ataque. La especie forestal dominante presenta un nivel de infestación muy alto que se manifiesta desde hace aproximadamente ocho años y afecta prácticamente al 100% de las plantas. Los individuos afectados presentan deformaciones fustales de diferente tipo y grado llegando a casos extremos de disminución del crecimiento, comprobables por su aspecto achaparrado. Tal

condición sanitaria impide el aprovechamiento comercial y constituye un posible foco de atracción para el asentamiento de otras plagas. Esta situación se ve especialmente favorecida por su ubicación lindante con la única ruta de acceso a la ciudad de Esquel. A estas características desfavorables se suma un manejo silvícola inadecuado, pues las podas se efectúan habitualmente fuera del período invernal y son sólo parciales porque incluyen algunos individuos arbitrariamente seleccionados. Resulta además evidente que este tipo de manejo no considera la presencia de la plaga como un elemento condicionante para las prácticas silviculturales. El sotobosque está conformado por pastizales y en derredor se ubica una forestación de 300 hectáreas de *P. ponderosa*.

Estudio de la relación entre el ciclo biológico y la temperatura

Este estudio se realizó también en la plantación **e**. Para el monitoreo de la emergencia de los adultos de la tercera temporada (2001-2002) se anexó la plantación **g**. La edad de las plantas es de 20 años para *P. radiata*, 17 años para *P. contorta* y entre 10- 12 años para *P. ponderosa*. La intensidad de ataque es moderada y compromete fundamentalmente a los ejemplares de la especie predominante, en los que se observan grados variables en la intensidad de ataque sobre distintos individuos. Asimismo, el daño ocasionado por *R. buoliana* se acentúa en las plantas más pequeñas y/o brotes de ramas inferiores por el ramoneo de *Lepus europaeus* (liebre europea), otra plaga existente en la zona que se alimenta de los brotes cuando escasean las herbáceas que le sirven de alimento en el otoño- invierno.

Estudio de la estructura genética

Se monitorearon poblaciones procedentes de las plantaciones argentinas **b**, **e** (de *P. radiata*), **f** (de *P. ponderosa*) y de la plantación de referencia localizada en Alemania. La plantación **b** está ubicada en el noroeste de la provincia de Chubut (42°14' L.S. y 71°20' L.O.). La distancia entre las plantaciones de *P. radiata* es de 130 km y de 6 km entre **e** y **f**. En la plantación **b** el sotobosque está constituido por matorrales de rosa mosqueta (*Rosa eglanteria*) que dificultan el acceso a los brotes infestados. El nivel de infestación es moderado- bajo y se concentra en un sector de la misma. La plantación **f** (43°33' L.S. y 71°37' L.O.) carecía de manejo silvícola al momento de la recolección de brotes pero fue podada con posterioridad. Se trata de una superficie reducida y aislada de bosque rodeada por pastizales que también conforman el sotobosque. Se observan también algunos daños ocasionados por la liebre europea.

La plantación alemana monitoreada corresponde a la especie *Pinus sylvestris* L. y está ubicada en la localidad de Oberberghausen, a 40 km al noroeste de la ciudad de Munich. La edad de la plantación es de diez años, no tiene tratamiento silvícola y ocupa 3 hectáreas. En estrecha proximidad se encuentran forestaciones de otras especies de coníferas y latifoliadas como parte de un Arboretum que pertenece al Servicio Forestal de Baviera.

4 METODOLOGÍA

4.1. Estudio de la biología de *R. buoliana*

4.1.1 Análisis de la eficiencia biológica en *P. radiata* y *P. ponderosa*

Este estudio se llevó a cabo mediante la infestación artificial de plantas con larvas en diferentes etapas de maduración (pre y posthibernantes) y comprendió dos modalidades diferentes: la transferencia de larvas a un nuevo hospedante (ensayos en laboratorio) y la cría de las mismas en su hospedante natal o de origen (ensayos en laboratorio y en el campo). El trabajo se centró en aspectos relacionados con el tamaño de las yemas como una forma de estimar el impacto del ataque del insecto así como el rendimiento de los estados inmaduros expresado fundamentalmente en términos de supervivencia (S), mortalidad –se diferencian estos términos porque las larvas no recuperadas al final del ensayo no se consideraron muertas o vivas- y de los siguientes índices nutricionales: tasa relativa de crecimiento promedio (TRCP), TRCP/peso promedio a los efectos de efectuar comparaciones entre hospedantes (Fisher 1921, Radford 1967, Van Emden 1969, Castle y Berger 1993 *fide* Dent y Walton 1997; Kogan y Cope 1974), índice de consumo (IC), eficiencia de la conversión del alimento ingerido (ECI), tasa de consumo (TCs), tasa relativa de consumo, TCsR/peso promedio para efectuar comparaciones entre hospedantes, tamaño y estadio de desarrollo de las larvas. En el caso del tamaño se consideraron el ancho de la cápsula cefálica, la longitud y el índice corporal (ICp), éste último expresado como una función del volumen del organismo -donde la estimación volumétrica correspondió al volumen de un cilindro- (Dean *et al.* 1961).

Para el cálculo de los índices se emplearon las fórmulas que a continuación se detallan:

(1) TRCP: $[\ln(W_1) - \ln(W_0)]/d$

(2) TRCP: $[\ln(W_1) - \ln(W_0)]/d$ / peso promedio

donde:

W_1 = Peso final

W_0 = Peso inicial

d = tiempo de desarrollo (en días)

(3) IC: cantidad de alimento ingerido/Peso fresco promedio

(4) ECI: crecimiento/cantidad de alimento ingerido

donde:

crecimiento = Peso final - Peso inicial

(5) TCs: cant. de alimento ingerido/días

(6) TCsR: [cant. de alimento ingerido/días] / peso promedio

(7) S: N° larvas recuperadas al final de ensayo/N° larvas al inicio del ensayo

(8) ICp: $\pi \times (\text{ancho de la cápsula cefálica}/2)^2 \times \text{long. corporal}$

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test no paramétrico para dos muestras independientes de Mann-Whitney. Todos los análisis se realizaron con el programa SPSS 9.0.

4.1.1.1 Determinación de la cantidad de alimento consumido por las larvas

Para estimar la cantidad de alimento ingerido por las larvas se emplearon dos procedimientos:

a) *Establecimiento de categorías fijas de yema/brote consumidos*: se establecieron ocho categorías en base al porcentaje de tejido consumido con respecto al volumen total de las yemas/brotes, de acuerdo con el siguiente detalle: 100%, 90%, 75%, 50%, 25%, 12%, 6% y 1%. A cada una de estas categorías se asignaron las yemas/brotes consumidos por las larvas durante los ensayos. Para estimar el volumen de las yemas se consideró el cono como la figura geométrica más afín a la cual aproximarla ($\text{Vol. cono} = 1/3\pi \times r^2 \times h$). De esta forma, los índices calculados se relacionaron directamente con el volumen (en mm^3) de biomasa fresca.

b) *Análisis de la relación entre el volumen y peso seco de yemas/brotes*: el objetivo de esta práctica fue independizar los índices de rendimiento de una escala arbitraria y fija de porcentajes y expresarlos directamente en unidades de biomasa en peso. Sin embargo, esta inquietud surgió luego de haber efectuado los análisis de los datos provenientes de larvas prehibernantes, por lo que dicha metodología sólo pudo probarse en los ensayos de laboratorio con larvas posthibernantes. En este contexto se estudiaron ambas variables mediante un análisis de regresión para hallar la función que mejor ajustara y describiera la relación entre ambas, con la finalidad de determinar el peso seco que tenían las yemas/brotes antes de ser consumidas (variable respuesta) según su volumen (variable predictora o independiente). Para ello se colectaron 220 y 340 yemas/brotes de *P. ponderosa* y *P. radiata* respectivamente, provenientes de dos plantaciones diferentes que se muestrearon en abril antes de la finalización del período vegetativo y en octubre luego de su reinicio.

Mediante un calibre se registraron el largo y el diámetro (medido en la base de cada yema/brote) de cada yema, su peso fresco y el peso seco. El secado se realizó con acúlas incluidas en estufa a 100°C durante tres días consecutivos y el peso se obtuvo con una balanza con precisión de 0.1mg. Del mismo modo que en el procedimiento anterior, el volumen de las yemas se aproximó al volumen correspondiente a un cono de sus dimensiones. La biomasa -expresada en mg- consumida por las larvas en cada yema atacada se calculó mediante la diferencia entre el peso seco obtenido de la función de ajuste y el peso seco medido al momento de finalización del ensayo. El análisis de regresión se llevó a cabo con el programa estadístico SPSS 9.0.

4.1.1.2 Eficiencia biológica de las larvas transferidas a un nuevo hospedante

a) Ensayo con larvas prehibernantes

Este estudio se llevó a cabo mediante un ensayo de implante de larvas en plantines de *P. radiata* y *P. ponderosa*. Las larvas fueron obtenidas en terreno hacia fines del mes de febrero a partir de la recolección de aproximadamente 170 brotes infestados de una plantación de pino radiata. En el laboratorio se

extrajeron las larvas de los brotes y se colocaron en cápsulas de Petri en grupos de 25 por cápsula. Las cápsulas se prepararon previamente con una base de gelatina sin sabor para conservar la humedad. Con el objeto de evitar la excesiva manipulación de estas larvas que eran muy pequeñas y frágiles, se pesó cada cápsula y se calculó el peso fresco promedio de las larvas de cada una. Las cápsulas se conservaron en la heladera hasta el día siguiente en que se procedió a la infestación artificial.

En 36 plantines de pino de cada especie mencionada y de cuatro años de edad se infestó una ramilla con brotes por cada planta, colocando dos larvas mediante un pincel. Preferentemente se infestaron las ramillas terminales, pero en los casos en que sus yemas fueran muy grandes y bien desarrolladas se emplearon las ramillas laterales para asegurar el éxito del implante. Se trató que ambas larvas fueran de diferente tamaño para lograr una mejor distribución de las larvas según esta variable en las distintas ramas. Se consideró también conveniente implantar las larvas de mayor tamaño en aquellas ramillas con yemas más suculentas y más grandes para asegurar así la supervivencia de las larvas y el éxito del implante, puesto que lo más importante era recuperar la mayor cantidad de larvas implantadas para efectuar las mediciones pertinentes. El peso fresco promedio de las larvas implantadas en pino radiata fue de 0.6 mg y de 0.7 mg para las larvas implantadas en pino ponderosa.

Una vez infestadas las ramillas se las cubrió con una bolsa de nylon previamente perforada durante un período de aproximadamente un mes, cuando se verificó el “prendimiento” de las larvas. El ensayo se realizó al aire libre y bajo las mismas condiciones ambientales para ambas especies. La duración del ensayo fue de 49 días (desde el 14/02 al 04/04 de 2001). Una vez finalizado el ensayo, se cortaron las yemas infestadas, se midieron y se extrajeron las larvas registrándose también su peso fresco y medidas corporales (ancho de la cápsula cefálica y longitud del cuerpo). Las larvas se disecaron bajo lupa para determinar la presencia de parasitoides, en caso que pudieran registrarse diferencias entre ambas especies de hospedante atribuibles a los mismos. Cabe destacar que seis de las plantas de *P. ponderosa* infestadas fueron sustraídas del vivero, por lo que no pudieron ser evaluadas.

b) Ensayos con larvas posthibernantes

Este ensayo se llevó a cabo durante dos temporadas consecutivas, incorporando algunos cambios respecto del ensayo anterior. Un total de 240 ramas con brotes infestados provenientes de la misma plantación se procesaron de la misma manera, pero las larvas fueron pesadas individualmente. Su peso fue registrado e identificado con la planta donde se implantaron. La implantación se llevó a cabo inmediatamente después de haberse pesado el par de larvas. Al igual que para el ensayo anterior, se infestaron las ramas terminales de las plantas y se cubrieron con bolsas de nylon previamente perforadas. Las bolsas se retiraron siete días después de iniciado el ensayo debido a las altas temperaturas que aumentaban considerablemente la transpiración de las plantas. No obstante, se controló el prendimiento para este momento, que fue del 98%. En dos casos debieron reponerse ambas larvas implantadas tres días después de iniciado el ensayo.

Se infestaron en total 45 plantas de cada especie forestal dispuestas en grupos de 15 plantas. Las mismas se dejaron al aire libre sujetas a las mismas condiciones ambientales. La duración del ensayo fue de 20 días para la primera temporada (desde el 26/10 al 15/11 de 2001) y de 17 días (desde el 15/11 al 02/12 de 2001) para la segunda. Una vez concluido el ensayo se procedió de la misma manera que en el caso anterior.

4.1.1.3 Eficiencia biológica de las larvas criadas en sus hospedantes de origen

Este estudio se llevó a cabo mediante la implantación artificial de larvas en los brotes correspondientes a las plantas de la forestación seleccionada. Las larvas se colectaron de brotes infestados provenientes de esta misma forestación. La recolección de estos brotes se efectuó a comienzos de los meses de abril y octubre para las larvas pre y posthibernantes respectivamente, los que fueron procesados en laboratorio de la misma forma descrita para los ensayos con plantines. El peso fresco de las larvas se obtuvo en forma conjunta para todas las larvas a los efectos de evitar la excesiva manipulación en el caso de las prehibernantes, más pequeñas, y para simplificar el trabajo en el campo en el caso de las posthibernantes. El peso fresco promedio de las larvas implantadas en el primer caso fue 0.8 mg en ambos hospedantes y en el segundo caso (posthibernantes) de 1.97 mg y 2.37 mg en *P. radiata* y *P. ponderosa* respectivamente.

Por cada especie forestal se seleccionaron 30 brotes -en los meses indicados y para cada momento de desarrollo larval- para ser infestados artificialmente, los que en lo posible estaban ubicados en plantas contiguas. Las larvas se implantaron al día siguiente de su recolección y los brotes infestados se aislaron con bolsas de malla de nylon. El tiempo de duración de los experimentos fue de 45 días (desde el 15/04 al 29/05) y de 15 días (desde el 11 al 26/10) para las larvas pre y posthibernantes respectivamente.

Del mismo modo que en los casos anteriores se midieron las yemas infestadas y se efectuaron las mismas mediciones para las larvas colectadas.

4.1.2 Estudio de preferencias de oviposición

Para este estudio se realizaron ensayos en jaulas de cría en laboratorio empleando material recolectado del campo. Los adultos necesarios para estos ensayos se obtuvieron a partir de la cría de pupas extraídas de brotes infestados provenientes de las plantaciones previamente descritas. Las pupas se sexaron bajo la lupa (Escherich 1931, Robredo 1978) y se pesaron individualmente en una balanza con precisión de 0.1 mg, separándolas de acuerdo a la plantación de origen. Se colocaron diez pupas del mismo sexo por cada envase plástico de 250 ml, en el que se introdujo una tira de papel de filtro plegada para que los individuos recién emergidos pudieran suspenderse de ella y facilitar así la extensión completa de las alas. Parte de estos envases se colocaron en desecadores con una solución saturada de ClNa para obtener una humedad relativa del 80% necesaria para la emergencia (Cisternas y Zuñiga 1988). El resto de los recipientes se conservó en la heladera a 4°C y se fue retirando de ella en la medida que se necesitaron más imagos.

Los brotes en los que aún se encontraron larvas de los últimos estadios (L5- L6) se conservaron también en desecadores bajo las mismas condiciones de humedad. Las larvas se criaron hasta que alcanzaron el estado de pupa y fueron luego procesadas siguiendo el mismo procedimiento previamente indicado.

Los adultos recién emergidos que estaban en buenas condiciones -con las alas completamente extendidas-, se aspiraron con un succionador y se liberaron en las jaulas de cría de 60 cm³. Cuando no se dispuso de la cantidad de adultos necesaria para instalar una nueva jaula, éstos se conservaron en

recipientes en la heladera a 4°C durante un lapso no superior a tres días. Transcurrido este intervalo, los adultos que no se utilizaron fueron desechados.

En cada jaula se colocaron dos recipientes con 4 ramas con brotes nuevos de una u otra especie de pino y aproximadamente 35 cm de longitud recolectados de las mismas plantaciones de donde provenían los adultos. Toda vez que fue posible se ofrecieron ramas con la misma cantidad de brotes nuevos. Se aplicaron dos tipos de tratamiento: a) de elección simultánea entre las dos especies forestales y b) de no elección entre diferentes hospedantes -solamente se ofreció una especie-. En cada jaula se liberaron tres individuos de cada sexo de la misma procedencia (*P. radiata* o *P. ponderosa*) en un lugar neutral en el centro de la jaula y se les permitió depositar sus huevos. Se dispuso de ocho jaulas para ser usadas simultáneamente, aunque usualmente pocos replicados pudieron establecerse al mismo tiempo. La frecuencia de armado de cada jaula dependió de la cantidad de adultos emergidos, que constituyó la principal limitante del ensayo puesto que técnicamente no fue posible manipular el momento de la emergencia. Las jaulas se dispusieron en una cámara climatizada en condiciones de temperatura y humedad constantes -23-24°C y 40- 45% de humedad relativa-.

Se registró la preferencia por el hospedante en asociación con la cópula pues se testeó la preferencia de las hembras en presencia de los machos. A los efectos de simplificar el ensayo, principalmente debido a la imposibilidad de sincronizar el armado de las jaulas, los machos no se retiraron de la jaula una vez que copularon. De esta manera es posible que también los machos hayan influido en la preferencia. Otra fuente de variación que debe ser mencionada y que no puede segregarse de los resultados obtenidos es que las hembras son capaces de oviponer huevos no fertilizados – inviábiles- en ausencia o ante la falta de machos que las atraigan. La preferencia de las hembras se midió contando el número de huevos depositados en cada planta hospedante. Asimismo se registró la ubicación de los mismos en las ramas, el número de huevos por puesta, tamaño y viabilidad. Cada ensayo se dio por concluido luego de una semana de la instalación de la jaula. Los machos se desecharon y las hembras se disecaron bajo lupa para registrar el estado de los ovarios con respecto a la cantidad de ovocitos sin depositar y las reservas del cuerpo graso.

Cabe destacar que en el diseño inicial del experimento se incluyeron varias opciones de tratamientos distintos para darle mayor consistencia a los resultados. Sin embargo, la restricción impuesta por la disponibilidad de suficiente material permitió una concreción solo parcial de estos tratamientos. Esta circunstancia condujo a una simplificación y replanteo del experimento para la siguiente temporada. Las variantes inicialmente consideradas fueron las siguientes:

- a) *R. buoliana* procedente de *P. radiata* + hospedante ofertado *P. radiata*
- b) *R. buoliana* procedente de *P. radiata* + hospedante ofertado *P. ponderosa*
- c) *R. buoliana* procedente de *P. radiata* + hospedantes ofertados *P. radiata* y *P. ponderosa*
- d) *R. buoliana* procedente de *P. ponderosa* + hospedante ofertado *P. radiata*
- e) *R. buoliana* procedente de *P. ponderosa* + hospedante ofertado *P. ponderosa*
- f) *R. buoliana* procedente de *P. ponderosa* + hospedantes ofertados *P. ponderosa* y *P. radiata*

Los datos se analizaron estadísticamente mediante la prueba U de Mann- Whitney, testéandose para cada procedencia el número de huevos depositados sobre los dos hospedantes ofrecidos

simultáneamente. En este tipo de estudios se emplea habitualmente el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía puesto que es más eficiente en la detección de desviaciones de la hipótesis nula. Sin embargo, debido a que los datos no cumplían con los supuestos teóricos de este tipo de análisis ni siquiera recurriendo a la transformación de la variable a analizar, se aplicó el método no paramétrico análogo precedentemente citado. Se realizó también la prueba de *t* para establecer la significación de la diferencia entre las medias del peso fresco de las pupas machos y hembras de diferentes procedencias, como así también para el tamaño de los huevos depositados por las hembras de procedencias diferentes. Para estos análisis se utilizó el software SPSS 9.0.

4.1.3 Crecimiento de las yemas-brotes y caracteres anatómicos de las yemas perforadas

Los estudios sobre crecimiento de yemas-brotes se llevaron a cabo en la plantación **e**, en la cual se seleccionaron 24 plantas de la especie *P. radiata* y 20 de la especie *P. ponderosa*, las que fueron asignadas a diferentes categorías de intensidad de ataque. Las categorías preestablecidas fueron las siguientes:

- a) árbol sano sin ataque,
- b) intensidad baja (porcentaje de yemas atacadas inferior al 30%),
- c) intensidad moderada (porcentaje de yemas atacadas comprendido entre 30%-50%) y,
- d) intensidad alta (porcentaje de yemas atacadas superior al 50%).

La asignación a cada categoría se realizó mediante estimación visual y considerando a la planta dividida en tres estratos: superior, medio e inferior. Cada uno de estos estratos fue inspeccionado u observado por separado y luego se promedió el estado sanitario para toda la planta. En *P. radiata* se identificaron 11 plantas con baja intensidad de ataque, cinco con intensidad moderada y ocho con intensidad alta, en tanto que no se registraron plantas sanas. En *P. ponderosa* no se identificaron plantas con intensidad de ataque elevada, mientras que 10 plantas se clasificaron en la categoría de baja intensidad, dos en la de intensidad moderada y ocho como individuos sanos. Es pertinente destacar que en la situación inicial del monitoreo las yemas-brotes de *P. ponderosa* eran más grandes que las de *P. radiata* (1.76 cm de longitud y 0.48 cm de diámetro en *P. ponderosa*, mientras que en *P. radiata* los valores respectivos fueron de 0.92 cm y 0.32 cm).

a) Seguimiento de la elongación y crecimiento en diámetro de las yemas

Se seleccionaron al azar tres ramas por planta (una por cada estrato) y se monitoreó la elongación y aumento en diámetro de las yemas terminal y primera lateral de cada una de ellas. Las mediciones se realizaron con calibre cada 15-20 días durante una parte del período vegetativo (enero-junio), en que las larvas jóvenes penetran en las yemas del año y son más susceptibles a los mecanismos de defensa de la planta. La frecuencia fue mensual hacia finales del período monitoreado. Estas yemas/brotes se marcaron con esmalte a los efectos de indicar el frente de medición y ubicar el calibre a partir de esta marca en las mediciones sucesivas. Durante el período indicado se siguió el crecimiento de 137 yemas de *P. radiata* y 109 de *P. ponderosa*. En algunos casos se marcaron nuevas yemas de reemplazo, principalmente en la primera especie, cuando las yemas a ser monitoreadas resultaron ahuecadas completamente desde el comienzo del estudio. Esta marcación no se efectuó cuando esto sucedió hacia fines del período.

Para cada yema-brote medido se calculó el incremento en longitud y diámetro entre fechas de muestreo y el incremento diario para el mismo período. Para el análisis estadístico de los datos se utilizaron los métodos no paramétricos pues estos datos no satisficieron el supuesto de normalidad. Se aplicó la prueba de Mann-Whitney para analizar el crecimiento de las yemas en ambos hospedantes y la de Wilcoxon para analizar el crecimiento de las yemas en *P. radiata* con diferente intensidad de ataque. En ambos casos se utilizó el programa estadístico SPSS 9.0.

b) Caracteres anatómicos de las yemas atacadas. Preparaciones microscópicas

Para las preparaciones microscópicas se procedió según la metodología indicada por D'Ambrogio de Argüeso (1986), la que fue adecuada al caso particular de las yemas por recomendación del especialista local en la materia.

Las yemas cortadas en el campo se fijaron en formol-ácido acético (FAA) y mediante un micrótopo se practicaron cortes transversales de 10 μm de espesor. Dichas yemas se sujetaron al micrótopo entre cubos de zanahoria ya que debido a su pequeño tamaño no fue posible hacerlo mediante la modalidad habitual. La similitud en la estructura de ambos tejidos vegetales permitió que la cuchilla del micrótopo penetrara y cortara ambos tejidos sin encontrar resistencia, de esta forma se obtuvieron cortes homogéneos y del grosor adecuado para las observaciones. Los cortes obtenidos de cada yema se dejaron en cápsulas de Petri con agua destilada hasta el momento de seleccionarlos y montarlos. Los cortes se practicaron siempre a la altura de la zona de la perforación producida por las larvas y, en algunos casos, se consideró necesario efectuarlos también por encima y por debajo de esta zona en función de los cambios observados en los tejidos afectados.

La deshidratación de los tejidos se realizó con alcohol al 70%. Para el montaje se utilizó la técnica de glicerina-agua destilada (D'Ambrogio de Argüeso 1986) modificada pues a esta solución se le agregó la solución colorante de safranina al 1%.

Se realizaron observaciones microscópicas de 15 yemas atacadas por cada especie forestal con el objeto de registrar y caracterizar la reacción de la planta en la zona del ataque producido por las larvas. A los efectos comparativos se otorgó especial interés al número de canales resiníferos presentes y a la superficie de la yema -en corte transversal- ocupada por los canales. En todos los casos se midió el diámetro en micrones, con un microscopio Zeiss, de todos los canales de resina presentes en el corte y se calculó la superficie de cada uno empleando la fórmula del círculo ($\pi r^2/4$) que se consideró la figura geométrica más apropiada. La superficie total por cada corte se obtuvo multiplicando la superficie promedio calculada previamente por el número total de canales presentes.

4.1.4 Relevamiento de parasitoides y monitoreo de los niveles de parasitismo

Este procedimiento se llevó a cabo sobre los estados de larva y pupa, debido a la dificultad señalada para detectar los huevos en el campo. El muestreo se realizó en la misma plantación donde se efectuó el seguimiento del ciclo biológico en relación con la temperatura. De esta forma se hizo un mejor aprovechamiento del material utilizándose los mismos brotes colectados para el estudio antes mencionado y sin tener que intervenir otra plantación de iguales características con este tipo de muestreo destructivo.

Cada una de las larvas extraídas de los brotes en cada fecha de muestreo fue disecada para determinar la presencia de parasitoides internos. Dichas larvas fueron clasificadas según su estado sanitario en vivas, muertas o parasitadas. Las larvas de los parasitoides se identificaron siguiendo la descripción de Juillet (1960), y los adultos de estas larvas se obtuvieron tanto en el laboratorio como en el campo a los efectos de confirmar y completar la determinación de los estados inmaduros.

Cien brotes atacados colectados al azar se mantuvieron en el laboratorio desde mediados- fines del período de presencia del estadio L5 hasta la emergencia de los adultos del parasitoide y/o hiperparasitoide, en los casos que fueron hallados. Los ejemplares adultos fueron identificados por la Prof. Dolly Lanfranco de la Universidad Austral de Chile y por la Dra. Marta Loiácono de la Universidad Nacional de La Plata.

Para el relevamiento de parasitoides de pupas se colectaron en forma aleatoria aproximadamente 400 brotes infestados durante cada una de las tres temporadas de muestreo. Las pupas se extrajeron de los brotes, se sexaron y se agruparon en lotes de diez colocándolas en cajas plásticas. Estas cajas se acondicionaron en campanas de vidrio con una solución saturada de ClNa para lograr el 80% de humedad necesaria para la supervivencia de las pupas y de esta forma se mantuvieron hasta la emergencia de los adultos.

El porcentaje de parasitismo se calculó sobre el total de organismos observados en cada estado de desarrollo y para cada temporada de muestreo.

4.2 Caracterización de la emergencia de adultos y de los estados inmaduros

4.2.1 Construcción de un modelo fenológico para predecir el vuelo estacional

El vuelo de los adultos se monitoreó durante cuatro temporadas consecutivas a partir de 1999. Los datos de la última de ellas (2002-2003) se utilizaron para validar el modelo previamente construido. Esta actividad se llevó a cabo mediante dos métodos diferentes: a) registro de las capturas de los machos en trampas de feromonas y b) conteo de exuvias, que se aplicó sólo durante la segunda temporada (2000-2001). Se consideraron tres alternativas para iniciar el cálculo de GD acumulados y así predecir el comienzo del vuelo: a) a partir de la primera captura en trampas, b) a partir de una fecha calendario arbitraria tal como se ha utilizado con otros modelos y c) a partir del primer registro del estado de pupa en terreno. Las alternativas b y c se contemplaron con el objeto de facilitar y economizar la implementación de las prácticas de monitoreo y control de la plaga. Las feromonas de *R. buoliana* son producidas por laboratorios especializados en otros países desde donde deben importarse elevando consecuentemente el costo de manejo de las plantaciones.

4.2.1.1 Método de las capturas en trampas

El estudio abarcó cuatro temporadas (Cuadro 4.1), durante las que se monitoreó el vuelo de machos adultos de la mariposa europea del brote del pino mediante su captura en trampas de feromonas. Se emplearon seis trampas delta con feromonas de tipo Biolure (EPSM Lures, Point International Ltd., Reino Unido) durante las dos primeras temporadas, y diez trampas durante las últimas temporadas. Las mismas se dispusieron en grupos conformando rectángulos de dos filas y tres hileras en los que las

trampas estaban distanciadas 25-30 m entre sí (Regan *et al.* 1991) para evitar interferencia entre ellas (Daterman 1974 *vide* Regan *et al.* 1991). Las trampas se suspendieron de los árboles a una altura aproximada de 1.5 m - 2 m (Foto 4.1), entre los treinta y quince días previos al comienzo del período de vuelo (desde mediados de noviembre a mediados de diciembre), estimado en base al seguimiento anual que se hizo del ciclo biológico. Estas trampas se controlaron dos veces por semana hasta el momento en que no se capturaron más adultos. Los cebos fueron reemplazados una vez durante cada período de muestreo.

Cuadro 4.1. Períodos, duración y número de muestreos por temporada.

| Temporada | Fecha | Duración | Nº muestreos |
|-----------|--------------------------|----------|--------------|
| 1 | 03/12/1999 – 10/01/2000 | 6 | 8 |
| 2 | 17/12/2000 – 12/02/2001 | 8 | 16 |
| 3 | 05/12/2001 – 24/01/2002 | 7 | 13 |
| 4 | 29/12/2002 – 21/02/ 2003 | 8 | 12 |



Foto 4.1. Trampa delta con feromonas en el área de estudio.

4.2.1.2 Método del conteo de exuvias

Con fines comparativos se construyó para la segunda temporada (2000-2001) la curva de emergencia de adultos de ambos sexos empleando el método del conteo de los estados de desarrollo presentes y de las exuvias de las pupas. Con la misma frecuencia que para la captura de machos, se recolectaron en cada situación de muestreo, en forma aleatoria, aproximadamente 100 ramas con brotes infestados (± 10 ramas) que se disecaron en el laboratorio para registrar el número de estados / estadios larvales y de exuvias en los brotes. Se recolectaron dos ramas con brotes por planta extrayéndolos de distintas partes de las mismas (estratos superior, medio e inferior y diferente exposición). Las larvas se disecaron en búsqueda de parasitoides, que se identificaron tanto por las larvas (Juillet 1960) como por los adultos

que se obtuvieron en laboratorio luego de haber sido mantenidos en cajas plásticas hasta su emergencia. Este muestreo se realizó hasta registrar solamente exuvias en los brotes examinados. El porcentaje de emergencia se calculó empleando la siguiente fórmula (Palma Prieto 1995) :

$$\frac{\text{Número de exuvias en } t}{\text{Número total de individuos (larvas, pupas y exuvias)}} \times 100$$

donde: t = día de muestreo.

Las larvas que en el denominador participan en la suma son sólo aquellas no parasitadas, puesto que las parasitadas no alcanzan el estado de pupa.

4.2.1.3 Registro de temperaturas

Los datos de temperaturas de la plantación **e** cercana a Esquel se registraron con un termohigrógrafo que, ante la eventualidad de que pudiera ser dañado, se instaló a 500 m de la misma en un lugar más seguro y con vigilancia. Este equipo registró la temperatura en forma continua desde su instalación el 01/12/1999 hasta el 25/02/2003. Semanalmente se leyeron las temperaturas asentadas en la banda con una precisión decimal de 0.3, 0.5 y 0.7.

En lo que respecta a los datos de temperatura de la plantación **g** ubicada en la EEA Trevelin del INTA se utilizaron los datos registrados por el termohigrógrafo del vivero forestal de la estación, los que son útiles pero deben utilizarse con reservas debido a la significativa distancia –15 km- del equipo respecto del área de estudio. Como estos datos no reflejaban la situación climática real de la plantación no resultó conveniente sostener este relevamiento durante las restantes temporadas. Por ende, estos datos no se incluyeron en la construcción del modelo.

Las temperaturas registradas se convirtieron en grados día empleando el método de Arnold (1960), uno de los más comúnmente usados (Higley *et al.* 1986) y el de Lindsey y Newman (1956). Este último método se aplicó cuando las temperaturas mínimas resultaron inferiores al umbral inferior de temperatura, debido a que el método de Arnold produce un mayor error.

La ecuación que emplea el método de Arnold es la siguiente:

$$DG = \frac{T_{\max} + T_{\min}}{2} - T_{\text{umbral}}$$

T máx. = Temperatura máxima diaria (°C)

T mín. = Temperatura mínima diaria (°C)

T umbral = Temperatura umbral inferior (°C), por debajo de la cuál no hay desarrollo del organismo.

Por su parte, la fórmula que emplea el método de Lindsey y Newman es la siguiente:

$$GD = \frac{1/2 (T_{\max} - T_{\text{umbral}})^2}{T_{\max} - T_{\min}}$$

Asimismo se calcularon las temperaturas medias mensuales en base a las máximas y mínimas diarias, para contar con más elementos de análisis al momento de comparar las temporadas entre sí.

La fecha en que se registró la primera captura en las trampas se tomó como momento de inicio para el cálculo de GD. La temperatura umbral inferior se estimó examinando el coeficiente de variación (CV) de las unidades de calor acumuladas por encima de un conjunto de temperaturas umbrales, aspecto que se detalla en la próxima sección. No se contempló un umbral superior pues en la región andino-patagónica las temperaturas raramente exceden los 35 °C.

Los GD acumulados que se asignaron a cada fecha de muestreo o control de trampas correspondieron siempre a la cantidad de calor acumulada hasta el día anterior a esta fecha, puesto que estos relevamientos se efectuaron siempre durante la mañana por lo que no correspondía adicionarle la temperatura acumulada en esa fecha.

Las capturas de machos de cada fecha de control de trampas fueron acumuladas y se calculó el porcentaje de capturas acumuladas en cada control respecto del total de capturas durante todo el período de muestreo. Se construyó un modelo de regresión con los datos de las tres temporadas, adoptándose la función que brindó el mejor ajuste respecto de la distribución de los valores muestrales de temperatura y grados día. El monitoreo correspondiente a la cuarta temporada 2002- 2003 se utilizó para probar y validar el modelo previamente elaborado.

4.2.1.4 Estimación de la temperatura umbral inferior

La temperatura umbral inferior se estimó en base a la variación en GD acumulados entre las cuatro temporadas de muestreo tomando como evento fenológico la primera captura de machos en las trampas y comparando con un rango de temperaturas umbral. Se calculó el CV de los GD acumulados por encima de umbrales estándares comprendidos entre -6.2 °C y 6.2°C, a intervalos regulares de 1.2°C. Se consideró temperatura umbral a aquella indicada por el menor coeficiente de variación, a pesar que este método no detecta un umbral definitivo (Arnold 1959, Lindsey y Newman 1956, Potter y Timmons 1983). El umbral estimado de esta forma no es estrictamente un umbral de desarrollo sino que más bien representa la integración de factores que conduce a la menor variación en el desarrollo entre años y respecto de un evento fenológico cuando se utilizan los GD como variable predictora (Arnold 1959). Este criterio ha sido utilizado exitosamente en el desarrollo de otros modelos predictivos de desarrollo para un amplio rango de insectos (Jones *et al.* 1989, Potter *et al.* 1989), entre ellos *Rhyacionia frustrana* (Comstock), una especie relacionada con la mariposa del brote (Richmond *et al.* 1983) e incluso para *R. buoliana* en el oeste de Oregon (Regan *et al.* 1991). Mediante este procedimiento también se estimó la temperatura umbral inferior para los diferentes estadios larvales y el estado de pupa tomándose como evento fenológico el primer registro del estadio/estado pertinente.

4.2.2 Metodología para el monitoreo de los estados de desarrollo inmaduros

Se estudió la relación entre la temperatura y la aparición, máxima presencia y finalización de cada uno de los estados de desarrollo del insecto, exceptuando el estado de huevo. Debido a su pequeño tamaño y su ubicación en la planta, los huevos resultan muy difíciles de detectar con lo que demoran significativamente el tiempo de muestreo especialmente al final del período de oviposición. Para

superar este inconveniente, se implementó un sistema de monitoreo especial para este estado de desarrollo. Se seleccionaron 27 árboles representativos de la plantación distribuidos en toda el área de la misma, en los que se ataron bolsas de malla de polietileno de poro pequeño de 50 cm x 60 cm. Cada bolsa conteniendo 10 brotes infestados con larvas o pupas envolvía una rama con brotes nuevos de la planta. Las bolsas se instalaron antes del comienzo del período de emergencia de los adultos y se fueron extrayendo de a tres con una periodicidad semanal registrando en el laboratorio el número de huevos por bolsa. De esta manera se intentó propiciar la cópula y oviposición en sitios preestablecidos que facilitarían la tarea de detección.

Se estimó también la temperatura acumulada necesaria para este estado en función del comienzo y la finalización del período de vuelo del insecto, considerando el tiempo aproximado de desarrollo de los huevos en base a la literatura (Robredo 1978). Cinco días después de la primera captura en trampas se inició la acumulación de GD, atendiendo a la protandria de la especie -las hembras emergen unos cinco días después que los machos- (Pointing 1961, Robredo 1970). Se consideró como momento de finalización la fecha de muestreo anterior al 100% de las capturas. Los GD se calcularon utilizando la misma temperatura umbral inferior estimada para el estado adulto, de 4.2 °C.

En el período comprendido entre 05/01/2000 y 03/02/2003, con la finalidad de monitorear las larvas y pupas, se colectaron 100 ramas con brotes infestados cada diez días aproximadamente durante la primavera, verano y comienzos de otoño. En el invierno la frecuencia fue mensual hasta el reinicio de la actividad larval. Este evento se estimó mediante la detección de los refugios nuevos formados en primavera y la presencia de contenido intestinal en las larvas disecadas.

Se cortaron al azar dos ramas por planta, cada una de las cuales pertenecía a un estrato -se consideró como estrato superior a aquel por encima de 1.5 m de altura medida desde el suelo y como estrato inferior al ubicado por debajo de esta cota- con diferente exposición. El tamaño muestral en cada fecha de muestreo fue de 50 plantas diferentes. Por cada fecha de muestreo se consideró una cantidad de base de 100 larvas y/o pupas para el procesamiento. En el laboratorio se extrajeron los organismos de los brotes para registrar los estados / estadios presentes y las exuvias de pupas. Las larvas se colocaron en alcohol al 70% para determinar su estadio de desarrollo en base al ancho de la cápsula cefálica. Para la asignación de los mismos, se emplearon las tablas de estadios larvales de Schroeder (1986 *vide* Palma Prieto 1995) y Klasmer (1999 *com. pers.*) que fueron modificadas y ajustadas a la situación local, especialmente en lo que respecta a los últimos estadios (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Tabla de estadios larvales (modificada).

| Estadio | Ancho de cápsula cefálica (mm) | Valores más frecuentes |
|---------|--------------------------------|---------------------------------|
| L1 | 0.225- 0.287 | 0.225- 0.237- 0.287 |
| L2 | 0.312- 0.412 | 0.312- 0.35- 0.375 |
| L3 | 0.425- 0.537 | 0.425- 0.437- 0.487- 0.525- 0.5 |
| L4 | 0.562- 0.687 | 0.55- 0.562- 0.625- 0.687 |
| L5 | 0.725- 0.875 | 0.875 |
| L6 | + 0.912 | 1.036 |

Para cada fecha de muestreo se calculó el porcentaje de presencia de cada uno de los estadios y estados de desarrollo colectados y se relacionaron con las temperaturas acumuladas, se construyeron las curvas pertinentes y también aquellas referidas a los restantes estadios registrados en cada fecha. Se estimó además el momento de inicio, máxima presencia y finalización de cada uno de tales estadios.

4.3 Estudio de la variación y estructura genéticas de *Rhyacionia buoliana*

4.3.1 Poblaciones monitoreadas y recolección de las muestras

a) Poblaciones argentinas

Para el análisis se emplearon larvas hibernantes (estadios 2-3) que fueron recolectadas de las plantaciones **b**, **e** y **f**

Durante el período invernal se recolectaron las muestras de diferentes árboles ubicados en lugares distantes dentro de la plantación -no se recolectaron brotes infestados de árboles que estuvieran distanciados entre sí menos de 4 metros - para disminuir, en lo posible, la probabilidad de obtener larvas del mismo progenitor. La mariposa del brote no presenta un comportamiento de oviposición en grupos, sino que pone dos huevos por puesta (Robredo 1978). Sin embargo, las larvas de los primeros estadios no se alejan demasiado y permanecen cerca del lugar de postura hasta que está más avanzada la estación primaveral.

Una ramilla por planta fue aleatoriamente cortada -en total 100 ramillas por cada plantación seleccionada-. En los casos en que se encontró más de una larva por ramilla se utilizó sólo una. Las ramillas se conservaron en heladera durante 2-7 días hasta que las larvas fueron extraídas de los brotes un día antes de emplearse y se conservaron en cápsulas Eppendorf dentro de frascos plásticos en heladera (4°C) hasta el momento de prepararlas. También se utilizaron larvas previamente congeladas (-18°C).

Estos ensayos se realizaron en la Unidad de Genética Forestal del INTA Bariloche que dispone de la infraestructura necesaria.

b) Población alemana

En este caso se utilizaron larvas de los estadios 5-6 y pupas, debido a que en el momento en que se realizó la visita al Instituto de Zoología Aplicada de Munich, donde se hicieron estos ensayos, el ciclo biológico se encontraba bastante avanzado. Los brotes fueron cortados siguiendo el mismo procedimiento previamente indicado para las poblaciones argentinas.

No fue posible monitorear un mayor número de poblaciones del insecto, tal como se hubiera deseado, debido a la dificultad de hallar plantaciones afectadas con esta plaga. En la región norte de Alemania, donde se encuentra la mayor superficie forestada con *Pinus* sp. no se registraron brotes epidémicos durante los últimos años, que permitieran recolectar material para este estudio; sino que, por el contrario, las poblaciones se encuentran en una fase de retrogresión (Majunke *com. pers.*). En el sur del

país la situación es más complicada desde este punto de vista, puesto que prácticamente se ha dejado de forestar con *Pinus* sp. y las plantaciones existentes tienen 20 años de edad o son aún mayores, por lo que la mariposa del brote ya no representa un problema. En los últimos años no se han reportado daños ocasionados por este insecto puesto que no se han forestado nuevas extensiones con *Pinus* sp. (Schrötter *com. pers.*). Se intentó obtener material en Austria pero ello tampoco resultó posible por las mismas razones (Axel Schopf *com. pers.*).

4.3.2 Análisis de isoenzimas

Para el estudio de la estructura genética se utilizaron isoenzimas en gel de electroforesis como marcadores genéticos dado su grado de sensibilidad y facilidad de análisis. A pesar de que a partir de mediados de la década del ochenta los marcadores moleculares del ADN han sido utilizados en proporción creciente, la electroforesis de isoenzimas en gel es una de las técnicas más adecuadas para establecer diferencias genéticas entre poblaciones, subespecies, especies y géneros estrechamente relacionados, ya que usualmente existe una relación uno a uno entre un fenotipo electroforético individual y su genotipo (Hillis y Moritz 1990). Asimismo, esta técnica, permite comparar frecuencias génicas entre poblaciones o especies en un gran número de loci y hacer una estimación conservadora de su diferenciación genética (Stock y Castrovillo 1981). No obstante, si las poblaciones han divergido recientemente o no están suficientemente aisladas, es posible que no se encuentren diferencias genéticas en sus productos proteicos y deba recurrirse a análisis mediante marcadores moleculares del ADN, técnica que es mucho más costosa.

Debido a que no existen antecedentes sobre este tipo de estudios en *R. buoliana*, se efectuaron ensayos preliminares con el objeto de seleccionar los sistemas enzimáticos y de buffer que dieran mejor resolución para ser luego analizados en las larvas. En esta dirección se probaron 23 sistemas enzimáticos diferentes en combinación con cinco sistemas de buffers distintos y bajo diversas condiciones de corrida (Cuadro 4.3). Estos ensayos se efectuaron en el Instituto de Zoología Aplicada de la Universidad Técnica de Munich. La selección inicial de los diferentes sistemas tanto enzimáticos como de buffer a ser probados no se efectuó en forma aleatoria sino que se basó en la trayectoria y experiencia que tiene el grupo de trabajo en este tipo de estudios con insectos.

Cuadro 4.3. Sistemas enzimáticos y de buffer probados durante los preensayos.

| Enzima | Abreviatura | Sistema Buffer |
|------------------------------------|-------------|--------------------------------|
| Aconitasa | ACON | LiOH; AC; TC 6.5 y 7.5; Poulik |
| alfa glicerofosfato deshidrogenasa | G3PDH | |
| Fosfoglucosa isomerasa | PGI | |
| Hexoquinasa | HK | |
| Aspartato aminotransferasa | AAT | |
| Leucina- amino peptidasa | LAP | |
| Transferian | TFN | |
| Xantin deshidrogenasa | XDH | |
| Esterasa | EST | |
| Fosfoglucomutasa | PGM | |
| 6- fosfogluconato deshidrogenasa | 6PGDH | |
| | GTDH | |
| Creatin quinasa | CK | |
| Lactato deshidrogenasa | LDH | |
| Malato deshidrogenasa | MDH | |
| Enzima málica | ME | |
| Glucosa 6- fosfato deshidrogenasa | G6PDH | |
| Isocitrato deshidrogenasa | IDH | |
| Aldolasa | ALD | |
| Fosfatasa ácida | ACP | |
| | GCDH | |
| Sorbitol deshidrogenasa | SDH | TC 6.5 y 7.5; Poulik |
| Adenilato quinasa | AK | |

4.3.2.1 Preparación de las muestras

Los extractos de proteínas se obtuvieron del cuerpo completo de las larvas y pupas. Cada larva hibernante fue homogenizada a -4°C con $80\mu\text{l}$ de Buffer de extracción Tris- EDTA, mientras que las larvas posthibernantes y pupas se homogenizaron en $100\mu\text{l}$ de buffer dado su mayor tamaño. Los extractos fueron absorbidos en wicks de papel cromatográfico Whatman de 0.5 mm de ancho y un alto similar al espesor del gel para absorber el homogenado y transferir las muestras al gel.

4.3.2.2 Transferencia de las muestras

Las muestras de las poblaciones argentinas se prepararon y transfirieron el mismo día de la electroforesis, mientras que las de la población alemana se prepararon y se almacenaron en *chilled plates* a -80°C hasta el momento de utilizarlas. Los geles se cortaron a lo largo para efectuar el corte de siembra a 1.5 cm de uno de sus márgenes -en general el correspondiente al cátodo fue desechado antes de la coloración-. Se colocaron entre 30- 40 muestras por cada gel.

4.3.2.3 Electroforesis

Los buffers de electrodo se utilizaron dos veces; luego de cada corrida se mezclaron los volúmenes correspondientes a la zona del cátodo y ánodo para emplearse en la siguiente. El amperaje constante fue de 200 mA, mientras que el voltaje fue variable según el amperaje indicado durante 4- 4.2 hs. Para el caso de las muestras de la población alemana el amperaje fue de 180 y el tiempo de corrida 4.5 hs.

4.3.2.4 Coloración del gel

De cada gel se obtuvieron tres capas, de modo que se pudieron monitorear seis enzimas por cada muestra. Para todas las coloraciones se pesaron todos los compuestos químicos y quince minutos antes de cortar el gel se agregó la solución buffer correspondiente a cada coloración agitando continuamente en agitador magnético. Los geles se incubaron posteriormente en estufa a 37 °C entre 40 minutos y una hora dependiendo del sistema enzimático. Los resultados del revelado se volcaron en hojas de registro específicamente diseñadas.

4.3.3 Estimación de la variación genética y análisis de la estructura genética poblacional

Las bandas se identificaron con letras mayúsculas y se numeraron de acuerdo a su movilidad decreciente. Los loci también se nombraron con letra mayúscula y se numeraron según el mismo criterio. De la misma manera se nombraron y simbolizaron los alelos en función de sus loci respectivos.

Todas las poblaciones muestreadas se analizaron por separado. Para el análisis de las poblaciones argentinas también se consideró la especie forestal hospedante reuniendo así las muestras que provenían de la misma especie.

El nivel de variación genética se estimó utilizando la proporción de loci polimórficos -en este caso particular y en función de los resultados obtenidos se consideraron aquellos loci con más de un alelo-, el número de alelos por locus y la heterocigosis esperada (H_e). Las frecuencias genotípicas observadas en los loci polimórficos se compararon con aquellas esperadas según el equilibrio de Hardy- Weinberg mediante el test de χ^2 .

La proporción de la variación genética no compartida entre demos es la base para su diferenciación. En este sentido, puede testarse si las muestras, que se asumen tomadas al azar, pertenecen a una misma población; es decir si las muestras a ser comparadas difieren una de la otra. Con este objeto se aplicó el el test- G (Sokal y Rolf 1997) para testear la homogeneidad de la distribución de los alelos entre las poblaciones argentinas relevadas.

La diferenciación genética entre las poblaciones argentinas se cuantificó mediante los parámetros estadísticos F_{is} (coeficiente de endogamia) y F_{st} por pares de plantaciones monitoreadas. Todos los estadísticos de F se estimaron según el método de Weir (1990) utilizando el programa PopGene. También se calcularon la identidad y las distancias genéticas de Nei entre estas poblaciones. Para todos los análisis efectuados se utilizó el programa PopGene (Yeh & Yang 1997).

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos centrales de la biología de *R. buoliana*

5.1.1 Eficiencia biológica de las larvas criadas en *P. radiata* y *P. ponderosa*

5.1.1.1 Modelo de regresión lineal basado en la relación volumen-peso seco de las yemas

Las funciones que estiman la biomasa en peso seco consumida por las larvas (Figuras 5.1a-b) adoptaron las expresiones:

$$y = 0.9214 x \text{ para } P. radiata$$

$$y = 0.9544 x \text{ para } P. ponderosa$$

Previamente, se efectuó una transformación logarítmica de las variables para obtener un ajuste adecuado de la recta, lo que se comprobó mediante el análisis de residuos. Este modelo funcionó para el análisis de los datos del ensayo 1 con larvas posthibernantes, puesto que no se obtuvieron resultados satisfactorios con el ensayo 2 en que la mayor parte de los valores en mg calculados por el modelo resultaron negativos. Los ensayos 1 y 2 se realizaron con una diferencia de un mes en dos temporadas sucesivas. Esta diferencia obedeció a que en la segunda temporada el período de dormancia larval se prolongó —en relación a lo que se observa habitualmente— a causa de las bajas temperaturas; no obstante los brotes iniciaron su elongación habitual dependiente del fotoperíodo. Es por ello que la infestación artificial se practicó esencialmente sobre brotes y no en yemas, y en un estado fenológico diferente del de los brotes utilizados en la construcción del modelo.

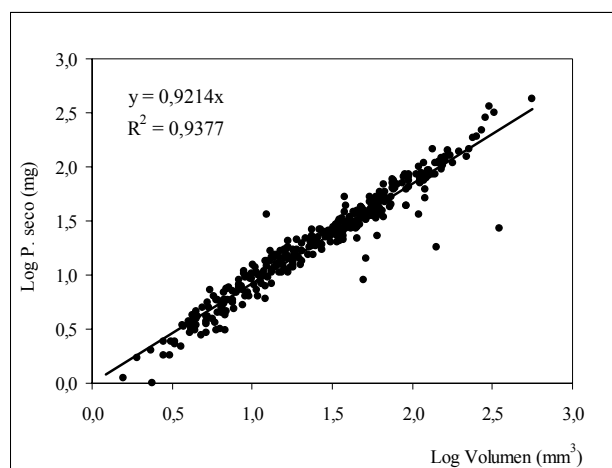


Figura 5.1a. Relación entre el volumen y peso seco de las yemas en *P. radiata*.

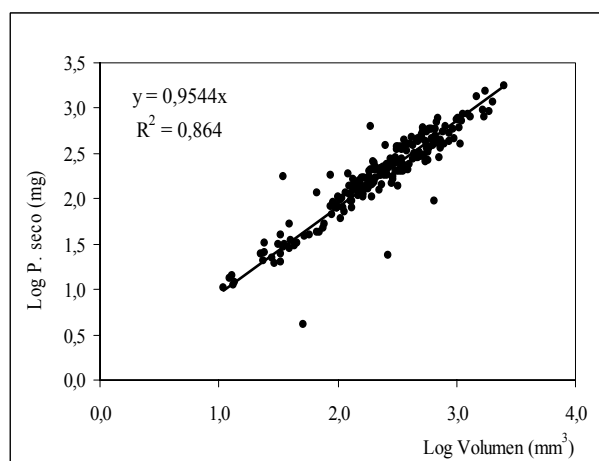


Figura 5.1b. Relación entre el volumen y peso seco de las yemas en *P. ponderosa*.

5.1.1.2 Eficiencia biológica de las larvas transferidas a un nuevo hospedante

Los tres ensayos llevados a cabo -uno con larvas prehibernantes más pequeñas y dos con larvas posthibernantes, de más fácil manipulación- debieron reiterarse debido a que parte de las larvas implantadas no se recuperaron, lo que dificultó el cálculo y análisis posterior de los índices de eficiencia. Además, dado que los ensayos difirieron en la época de realización y se efectuaron bajo distintas condiciones los datos no han podido ser analizados de manera conjunta.

En este capítulo se analizan las principales características de las yemas que fueron consumidas por las larvas en el transcurso de los ensayos en lo referente a su tamaño, volumen y tejido consumido. Con el objeto de dar el mismo tratamiento a los tres ensayos, este último parámetro mencionado se estimó mediante el procedimiento a) detallado en el desarrollo metodológico, que se basa en el empleo de categorías fijas de porcentajes. En segunda instancia se ha efectuado el análisis comparado de los distintos índices nutricionales para evaluar el rendimiento de las larvas en cada especie de hospedante y en cada ensayo realizado. Por último se consideraron los parámetros evaluados para la especie *R. buoliana* independientemente del hospedante asociado.

5.1.1.2.1 Infestación artificial en laboratorio

El peso seco de 1 mm³ de tejido de las yemas -calculado a partir del modelo- fue similar en ambas especies (0.92 mg/mm³ y 0.95 mg/mm³ para *P. radiata* y *P. ponderosa*, respectivamente) y se tomó como valor de referencia para el cálculo de los distintos índices. Las larvas no rechazaron la especie de pino en la que se las implantó a pesar de provenir de otra especie forestal y se desarrollaron con diferentes rendimientos. Si bien el único parámetro corporal registrado al comienzo de los ensayos en el laboratorio y en el campo fue el peso fresco, mientras que los restantes - estadío larval y longitud- se registraron una vez concluidos éstos, se observó que en promedio las medidas corporales finales eran superiores en las larvas criadas sobre *P. ponderosa*, provinieran o no de esta especie hospedante.

a) Larvas prehibernantes

Las yemas consumidas de la especie *P. ponderosa* superaron ampliamente en tamaño a las de *P. radiata* (2.5, 1.8 y 9 veces en longitud, diámetro y volumen, respectivamente). De la misma manera, la cantidad de tejido de la yema que fue consumido por las larvas implantadas en *P. ponderosa*, expresado tanto en peso seco como en volumen resultó superior (Cuadro 5.1). El test U de Mann-Whitney arrojó diferencias significativas para la cantidad de tejido consumido en ambas especies de pino - $U_{(53,23)}=284$, $P=0.0001$, prueba de dos colas-. Sin embargo, en función de la importancia y magnitud de los daños, es conveniente relacionar estas cantidades con el tamaño de las yemas en cada especie, para interpretar más cabalmente el impacto que tiene sobre las mismas la cantidad de tejido consumido. Trasladando estas relaciones numéricas a valores porcentuales resultó que, en promedio, la cantidad de tejido consumido por las larvas en *P. ponderosa* representó 25% de la yema y 86% en *P. radiata* (Cuadro 5.1). Es menester señalar que se necesita información más precisa para analizar cómo influye ello en la capacidad de recuperación -o no- de las yemas afectadas, si por ejemplo, el tejido comprometido es el meristema en su totalidad. Aún así, la estimación del porcentaje de daño para la especie *P. radiata* es considerablemente mayor y compromete la casi totalidad de la yema por lo que, en función del tamaño, estas yemas tienen tan limitada la capacidad de recuperación que seguramente morirán.

Cuadro 5.1. Valores promedio del tamaño y consumo de yemas en ambas especies.

| Parámetros de las yemas | Especie forestal | |
|---|------------------|------------|
| | Pp (n= 23) | Pr (n= 53) |
| Longitud (cm) | 1.47 | 0.59 |
| Diámetro (cm) | 0.36 | 0.20 |
| Long./diám. (cm) | 4.20 | 3.04 |
| Volumen mm ³ | 69 | 7.4 |
| Mg consumidos | 16.56 | 5.87 |
| Mm ³ consumidos | 17.43 | 6.38 |
| % yema consumida en relación al volumen | 25 | 86 |

Referencias: Pp: pino ponderosa; Pr: pino radiata

En 43% de los plantines de *P. ponderosa* el ataque no fue exitoso, es decir, las larvas no lograron penetrar en las yemas. En cambio, sólo en 22% de los plantines de *P. radiata* no fueron penetradas las yemas. En general y para este ensayo en particular se rescató sólo una larva por planta de las dos que fueron inicialmente implantadas, aunque estos porcentajes variaron en ambos hospedantes. De las 17 plantas de *P. ponderosa* que resultaron exitosamente atacadas, 15 tenían una sola larva horadando las yemas, mientras que 2 plantas tenían las dos larvas que habían sido implantadas. De las 25 plantas de *P. radiata* que fueron efectivamente atacadas, 18 tenían una sola larva, 6 dos larvas y 1 planta tres larvas. En las restantes plantas en las que no se encontraron larvas, se observó que las yemas estaban igualmente consumidas entre 50% y 100% al finalizar el ensayo.

No se observaron diferencias –en términos de mortalidad y supervivencia- en la eficiencia de las larvas criadas en distintos hospedantes. No se encontraron larvas muertas y el porcentaje de supervivencia resultó similar en ambas especies de hospedantes (Cuadro 5.2). Si bien el porcentaje de parasitismo en las larvas sobre *P. ponderosa* duplicó el correspondiente a las larvas sobre *P. radiata*, esta relación no se vio reflejada en los parámetros nutricionales respectivos (Cuadro 5.2). En este sentido, Scriber y Slansky (1981) han observado que la presencia de parasitoides influye en el tiempo de desarrollo, el crecimiento individual y otras medidas de rendimiento o eficiencia.

El test de Mann-Whitney no arrojó diferencias significativas para los distintos índices nutricionales de las larvas criadas sobre ambos hospedantes -IC: $U_{(32,20)}=234$, $P=0.106$; TRCP: $U_{(33,19)}=256.5$ $P=0.278$; ECI: $U_{(30,19)}=205.5$ $P=0.103$ y TCs $U_{(30,20)}=236.5$ $P=0.208$ -.

Cuadro 5.2. Resumen de los valores promedio de los parámetros nutricionales y de crecimiento en larvas pre y posthibernantes.

| Índices nutricionales y medidas corporales | Larvas prehibernantes | | Larvas posthibernantes | | | |
|--|-----------------------|------|------------------------|-------|----------|-------|
| | | | Ensayo 1 | | Ensayo 2 | |
| | Pp | Pr | Pp | Pr | Pp | Pr |
| Peso final | 2 | 1.82 | 7.21 | 3.85 | 15.28 | 12.29 |
| Peso promedio | 1.35 | 1.21 | 4.63 | 2.76 | 12.73 | 10.97 |
| Crecimiento Individual | 1.37 | 1.22 | 5.42 | 2.42 | 7.84 | 6.87 |
| IC | 12.64 | 7.73 | 14.21 | 11.46 | 9.66 | 6.58 |
| TRCP | 0.02 | 0.02 | 0.06 | 0.04 | 0.03 | 0.03 |
| TRCP/Peso promedio | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.003 | 0.003 |
| ECI | 0.11 | 0.19 | 0.11 | 0.09 | 0.08 | 0.09 |
| TCs | 0.4 | 0.2 | 3.23 | 1.48 | 7.25 | 3.97 |
| TCsR | 0.26 | 0.17 | 0.71 | 0.57 | 0.57 | 0.39 |
| Supervivencia (%) | 42 | 46 | 31 | 16 | 84 | 39 |
| Mortalidad (%) | 0 | 0 | 17 | 27 | 1 | 10 |
| Parasitismo (%) | 30 | 15 | 43 | 57 | 60 | 57 |
| ICp | 0.98 | 0.81 | 3.33 | 2.07 | 5.26 | 4.17 |
| Ancho cápsula cefálica | 0.52 | 0.49 | 0.80 | 0.68 | 0.99 | 0.95 |
| Largo de larva | 4.42 | 4.21 | 6.61 | 5.3 | 6.51 | 5.67 |

Observación: Las medidas corporales son orientativas ya que al haberse registrado sólo al final de los ensayos no pueden relacionarse con los índices nutricionales. Referencias: Pp: pino ponderosa; Pr: pino radiata

b) Larvas posthibernantes

b₁) Ensayo 1

El tamaño de las yemas de *P. ponderosa* superó prácticamente en la misma magnitud que en el caso anterior al de las de *P. radiata*. La cantidad de tejido consumido por las larvas tuvo un descenso notable con respecto al ensayo anterior, pues en *P. ponderosa* representó 5% de la yema y 16% en *P. radiata* (Cuadro 5.3). No obstante, las diferencias en la cantidad de tejido de la yema consumida fueron significativamente superiores en *P. ponderosa* ($U_{(70,49)}=823$, $P=0.0001$, prueba de dos colas). El impacto sobre la yema continuó siendo superior en *P. radiata* adquiriendo más relevancia en relación con la factibilidad de recuperación la ubicación y distribución del daño. De hecho se observó tanto en terreno como en laboratorio que una proporción elevada de las yemas de *P. radiata* ya han sido ahuecadas en su totalidad cuando comienza la temporada invernal, las larvas entraron en estado de dormancia y las yemas detuvieron su crecimiento.

Cuando se compararon los promedios de los resultados obtenidos mediante los dos procedimientos de estimación se observaron diferencias muy marcadas entre ellos. Analizando la cantidad de tejido consumido en términos de peso seco y en base al modelo construido, los valores se modificaron notablemente con respecto a la estimación basada en el volumen, puesto que en *P. ponderosa* el valor estimado fue de 200.31 mg y en *P. radiata* de 26.85 mg. Sin duda este modelo sobreestima la biomasa de las yemas/brotos puesto que incluye las acículas en la medición del peso seco, mientras que las mismas

no fueron involucradas en la medición de los diámetros pertinentes. La cantidad y desarrollo de las acículas presentes interfiere con la utilidad del modelo en este caso particular. Por ello es razonable señalar que el modelo debería ser mejorado abarcando el rango fenológico posible de los brotes o bien considerar la preparación de modelos distintos para yemas y brotes.

Cuadro 5.3. Valores promedio del tamaño y consumo de yemas en ambas especies.

| Parámetros de las yemas | Especie forestal | |
|--|------------------|------------|
| | Pp (n= 60) | Pr (n= 70) |
| Longitud (cm) | 7.26 | 1.91 |
| Diámetro (cm) | 0.62 | 0.39 |
| Long./diámetro (cm) | 11.57 | 4.85 |
| Volumen mm ³ | 855.35 | 90.25 |
| Mg consumidos | 40.34 | 13.57 |
| Mm ³ consumidos | 42.27 | 14.75 |
| % yema consumidos en relación al volumen | 5 | 16 |

Referencias: Pp: pino ponderosa; Pr: pino radiata

El menor diámetro del brote de pino radiata favoreció que las larvas lo abarcasen totalmente, impidiendo con más frecuencia la recuperación en relación con el pino ponderosa, el que al ser más grueso y tener menor cantidad de tejido afectado tenía más posibilidades de recuperarse a partir de la porción de tejido no consumido.

Las larvas criadas sobre *P. ponderosa* mostraron una mayor eficiencia que aquellas criadas sobre *P. radiata*. Sobre esta última especie las larvas experimentaron una mayor mortalidad -10% superior- mientras que la supervivencia resultó 15.5% inferior que en *P. ponderosa* (Cuadro 5.2).

En lo que respecta a los índices nutricionales se observó que las larvas criadas sobre *P. ponderosa* crecieron más rápidamente que las criadas sobre *P. radiata* pero con un bajo nivel de significación (TRCP: $U_{(23,11)}=75$, $P=0.058$, prueba de dos colas) siendo además mayor la ingestión diaria de alimento (ICs: $U_{(24,12)}=74$, $P=0.019$, prueba de dos colas). Esta mayor TRCP podría estar relacionada con el menor porcentaje de parasitismo registrado sobre estas larvas (Cuadro 5.2) aunque no se detectaron diferencias significativas en el IC entre las larvas criadas sobre ambos hospedantes ($U_{(24,12)}=112$, $P=0.283$). En general, una mayor tasa de consumo se relaciona con bajas eficiencias en la conversión del alimento ingerido, sin embargo no se detectaron diferencias en éste último parámetro entre larvas criadas en ambos hospedantes (ECI: $U_{(23,11)}=113.5$ $P=0.619$). Scriber y Slansky (1981) señalan que la presencia de aleloquímicos en el alimento hace que algunas especies mantengan altas tasas relativas de crecimiento promedio debido a sus altas tasas de consumo. En este caso, las elevadas tasas de consumo observadas podrían también estar asociadas a la presencia de aleloquímicos en el alimento.

No se observó ataque en 22% de las yemas de plantines de *P. ponderosa* y en 20% de aquellas de *P. radiata*. De manera similar al ensayo anterior, el prendimiento fue en general de una sola larva por planta. En una sola planta de *P. radiata* se encontraron dos larvas vivas. Nuevamente se cumplió que las larvas no rechazan la especie de pino en la que se las implanta a pesar de provenir de otra especie forestal.

b.) Ensayo 2

De la misma manera que en los ensayos precedentes, la mayor parte de los valores promedio de los parámetros de las yemas resultaron superiores para la especie *P. ponderosa*. La diferencia en la cantidad de tejido de la yema consumida es significativamente superior en *P. ponderosa* ($U_{(79,74)}=2020.5$, $P=0.001$, prueba de dos colas). La longitud de los brotes de *P. radiata* superó 1.3 veces la de los brotes de *P. ponderosa*, lo que aparentemente influyó en el porcentaje de la yema que representa la cantidad de tejido consumido, que resultó ligeramente superior en *P. ponderosa* en contraposición con los dos ensayos previos (Cuadro 5.4).

Cuadro 5.4. Valores promedio del tamaño y consumo de yemas en ambas especies.

| Parámetros de las yemas | Especie forestal | |
|---|------------------|------------|
| | Pp (n= 79) | Pr (n= 74) |
| Longitud (cm) | 4.46 | 6.02 |
| Diámetro (cm) | 0.45 | 0.29 |
| Long./diám. (cm) | 10.02 | 21.36 |
| Volumen mm ³ | 253.07 | 154.96 |
| Mg consumidos | 75.10 | 40.17 |
| Mm ³ consumidos | 79.05 | 43.66 |
| % yema consumida en relación al volumen | 31 | 28 |

Referencias: Pp: pino ponderosa; Pr: pino radiata

En los tres ensayos efectuados la cantidad de tejido consumido en las yemas resultó siempre superior en la especie *P. ponderosa* ($P=0.0001$, $P=0.0001$ y $P=0.001$ respectivamente). Sin embargo, el mayor volumen de las mismas influye en el impacto del daño -en términos de porcentaje de yema comprometida- que es inferior en esta especie. Ello se manifiesta en el ensayo 2 con la disminución en la magnitud de la diferencia en volumen registrada entre ambas especies.

De la misma manera que en el ensayo anterior las larvas criadas sobre *P. ponderosa* mostraron una eficiencia superior que aquellas criadas sobre *P. radiata*. La mortalidad resultó 9% superior en estas larvas y la supervivencia resultó 45% inferior que en *P. ponderosa* (Cuadro 5.2). A pesar que no se detectaron diferencias categóricas en los diferentes índices de rendimiento esta coincidencia permite considerar la posibilidad de que la especie hospedante esté condicionando de alguna manera la eficiencia de las larvas, al menos en lo que respecta a los parámetros mortalidad y supervivencia en estos ensayos particulares.

Las diferencias resultaron significativas para IC ($U_{(44,26)}=411$, $P=0.050$, prueba de dos colas) y TCs ($U_{(44,26)}=362$, $P=0.011$, prueba de dos colas); en cambio no fue así para los restantes parámetros nutricionales (TRCP: $U_{(32,17)}=272$, $P=1$ y ECI: $U_{(32,18)}=257$, $P=0.530$ ambos también para prueba de dos colas).

El ataque no fue exitoso en 9% de los plantines de *P. ponderosa* mientras que en todas las plantas de *P. radiata* las yemas que fueron implantadas artificialmente con las larvas resultaron horadadas.

5.1.1.2.2 Análisis de los índices nutricionales y sus relaciones

En los ensayos con larvas posthibernantes se obtuvieron en algunos casos valores negativos de crecimiento individual y por lo tanto también resultaron negativas las TRCP y ECI respectivos -en el ensayo 1 se obtuvo un sólo valor negativo en ambas especies de hospedantes mientras que en el ensayo 2 se obtuvieron 11 y 12 valores negativos para *P. radiata* y *P. ponderosa* respectivamente. Esta circunstancia, que posiblemente esté relacionada con errores en el procedimiento de estimación de la cantidad de tejido consumida, hizo que estos valores no fueran incluidos en los análisis efectuados.

En los tres bioensayos se obtuvieron valores promedio bajos de la tasa relativa de crecimiento promedio que osciló entre 0.003 y 0.02 mg/mg/día, mientras que los valores de ECI se mantuvieron entre 8-19% quedando incluidos dentro del rango establecido para otras especies -5-70%- (Scriber y Slansky 1981) (Cuadro 5.2). No obstante, estos valores de ECI quedan comprendidos entre los más bajos dentro de los límites de eficiencias y por lo tanto se condicen también con las bajas tasas relativas de consumo obtenidas en todos los casos -0.17 - 0.71 mg/mg/día- (Cuadro 5.2). Por otra parte, los bajos porcentajes de eficiencia obtenidos en relación con el IC indican que las larvas crecen menos que la cantidad de alimento que ingieren, lo cuál podría relacionarse con la presencia de compuestos aleloquímicos en la resina tales como los fenoles que retardan el desarrollo y disminuyen la producción de biomasa corporal.

La utilización del alimento luego de la ingesta y la eficiencia biológica en los artrópodos inmaduros están influenciados por factores ambientales bióticos y abióticos y por características propias de los individuos. En este sentido el tamaño del cuerpo es una de las características inherentes a los organismos. Los ensayos realizados mostraron -tal como se ha comprobado para diferentes especies- una tendencia creciente de los valores de tasas de crecimiento con el incremento en el peso fresco final de las larvas hasta alcanzar un valor constante que a partir de determinado peso empieza a descender (Figuras 5.2a-b-c). Esta relación se aprecia más claramente en las larvas prehibernantes, donde es mayor para las larvas criadas sobre *P. radiata* cuya curva se ubica por encima de la correspondiente a la otra especie hospedante (Figura 5.2a). Posiblemente el empleo del peso fresco inicial calculado como el promedio del conjunto de larvas implantadas influya en la alineación de cada uno de los puntos de la curva. En los ensayos 1 y 2 esta relación no se aprecia tan claramente como en el ensayo anterior, al tiempo que resulta llamativo el descenso tan marcado en las TRCP con los valores extremos de peso fresco final (Figuras 5.2.b y 5.2.c).

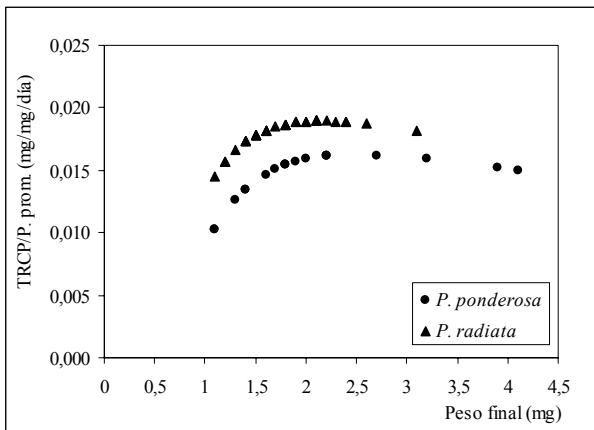


Figura 5.2a. Relación entre TRCP/Peso promedio y peso final en larvas prehibernantes.

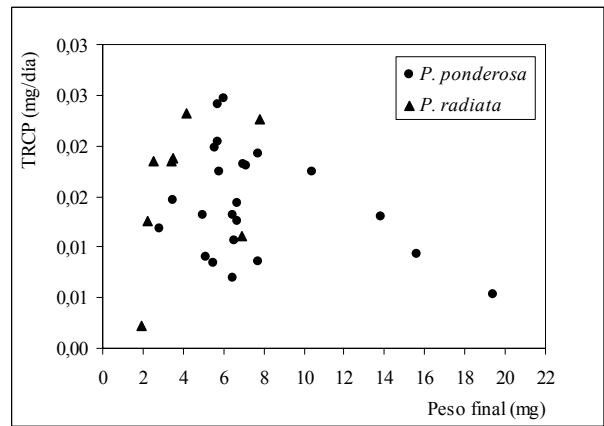


Figura 5.2b. Relación entre TRCP y peso final: Ensayo 1.

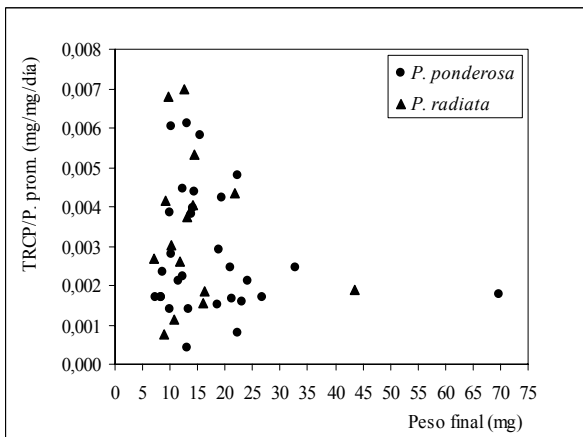


Figura 5.2c: Relación entre TRCP/Peso promedio y peso final: Ensayo 2.

No se observó relación entre el índice de consumo y el peso final de las larvas criadas en ambas especies de pinos.

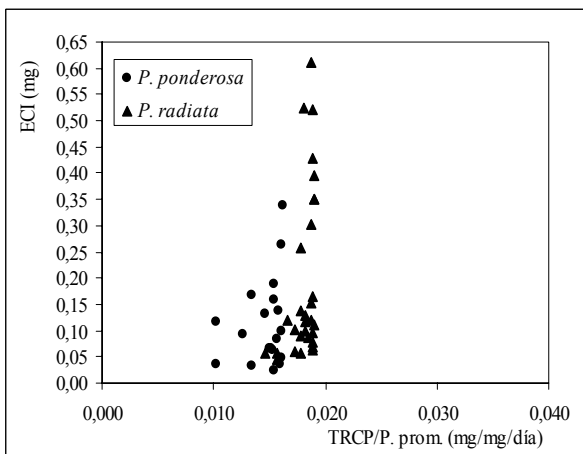


Figura 5.3. Relación entre ECI y TRCP/Peso promedio en larvas prehibernantes.

En el ensayo con larvas prehibernantes se observó respecto de la relación entre TRCP/Peso promedio y ECI una tendencia ascendente en ambos índices para algunos pares de valores -se incrementa la TRCP a medida que aumenta la eficiencia de las larvas en la utilización del alimento ingerido-. Sin embargo no es posible explicar los valores similares de TRCP/Peso promedio para valores crecientes de ECI (Figura 5.3).

Tal como se ha comprobado para otros artrópodos, se observa que el incremento en el consumo se relaciona con una reducción en la eficiencia de las larvas criadas sobre ambos hospedantes (Figuras 5.4a-b-c). Generalmente cuando esto sucede, se registra también una extensión del período larval y una disminución del peso por debajo del normal (Scriber y Slansky 1981).

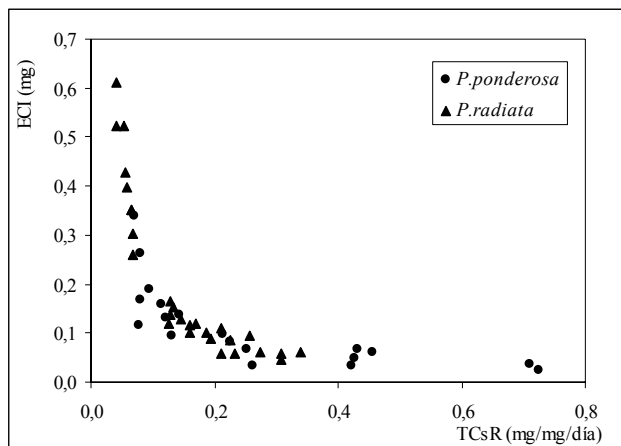


Figura 5.4a. Relación entre ECI y TCsR en larvas prehibernantes.

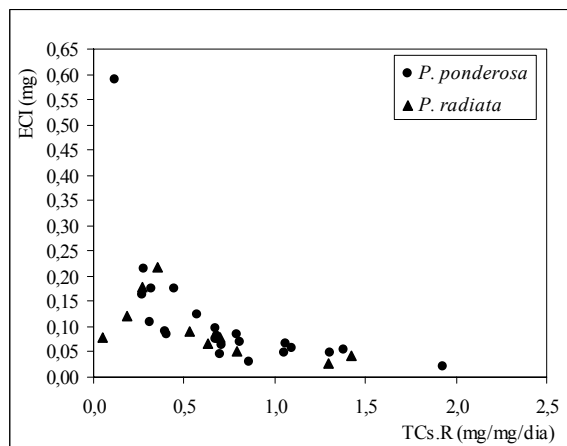


Figura 5.4b. Relación entre ECI y TCsR: Ensayo 1.

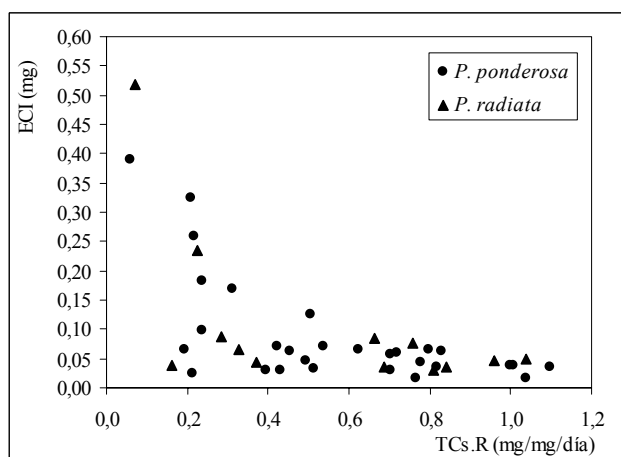


Figura 5.4c. Relación entre ECI y TCsR: Ensayo 2.

Las comparaciones en el rendimiento entre los estados de desarrollo más jóvenes y los más maduros arrojan generalmente diferencias en el comportamiento de los diferentes índices nutricionales. Si bien por razones técnicas en estos ensayos no se experimentó con las mismas larvas hasta completar su desarrollo, tales ensayos podrían considerarse como tres instancias en el proceso gradual de desarrollo larval y establecer una analogía entre los primeros (larvas prehibernantes) y últimos estadios larvales (larvas posthibernantes –ensayo 2-) del insecto. En este sentido se observa en todos los casos un incremento del crecimiento individual de las larvas o ganancia en peso, aumento que es más notorio cuando se comparan larvas pre y posthibernantes que sólo entre las posthibernantes (Ensayos 1 y 2). Las tasas relativas de crecimiento y consumo disminuyen en concordancia con lo que sucede con las diferentes especies de insectos, mientras que las eficiencias en la conversión del alimento descienden levemente (Cuadro 5.2). Este último parámetro puede comportarse de diferentes formas según la especie que se trate.

5.1.1.3 Eficiencia biológica de las larvas criadas en sus hospedantes de origen

5.1.1.3.1 Infestación artificial en el campo

a) Larvas prehibernantes

Sólo la mitad – aproximadamente- de las larvas implantadas en los brotes de la plantación pudieron recuperarse, totalizando 14 ramillas con brotes infestados por las larvas para *P. ponderosa* y 17 ramillas para *P. radiata*. Entre otros motivos, tal circunstancia puede deberse a que la plantación posee libre acceso, por lo que resulta plausible que las ramas infestadas artificialmente hayan sido manipuladas por personas ajenas a la forestación. En este sentido, sólo se estudiaron los brotes en los que se recuperaron las larvas previamente implantadas y no se consideraron en el análisis aquellos en que hubo o no perforación de las yemas y las larvas se perdieron.

Dadas las diferencias en el tamaño de las yemas de ambas especies forestales el volumen de tejido disponible para consumo también es significativamente distinto por lo que el impacto del daño observado no es el mismo en las dos especies. La longitud y diámetro de las yemas de *P. ponderosa* representan el doble de las de *P. radiata* y en este sentido el volumen se cuadruplica (Cuadro 5.5). La cantidad de tejido de la yema que fue consumido por las larvas implantadas en *P. ponderosa* resultó superior (Cuadro 5.5). El test U de Mann-Whitney arrojó diferencias significativas para la cantidad de tejido consumido en ambas especies de pino ($U_{(17,14)}=33$, $P=0.001$, prueba de dos colas). Sin embargo esta cantidad superior de tejido consumido por las larvas en *P. ponderosa* representa, en promedio, el 28% del tamaño de las yemas de esta especie mientras que en *P. radiata* representa el 42% de las mismas (Cuadro 5.5).

Cuadro 5.5. Valores promedio del tamaño y consumo de yemas en ambas especies.

| Parámetros de las yemas | Especie forestal | |
|---|------------------|-----------|
| | Pp (n=14) | Pr(n=17) |
| Longitud (cm) | 1.86 | 1 |
| Diámetro (cm) | 0.53 | 0.20 |
| Long./diámetro (cm) | 3.48 | 3.09 |
| Volumen mm ³ | 164 | 38 |
| Mg consumidos | 43.5 | 15 |
| Mm ³ consumidos | 46 | 16 |
| % yema consumida en relación al volumen | 28 | 42 |

Referencias: Pp: pino ponderosa; Pr: pino radiata

La mortalidad y parasitismo de las larvas implantadas y recuperadas de los brotes resultó ser igual en ambos hospedantes –ninguna larva estuvo parasitada y sólo se encontró una larva muerta en los brotes recolectados en cada especie-. Por el motivo explicitado anteriormente no se analizó la supervivencia en términos de larvas vivas recuperadas una vez concluido el experimento.

En lo que respecta a la eficiencia de las larvas se observó a través del análisis de los índices nutricionales que las larvas criadas sobre *P. ponderosa* consumen mayor cantidad de alimento por mg de peso del cuerpo (IC: $U_{(17,14)}=35$, $P=0.001$, prueba de dos colas) resultando superior la tasa de consumo (ICs $U_{(17,14)}=34$, $P=0.001$; TCsR $U_{(17,14)}=34$, $P=0.001$) e inferior el aumento en mg de peso por mg de

alimento consumido (ECI: $U_{(17,14)}=44.5$, $P=0.003$, prueba de dos colas). De esta forma estas larvas mantienen la misma tasa de crecimiento que sus pares criadas sobre *P. radiata* (TRCP: $U_{(17,14)}=102$, $P=0.434$; crecimiento individual: $U_{(17,14)}=72$, $P=0.061$, prueba de dos colas) (Cuadro 5.6). Por otra parte los bajos porcentajes de eficiencia obtenidos en relación con el IC indican que las larvas crecen menos que la cantidad de alimento que ingieren, lo cuál podría relacionarse con la presencia de compuestos aleloquímicos en la resina tal como se mencionó anteriormente.

Al igual que en el ensayo con larvas prehibernantes, se observó la misma relación de tendencia creciente entre valores de TRCP/P promedio y el incremento en el peso fresco final de las larvas, hasta alcanzar valores constantes de esta tasa (Figura 5.5). Sin embargo, en este caso los valores se alinean en una sola curva y no se diferencian entre las larvas criadas sobre los diferentes hospedantes.

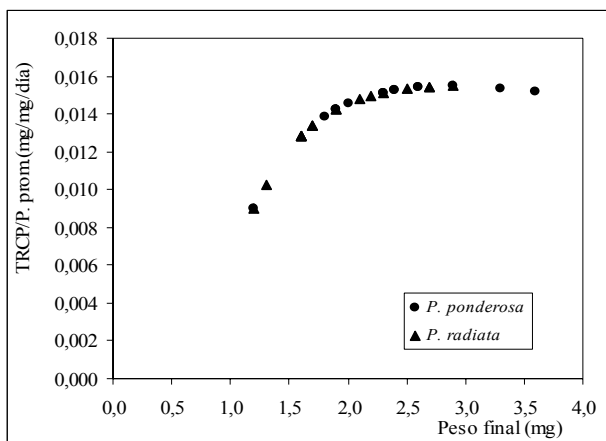


Figura 5.5. Relación entre TRCP/Peso promedio y peso final.

Tampoco se observó relación entre el índice de consumo y el peso final de las larvas criadas en ambas especies. Asimismo, la relación entre TRCP y ECI resultó similar a la observada en el ensayo con larvas prehibernantes. La tendencia ascendente en la relación entre ambos índices es más notoria en las larvas procedentes de *P. radiata*, al tiempo que los pares de valores se sitúan por encima de los correspondientes a la procedencia *P. ponderosa*. De la misma manera resultan llamativos los valores extremos de la relación baja eficiencia y elevada TRCP (Figura 5.6).

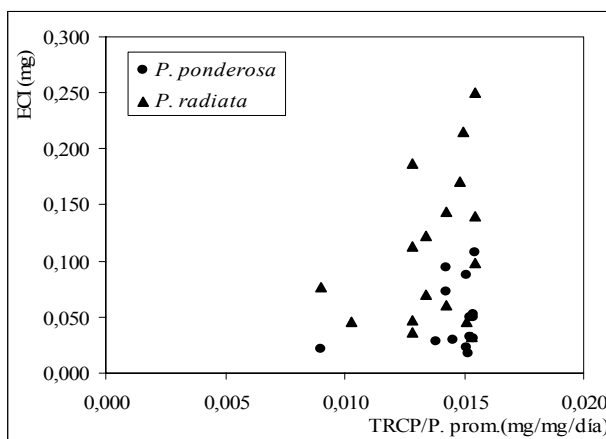


Figura 5.6. Relación entre ECI y TRCP/Peso promedio.

Del mismo modo se mantiene la relación ya observada entre el incremento en el consumo y una reducción en las eficiencias (Figura 5.7).

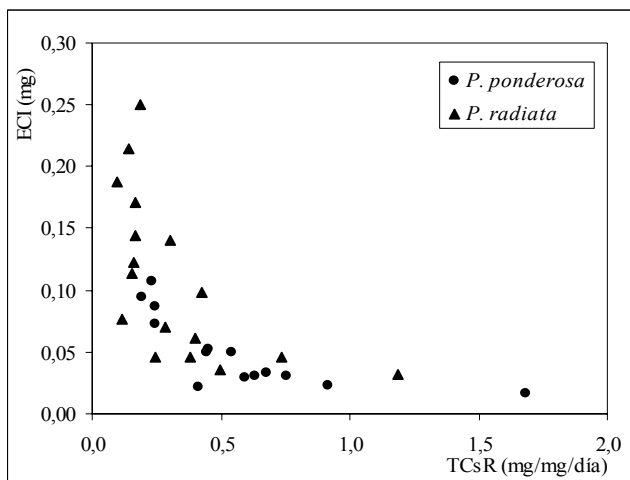


Figura 5.7. Relación entre ECI y TCsR.

Para visualizar de manera conjunta estos resultados, se presentan (Cuadro 5.6) los diferentes índices nutricionales y medidas corporales de las larvas involucradas en los experimentos.

Cuadro 5.6. Resumen de los valores promedio de los parámetros nutricionales y de crecimiento en larvas pre y posthibernantes.

| Índices nutricionales y medidas corporales | Larvas prehibernantes | | Larvas posthibernantes | |
|--|-----------------------|-----------|------------------------|-----------|
| | Pp (n=14) | Pr (n=17) | Pp (n=21) | Pr (n=17) |
| Peso final | 2.37 | 1.97 | 5.70 | 5,06 |
| Peso promedio | 1.59 | 1.39 | 4.03 | 3.51 |
| Crecimiento individual | 1.57 | 1.17 | 3.33 | 3.09 |
| IC | 25.80 | 10.57 | 12.95 | 10.93 |
| TRCP | 0.02 | 0.02 | 0.06 | 0.06 |
| TRCP/P promedio | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.02 |
| ECI | 0.05 | 0.11 | 0.06 | 0.09 |
| TCs | 0.97 | 0.33 | 3.67 | 2.59 |
| TCsR | 0.57 | 0.23 | 0.86 | 0.73 |
| ICp | 1.12 | 0.82 | 3.2 | 2.84 |
| Ancho cápsula cefálica | 0.56 | 0.49 | 0.80 | 0.75 |
| Largo de larva | 4.42 | 4.17 | 5.79 | 6.07 |

Nota: Las medidas corporales son orientativas puesto que solo se registraron al final de los ensayos y por lo tanto no pueden relacionarse con los índices nutricionales. Referencias: Pp: pino ponderosa; Pr: pino radiata.

b) Larvas posthibernantes

Al igual que en el experimento anterior, sólo una parte de los brotes artificialmente infestados pudo recuperarse -21 para *P. ponderosa* y 29 para *P. radiata*-. A pesar que en este caso particular el tamaño de las yemas infestadas resultó parecido entre ambas especies forestales y por ende también el volumen de tejido disponible para consumo, las yemas de la especie *P. ponderosa* continúan siendo comparativamente más grandes. En este sentido, el impacto del daño se modificó en lo que respecta al porcentaje del volumen de la yema comprometido, que mostró mayor similitud entre ambas especies (Cuadro 5.7). De esta forma se pone de manifiesto una vez más el rol que desempeña el tamaño de las yemas. El test U de Mann-Whitney no arrojó diferencias significativas para la cantidad de tejido consumido en ambas especies de pino ($U_{(29,21)}=240$, $P=0.205$, prueba de dos colas). La cantidad de tejido consumido por las larvas en *P. ponderosa* representa, en promedio, 20% del tamaño de las yemas de esta especie y 27.5% en las de *P. radiata* (Cuadro 5.7).

La mortalidad y parasitismo de las larvas implantadas y recuperadas de los brotes resultó ser prácticamente igual en ambos hospedantes -ninguna larva estuvo parasitada, sólo dos larvas muertas en *P. ponderosa* y una en *P. radiata*-. Por el mismo motivo previamente indicado no se analizó la supervivencia en términos de larvas vivas recuperadas una vez concluido el experimento.

Cuadro 5.7. Valores promedio del tamaño y consumo de yemas en ambas especies.

| Parámetros de las yemas | Especie forestal | |
|---|------------------|------------|
| | Pp (n=14) | Pr (n=17) |
| Longitud (cm) | 2.21 | 1.77 |
| Diámetro (cm) | 0.62 | 0.51 |
| Long./diámetro (cm) | 3.54 | 3.09 |
| Volumen mm ³ | 290.5 | 153.38 |
| Mg consumidos | 55 | 39 |
| Mm ³ consumidos | 58 | 42 |
| % yema consumida en relación al volumen | 20 | 27.5 |

Referencias: Pp: pino ponderosa; Pr: pino radiata

La tasa relativa de crecimiento promedio resultó significativamente superior en las larvas criadas sobre *P. radiata* ($U_{(18,29)}=95.5$ $P=0.0001$, prueba de dos colas). A diferencia del experimento anterior, el análisis estadístico de los restantes índices nutricionales no arrojó diferencias significativas (IC: $U_{(21,29)}=247$, $P=0.258$; crecimiento individual: $U_{(18,29)}=234$, $P=0.554$; TRCP: $U_{(18,29)}=241$, $P=0.667$; ECI: $U_{(18,29)}=184$, $P=0.092$; TCsR $U_{(21,29)}=247$, $P=0.258$, pruebas de dos colas).

La TRCP/Peso promedio de las larvas cuya especie de procedencia es *P. radiata* resultó superior con el aumento en el peso fresco de las larvas, por lo que la curva se ubicó por encima de la correspondiente a la otra especie hospedante (Figura 5.8).

No se observó relación entre el índice de consumo y el peso final de las larvas criadas en ambas especies.

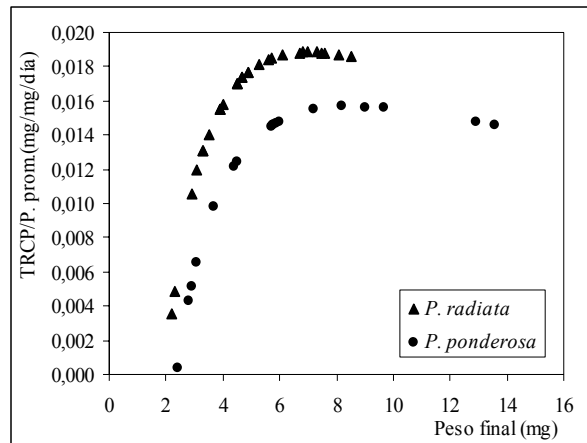


Figura 5.8. Relación entre TRCP/Peso promedio y peso final.

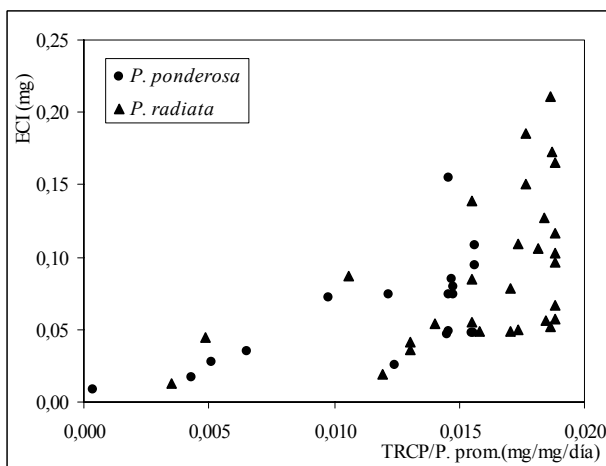


Figura 5.9. Relación entre ECI y TRCP/Peso promedio.

También se mantiene la relación ya observada entre el incremento en el consumo en relación con una reducción en las eficiencias (Figura 5.10).

Asimismo, la relación entre TRCP y ECI resultó similar a la observada en el ensayo con larvas procedentes de *P. radiata* y criadas sobre hospedantes distintos y semejante al experimento de campo con larvas prehibernantes. Nuevamente resultan llamativas las mayores tasas de crecimiento y los pares de valores extremos correspondientes a bajas eficiencias (Figura 5.9).

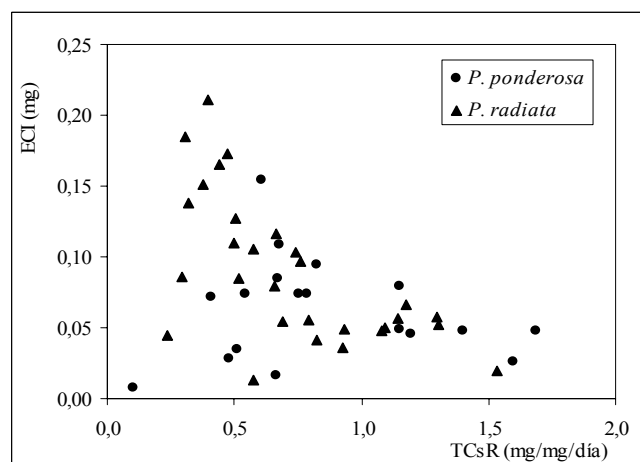


Figura 5.10. Relación entre ECI y TCsR.

5.1.1.3.2 Análisis de los índices nutricionales y sus relaciones

La tasa relativa de crecimiento promedio en ambos hospedantes fue de 0.01 mg/mg/día -excepto para las larvas posthibernantes procedentes de *P. radiata*-, mientras que los valores de ECI se mantuvieron entre 5-11% quedando incluidos dentro del rango establecido para otras especies (como se mencionó en la sección 5.1.1.2) pero inferiores a los obtenidos con las plantas en laboratorio (Cuadro 5.2). Estos valores de ECI se condicen por lo tanto con las bajas tasas relativas de consumo obtenidas -0.23-0.86 mg/mg/día- (Cuadro 5.6). Por otra parte los bajos porcentajes de eficiencia obtenidos en relación con el IC indican que las larvas en ambas especies de hospedantes crecen menos en relación con la cantidad de alimento que ingieren; habitualmente esto se relaciona con los metabolitos secundarios presentes en el alimento. En este sentido adquieren importancia los compuestos tóxicos constituyentes de la resina que circula por los canales de las yemas/brotes.

5.1.1.4 Aproximación nutricional cuantitativa para *R. buoliana*: Características orgánsmicas que influyen en el rendimiento e interacciones entre las tasas y eficiencias nutricionales

Tanto la utilización del alimento luego de la ingesta como la eficiencia biológica en los artrópodos inmaduros están influenciados por factores ambientales bióticos y abióticos y por características propias de los individuos. En este sentido el tamaño del cuerpo y los estados de desarrollo son características inherentes a los organismos que desempeñan un rol importante, influyendo en los valores y comportamiento de los índices nutricionales. Respecto de la primera característica mencionada se observa una tendencia creciente de los valores de las tasas de crecimiento con el incremento en el peso fresco final de las larvas, hasta alcanzar un valor constante que a partir de determinado peso empieza a decaer (Figuras 5.2 a-b-c y 5.5).

Con respecto a la distinción entre los estados de desarrollo, se observa que el crecimiento individual de las larvas o ganancia en peso es mayor en las posthibernantes -entre 3.09 y 7.84mg- que en las prehibernantes -entre 1,17 y 1,57mg-. Asimismo, la tasa relativa de crecimiento desciende de 0.01 a 0.003 mg/mg/día considerando los extremos de valores promedio obtenidos en ambas instancias de desarrollo (temprana y madura). Mientras tanto, las eficiencias en la conversión del alimento se mantienen o tienden a descender levemente (oscilando entre 5% y 19% para los estados de desarrollo más jóvenes y entre 6-9% para los más maduros).

Los valores promedio de la tasa relativa de crecimiento promedio calculada para la especie oscilaron entre 0.003 y 0.02 mg/mg/día, mientras que los valores también promedio de ECI se mantuvieron entre 5-19% quedando incluidos dentro del rango establecido para otras especies, tal como se mencionó previamente. No obstante, estos valores de ECI quedan comprendidos entre los más bajos dentro de los límites de eficiencia, tal como ocurre con las tasas relativas de consumo, que resultaron bajas en todos los casos -0.17-0.86 mg/mg/día-. Sin embargo, la relación inversa observada en todos los ensayos entre ambos índices se condice con lo que se ha comprobado para el grupo de los artrópodos.

Por otra parte, estos bajos porcentajes de eficiencia en relación con el IC indican que las larvas crecen menos que la cantidad de alimento que ingieren, lo cuál podría relacionarse con la presencia de compuestos aleloquímicos en la resina tales como los fenoles que retardan el desarrollo y disminuyen la

producción de biomasa corporal. Entre el índice de consumo y el peso final de las larvas no se observó relación. Tampoco resultó clara la relación entre la TRCP y ECI, al observarse una tendencia ascendente en ambos índices -se incrementa la TRCP a medida que aumenta la eficiencia de las larvas en la utilización del alimento ingerido-.

5.1.2 Preferencias de oviposición

5.1.2.1 Intensidad de oviposición

Los ensayos se realizaron durante dos temporadas consecutivas debido principalmente a las dificultades técnicas suscitadas con la cámara climatizada y a las derivadas del procesamiento del material vivo propiamente dicho, que se fueron subsanando en el transcurso de la temporada a pesar que se perdió parte del material colectado. Estas contrariedades adquirieron mayor importancia cuando se tiene en cuenta que los organismos utilizados como insumo para los ensayos se obtuvieron del campo, al no estar dadas las condiciones para criarlos en laboratorio desde los estados de desarrollo más jóvenes.

Durante la temporada 1999-2000 se recolectaron aproximadamente 500 brotes infestados de ambas especies forestales. De estos brotes se extrajeron 236 pupas macho y 265 pupas hembra de pino radiata, mientras que de pino ponderosa se obtuvieron 110 pupas macho y 127 pupas hembra. Una cantidad similar de brotes infestados se recolectó durante la temporada 2000- 2001 de los que se extrajeron 335 pupas macho y 293 pupas hembra de pino radiata, mientras que de los brotes de pino ponderosa se obtuvieron 172 pupas macho y 225 pupas hembra.

Las 48 jaulas preparadas para los ensayos emplearon 16% de las pupas colectadas y criadas. Son varios los motivos a los que pueden atribuirse pérdidas tan significativas: entre ellos cabe destacar principalmente la mortalidad producida por la contaminación con hongos y la deshidratación de las pupas en la heladera. Por otra parte, una proporción importante de adultos no pudo emplearse por la falta de sincronización en su emergencia además de los que emergieron en mal estado con alas mal extendidas o defectuosas. Asimismo, hubo jaulas en las que no se registraron oviposturas por lo que no fueron consideradas en el análisis.

Las pupas obtenidas de brotes de *P. radiata* resultaron más livianas que aquellas obtenidas de *P. ponderosa*: las hembras y machos procedentes de la especie citada en primer término pesaron en promedio 39.53 mg y 24.18 mg; mientras que las hembras y machos procedentes de la segunda especie pesaron en promedio 50.27 mg y 29.07 mg respectivamente ($t_s = -8.621$; $P = 0.0001$; g.l.= 499 para muestras no apareadas de pupas machos y $t_s = 10.554$; $P = 0.0001$; g.l.= 488 para muestras no apareadas de pupas hembras; ambas pruebas de dos colas). Estas diferencias no pueden relacionarse directamente con la especie de planta hospedante donde el insecto se alimenta, puesto que difieren las situaciones de las plantaciones de donde se extrajeron los brotes infestados con las pupas. Entre otras variables, la densidad de población, las condiciones ambientales y la edad de la plantación influyen en el tamaño y peso alcanzado por los organismos. Cabría esperar que la fecundidad de los adultos emergidos de las pupas con mayor masa corporal o bien el tamaño de los huevos resultara superior a la de aquellas de menor masa o peso.

En lo que respecta a la fecundidad resultó llamativo que en todos los ensayos el recuento total de huevos por jaula fue inferior al promedio que potencialmente cada hembra es capaz de depositar, alcanzando 66 el valor máximo registrado. Algunos autores (Miller y Neiswander 1955, Pointing 1961) señalan que cada hembra es capaz de oviponer entre 168 y 116 huevos en condiciones de laboratorio. Asumiendo que todas las hembras liberadas en las jaulas depositaron huevos en las ramas hospedantes ofrecidas, el número de huevos promedio por cada hembra fue 9. Es probable que esta suposición sobreestime la eficiencia de las hembras que no depositaron huevos y subestime la de aquellas que sí lo hicieron, pero la metodología seguida para la evaluación de la intensidad de oviposición no permite independizar esta variable. Una explicación plausible para este déficit es que las condiciones bajo las que se criaron las pupas y se conservaron los adultos en las jaulas de cría durante el ensayo fueron subóptimas, como se discutirá más adelante.

En concordancia con la diferencia en la masa corporal entre las pupas de ambas procedencias se observó que los huevos depositados por las hembras procedentes de *P. ponderosa* resultaron de mayor tamaño que los depositados por las hembras de la otra procedencia. La relación promedio diámetro mayor/diámetro menor fue 1.45 mm para *P. ponderosa* y 1.34 mm para *P. radiata* ($t_s = -26.662$; $P = 0.0001$ g.l.=213; prueba de dos colas). Los diámetros promedio mayor y menor de los huevos depositados por las hembras procedentes de *P. radiata* fueron 0.9 mm y 0.67 mm respectivamente mientras que para la otra procedencia fueron 0.97 mm y 0.67 mm respectivamente.

De las seis variantes originalmente propuestas se llevaron a cabo cuatro de ellas:

- a) *R. buoliana* procedente de *P. radiata* + hospedante ofertado *P. ponderosa*.
- b) *R. buoliana* procedente de *P. ponderosa* + hospedante ofertado *P. radiata*.
- c) *R. buoliana* procedente de *P. radiata* + hospedantes ofertados *P. radiata* y *P. ponderosa*.
- d) *R. buoliana* procedente de *P. ponderosa* + hospedantes ofertados *P. ponderosa* y *P. radiata*.

Para el caso de los ensayos a y b se concretaron seis y cuatro repeticiones (= jaulas) respectivamente, debido a las dificultades indicadas respecto de la obtención simultánea de suficiente cantidad de adultos.

Claramente se observa que cuando las hembras no tienen posibilidad de elegir entre distintas especies hospedantes y se les ofrece solamente una especie que es distinta de aquella de la que procede el insecto, oviponen igualmente sobre las ramas disponibles. En este sentido las hembras adultas estarían priorizando la seguridad de la postura de huevos aunque el hospedante no fuera el más adecuado, apreciación que se discute posteriormente. En dos oportunidades se observaron incluso oviposiciones en las cápsulas de Petri donde temporariamente se habían colocado las hembras una vez retiradas del ensayo. También se observó que es habitualmente una de las ramas la que concentra la mayor cantidad de oviposturas por sobre las restantes (Figuras 5.11 y 5.12).

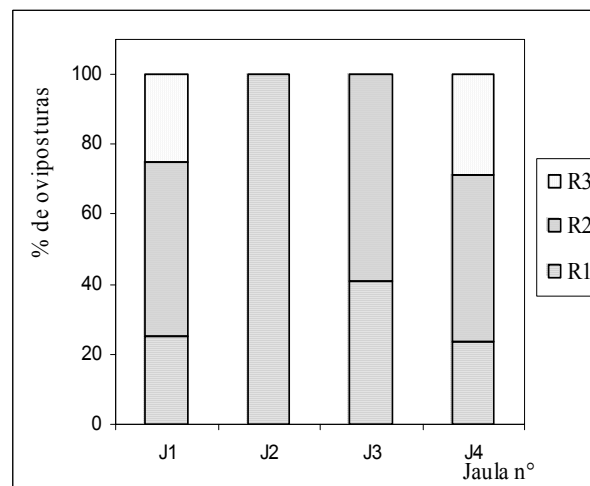
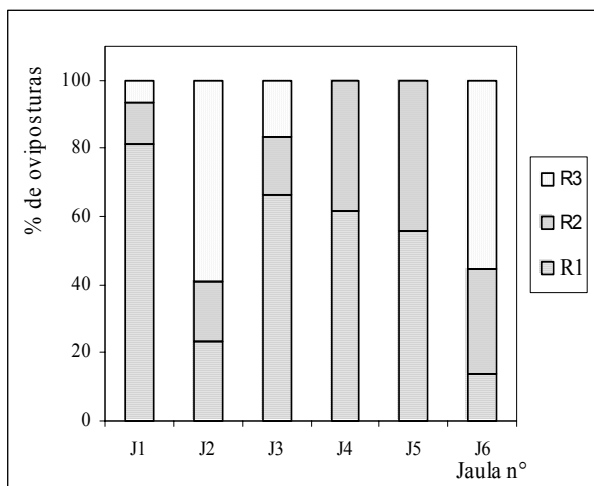


Figura 5.11. Distribución de oviposturas en ramas de *P. ponderosa*.

Figura 5.12. Distribución de oviposturas en ramas de *P. radiata*.

De la misma manera, al analizar la distribución de las oviposiciones considerando los brotes de cada una de las ramas ofrecidas, se observó esta “preferencia” aunque no todas las ramas portaban igual cantidad de brotes (Cuadro 5.8). La secuencia de numeración de las ramas y brotes responde solamente al orden en que fueron analizados por lo que no existe correspondencia entre aquellos de igual denominación en las distintas jaulas o repeticiones.

Cuadro 5.8. Detalle de la distribución de las oviposturas en ramas y brotes de ambos hospedantes.

| R N° | Rama/Brote n° | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|---------------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|
| | R1Br1 (%) | | R1Br2 (%) | | R1Br3 (%) | | R1Br4 (%) | | R2Br1 (%) | | R2Br2 (%) | | R3Br1 (%) | | R3Br2 (%) | | R3Br3 (%) | |
| | Pp | Pr | Pp | Pr | Pp | Pr | Pp | Pr | Pp | Pr | Pp | Pr | Pp | Pr | Pp | Pr | Pp | Pr |
| J1 | 50 | 16.6 | 6.25 | 8.33 | 6.25 | ----- | 18.7 | ----- | 12.5 | 41.6 | ----- | 8.33 | 6.25 | 16.6 | ----- | 8.33 | ----- | ----- |
| J2 | 23.5 | 100 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 5.88 | ----- | 11.7 | ----- | 29.4 | ----- | 23.5 | ----- | 5.88 | ----- |
| J3 | 50 | 40.9 | 16.6 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 16.6 | 13.6 | ----- | 45.4 | 16.6 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| J4 | 52.3 | 23.8 | 9.52 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 19.0 | 28.5 | 19.0 | 19.0 | ----- | 4.76 | ----- | 23.8 | ----- | ----- |
| J5 | 33.3 | ----- | 22.2 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 33.3 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| J6 | 13.7 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 31.0 | ----- | ----- | ----- | 55.1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |

Referencias: R= repetición (jaula); Pp= *P. ponderosa*; Pr= *P. radiata*; R1Br1= rama 1- brote 1, etc.

El número de huevos por puesta osciló entre uno a cinco, siete y diez atribuyéndose la mayor frecuencia a la postura unitaria (47%) y a continuación a aquella de dos huevos/puesta -21% de los casos-. Las puestas de siete y diez huevos constituyen casos excepcionales pues se registraron a razón de una vez cada una en la totalidad de los ensayos. Los huevos clasificados como inviables constituyeron una proporción baja contabilizando siete en total. Se establecieron cinco categorías para la ubicación de las posturas en los brotes: cara interna de la acícula, cara externa de la acícula, braquiblasto, tallo del brote- rama (Foto 5.1) y yema. La ubicación más frecuente es sobre las acículas, especialmente sobre la cara externa (37%), seguida por la distribución a lo largo del tallo del brote o de la rama seleccionada (23%).



Foto 5.1. Oviposición sobre el brote. 140x

En lo que respecta a la combinación de ambas variables, es decir cantidad de huevos por puesta y ubicación de la misma, se observó que los huevos son puestos de a uno con mayor frecuencia en la cara interna y/o externa de las acículas. A ello le sigue la preferencia por oviponer en forma también unitaria y sobre el tallo del brote o la rama elegida (Figura 5.13).

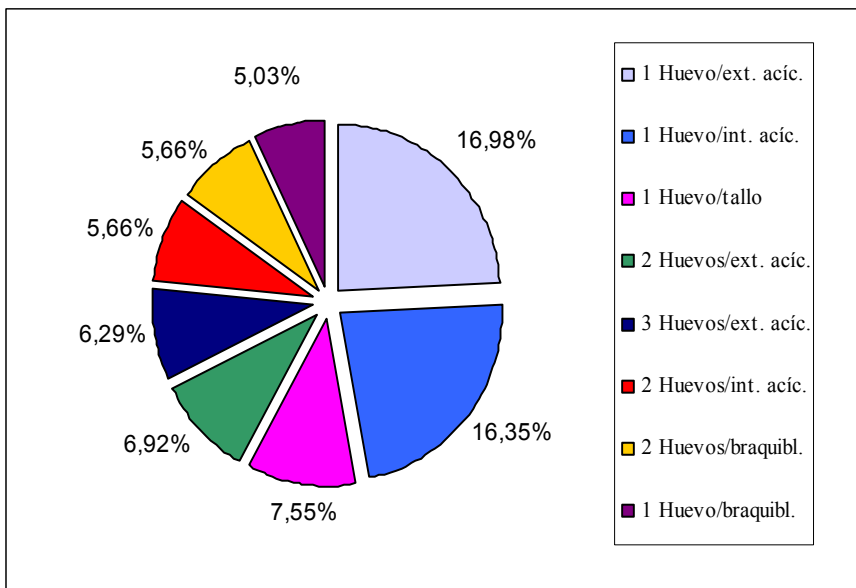


Figura 5.13. Distribución de las combinaciones más frecuentes de ubicación de las posturas y número de huevos/puesta.

Dado que los huevos son puestos mayoritariamente de a uno la relación entre el número total de huevos registrados en cada jaula y la cantidad de oviposiciones muestra una tendencia ascendente a medida que también aumentan ambas variables (Figura 5.14). Las hembras distribuyen aparentemente en un mayor número de veces la totalidad de los huevos que potencialmente son capaces de depositar y no los concentran en pocas oviposiciones más numerosas. En esta última apreciación se asume que todas las hembras de la jaula han participado en la postura a pesar que la cantidad total de huevos registrada por cada jaula es muy inferior a aquella que potencialmente podrían poner las hembras en conjunto.

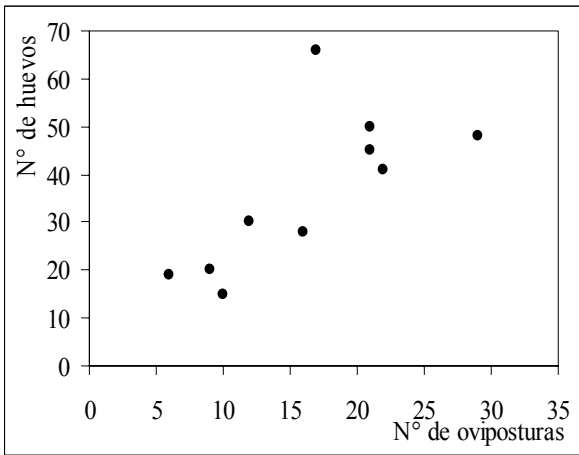


Figura 5.14. Relación entre el número total de huevos y ovipositoras.

En el caso de los ensayos c y d, es decir aquellos de selección simultánea de hospedantes, se concretaron 18 y 20 repeticiones respectivamente. Los resultados indican que las hembras prefieren oviponer en sus especies hospedantes originales; la procedencia *P. ponderosa* deposita mayor cantidad de huevos sobre esta especie que sobre *P. radiata* ($U_{(20,18)} = 76$, $P=0.002$, prueba de dos colas) mientras que la procedencia *P. radiata* deposita la mayor cantidad sobre *P. radiata* ($U_{(20,18)}=76.5$, $P=0.002$, prueba de dos colas). Esta preferencia no está asociada a una fidelidad estricta por el hospedante natal puesto que las hembras aceptan ambas especies de hospedantes ofrecidas pero depositan mayor cantidad de huevos sobre aquella de la cuál provienen (Figura 5.15). En términos de porcentaje para el total de las repeticiones expresado por procedencia se observa que la cantidad de huevos depositados sobre la especie de origen alcanza valores del orden de 49- 54% por sobre la otra especie (Figura 5.16).

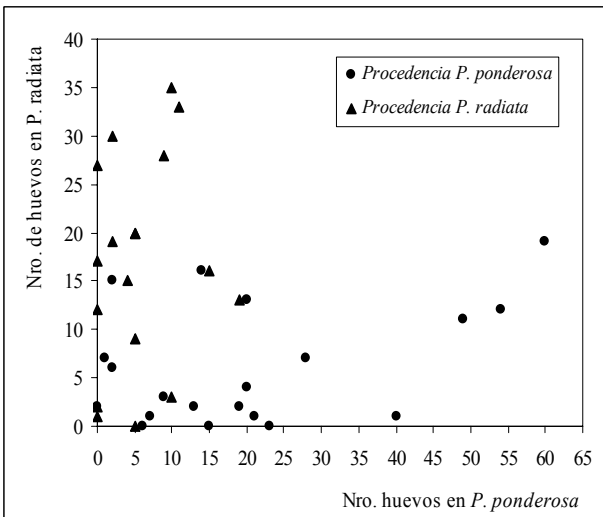


Figura 5.15. Distribución de la cantidad de huevos por procedencia.

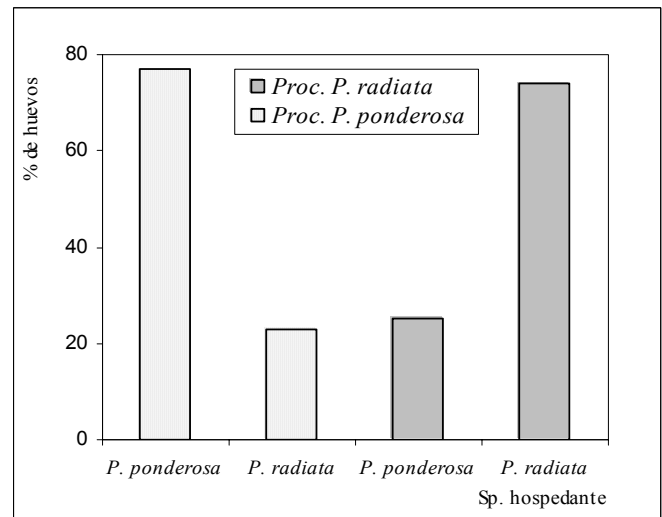


Figura 5.16. Porcentaje de huevos por hospedante según su procedencia y hospedante.

Aquellos ensayos que contemplaban la oferta de ramas de una sola especie igual a aquella de la que procedía el insecto no se llevaron a cabo por las razones ya explicitadas al comienzo de esta sección.

Se observó un alto porcentaje de parasitismo en las larvas que se extrajeron de los brotes de las localidades de Dina Huapi y Epuyén –*O. obscurator*, Hymenoptera Braconidae y el hiperparasitoide *Perissocentrus* sp., Chalcidoidea, Torymidae-, circunstancia que redundó en un escaso número de pupas colectadas. Por este motivo, la recolección de material para los ensayos de la segunda temporada se realizó en las plantaciones restantes. También pudieron observarse larvas de la familia Cleridae (Coleoptera) depredando pupas de la mariposa.

5.1.2.2 Algunas observaciones sobre el sistema reproductor femenino en relación con la puesta

El sistema reproductor femenino es el típico de los lepidópteros ditrisios, grupo al cual pertenece esta especie. Son insectos sinovigénicos puesto que a lo largo de los ovariolos se observan ovocitos en diferente estado de desarrollo. Esto significa que su longevidad restringe la cantidad de huevos que puedan depositarse. En este caso el tiempo desempeña un rol importante como factor limitante que afecta su dispersión y oviposición. Cuanto mayor sea la cantidad de reservas que almacenen las hembras en el cuerpo graso, mayor será la energía disponible para permitir la maduración de los huevos, con lo que se aumentaría su producción. En general se cumple que en estos organismos la cantidad de huevos que podrían depositarse es directamente proporcional al contenido de grasa almacenado en el cuerpo graso.

Se disecaron 55 hembras en total, las que aún se conservaban frescas al finalizar el ensayo. Aquellos ejemplares que ya estaban muertos o desecados al retirarse de la jaula fueron desechados. En general se observó el estado del cuerpo graso de parcial a completamente reducido y constituido por pequeños paquetes de células muy pequeñas e irregulares, a causa de la demanda y del lógico consumo energético durante los siete días de duración del ensayo. En todos los ejemplares disecados se hallaron ovocitos en los ovariolos, y en algunos casos incluso en los ductos laterales y oviducto común, sugiriendo en este caso que las hembras podrían continuar con la oviposición durante algún tiempo. En la mayoría de los casos se contabilizaron en promedio entre 8-10 ovocitos por ovario como número remanente. Coincidiendo con aquellas jaulas en las que se registró un bajo número de huevos, la cantidad de ovocitos por ovario resultó superior a 20. También se observaron ejemplares con sólo 2- 3 ovocitos y casos extremos en los que las hembras prácticamente no depositaron huevos, en cuyo caso los ovarios estaban plenos de ovocitos que no pudieron cuantificarse claramente.

5.1.3 Crecimiento de las yemas-brotes y caracteres anatómicos de las yemas perforadas

a) Crecimiento de las yemas y brotes

En ambas especies forestales se observó prácticamente el mismo patrón general de elongación y ensanchamiento diarios promedio de las yemas terminales de los tres estratos considerados. Como era natural que ocurriese, el crecimiento disminuyó hasta detenerse a medida que se aproximaba la temporada invernal (Figuras 5.17 y 5.18). Las yemas-brotes de *P. ponderosa* crecieron menos que los de *P. radiata* durante el período marzo-abril. En el siguiente período de medición (abril-mayo) esta relación se invirtió, siendo las yemas-brotes de *P. ponderosa* las que presentaron el mayor crecimiento. Corresponde entonces señalar que hacia finales del período vegetativo se produjo una mayor elongación y ensanchamiento de estas yemas-brotes, mientras que para *P. radiata* este incremento ocurrió con anterioridad.

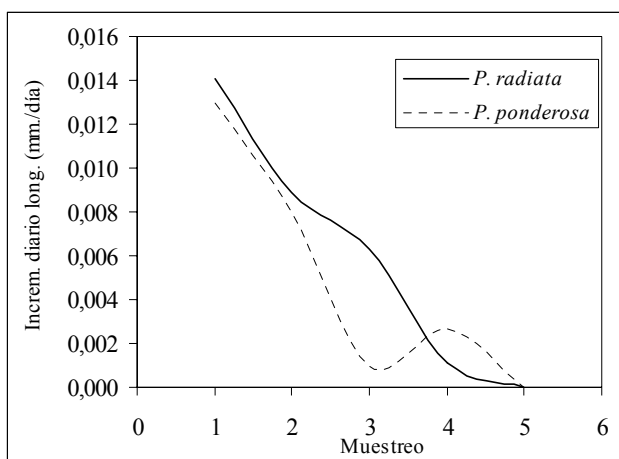


Figura 5.17. Crecimiento en longitud de las yemas terminales en ambas especies.

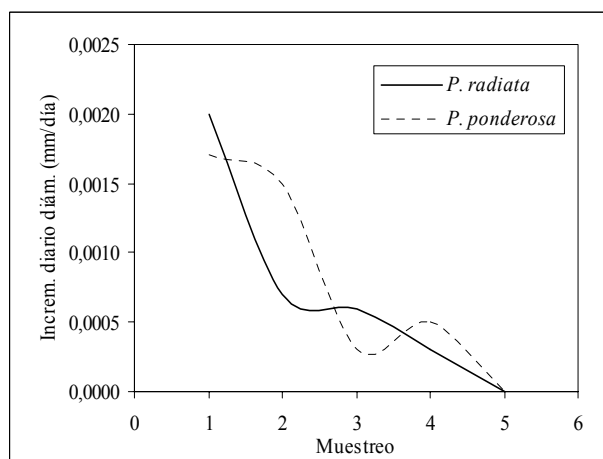


Figura 5.18. Crecimiento en diámetro de las yemas terminales en ambas especies.

Las ligeras diferencias registradas en la elongación y ensanchamiento de los brotes en ambas especies fueron significativas para el período de crecimiento comprendido entre marzo y mayo (marzo-abril – Muestreo 3- y abril-mayo –Muestreo 4-) (Cuadro 5.9). Asimismo, el crecimiento en diámetro resultó superior en *P. ponderosa* para el período febrero-marzo –Muestreo 2- (Cuadro 5.9). El crecimiento de los brotes de ambas especies hacia el final del período, de 0.0003 mm/día, resultó similar. La elongación diaria promedio para todo el período monitoreado resultó de 0.061 mm/día para *P. radiata* y de 0.05 mm/día para *P. ponderosa*, mientras que el incremento en diámetro fue 0.007 mm/día y 0.008 mm/día para una y otra especie.

Cuadro 5.9. Valores significativos y del estadístico U de Mann-Whitney entre los crecimientos de las yemas de *P. radiata* y *P. ponderosa*.

| Período muestreo | Incremento en longitud | | Incremento en diámetro | |
|------------------|------------------------|--------|------------------------|-------|
| | U | P | U | P |
| M2 | ----- | ----- | (54,72)=1324 | 0.002 |
| M3 | (60,71)=1350 | 0,0001 | (54,71)=1595 | 0.099 |
| M4 | (60,69)=1649 | 0,042 | (60,69)=1717 | 0.053 |

Al comparar la elongación diaria promedio de las yemas entre árboles clasificados con alta y baja intensidad de ataque en la especie *P. radiata*, se observó que la curva de crecimiento de las plantas con mayor intensidad de ataque se ubicó por debajo de la correspondiente a los de baja intensidad (Figuras 5.19 y 5.21). A pesar de ello, las diferencias en el incremento diario resultaron significativas para los períodos monitoreados de febrero-marzo y marzo-abril (Muestreo 2 y Muestreo 3, Cuadro 5.10), cuando las larvas empiezan a penetrar en las yemas luego de su fase de alimentación en las acículas. Esta pauta de crecimiento se verificó tanto en las yemas terminales como en las laterales pero con distinto orden de magnitud. Las diferencias en el incremento diario fueron significativas para los mismos períodos además del de abril-mayo –Muestreo 4- (Cuadro 5.10). Es decir, las plantas cuyas yemas sostuvieron un ritmo de elongación diario promedio inferior durante este período son aquellas

que sufrieron una alta intensidad de ataque. En este sentido, la velocidad de crecimiento podría desempeñar, entre otros factores, un rol importante en la intensidad de ataque a la planta.

De la misma manera, dada la similitud de los resultados, podría hacerse la analogía entre las yemas en ambos hospedantes asumiendo entonces que el crecimiento más lento de los brotes de *P. ponderosa* estaría predisponiendo a las plantas a una mayor intensidad de ataque. Dado que la mayor parte de las plantas estudiadas no estaban atacadas o bien la intensidad de ataque era baja, se infiere que la intensidad de ataque en esta especie no se relaciona estrechamente con el crecimiento de sus brotes, sino que la misma podría estar influenciada primariamente por otros factores los que se mencionarán más adelante.

En lo que respecta al incremento en diámetro, la relación es más clara en las yemas laterales, ya que las diferencias en los incrementos resultaron significativas para los mismos períodos (Figuras 5.20 y 5.22). Se observó que en las plantas con alta intensidad de ataque estas yemas tuvieron un menor ritmo de crecimiento en diámetro hacia fines del período (Muestreo 3 -M3- y Muestreo 4 -M4-) para luego detenerse (Figura 5.22). Es decir, para los períodos M3 y M4, los crecimientos en longitud y diámetro de las yemas de plantas con mayor intensidad de ataque resultaron inferiores que los de las yemas de plantas con baja intensidad de ataque (Cuadro 5.10). En el caso de las yemas terminales la relación no resultó tan clara, coincidiendo un mayor incremento en diámetro con un menor incremento en longitud para el período febrero- marzo (M2) y un mayor ensanchamiento para el último período.

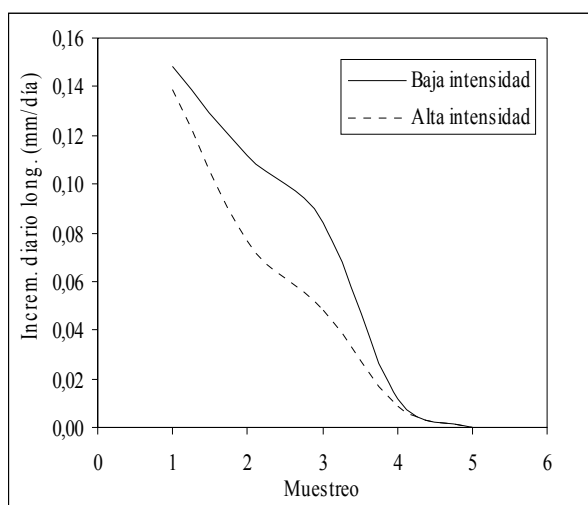


Figura 5.19. Crecimiento en longitud de las yemas terminales en *P. radiata* con diferente intensidad de ataque.

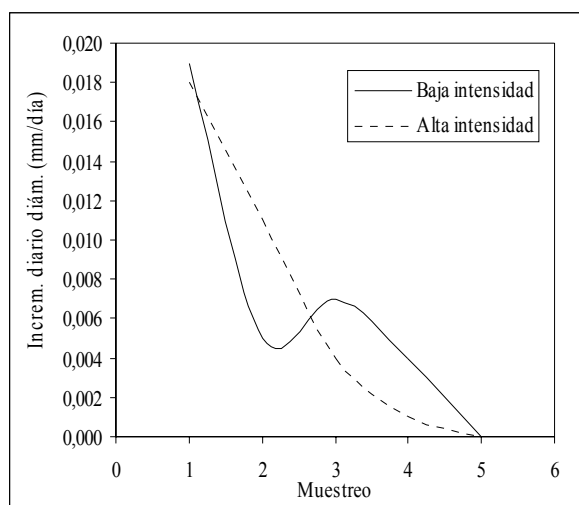


Figura 5.20. Crecimiento en diámetro de las yemas terminales en *P. radiata* con diferente intensidad de ataque.

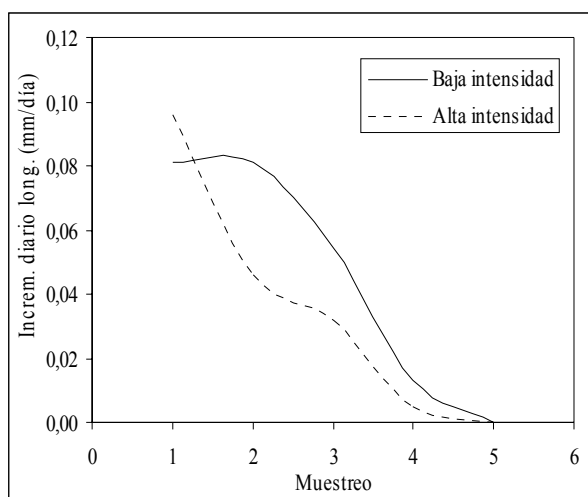


Figura 5.21. Crecimiento en longitud de las yemas laterales en *P. radiata* con diferente intensidad de ataque.

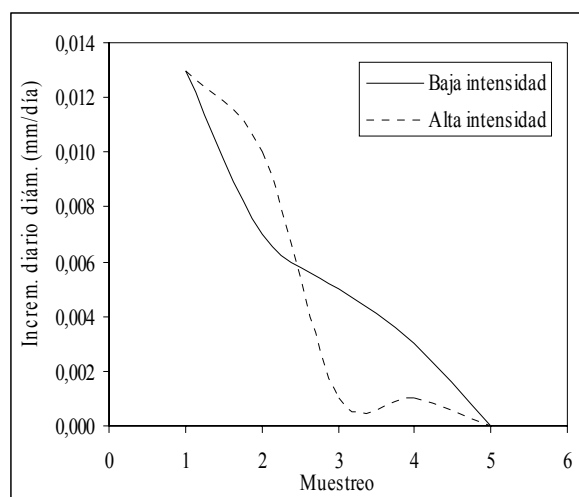


Figura 5.22. Crecimiento en diámetro de las yemas laterales en *P. radiata* con diferente intensidad de ataque.

Cuadro 5.10. Valores significativos de la prueba de Wilcoxon para los crecimientos de las yemas entre pares de plantas con baja y alta intensidad de ataque en *P. radiata*.

| Período muestreo | Yemas terminales | | Yemas laterales | |
|---------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Increment. long. | Increment. diám. | Increment. long. | Increment. diám. |
| M1 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| M2 | 0.012 | 0.018 | 0.02 | ----- |
| M3 | 0.018 | ----- | 0.02 | 0.02 |
| M4 | ----- | 0.045 | 0.024 | 0.007 |

b) Cambios generales observados en los tejidos de las yemas atacadas

La perforación producida por las larvas en las yemas parece ocasionar respuestas similares en ambas especies. El aspecto global es el de desorganización general de los tejidos observándose los cambios más marcados en el tejido parenquimático. En la zona del daño, donde la larva comienza a alimentarse, este tejido se necrosa y la necrosis se extiende a través de la yema en mayor o menor grado, según la magnitud del daño. La necrosis del tejido avanza siempre a través de las células parenquimáticas y alcanza la médula; los radios parenquimáticos también resultan afectados en este avance. Esta afección se observa en los cortes efectuados tanto a la altura de la horadación producida por la larva, como por encima y por debajo de la misma, como si dichas células desempeñaran un rol en la transferencia de los estímulos que propician estos cambios en el tejido.

La desorganización del tejido es producida por el aspecto que adquieren las células parenquimáticas en la zona inmediata al daño. La forma de las células se torna cuadrangular o subcuadrangular y se observa un cambio en el sentido de división de las mismas, el que se hace perpendicular con respecto al parénquima no afectado y de aspecto normal. Asimismo, cuando las yemas están curvadas, indicando que se han recuperado del ataque, se observa un cambio en la disposición general circular de los haces vasculares puesto que el anillo aparece incompleto en la zona recuperada, donde se forma tejido

parenquimático. La disposición de los haces en la yema depende entonces de la forma y alcance del daño que compromete a este tejido.

En general se observó que las células parenquimáticas de la medula y algunas células del parénquima cercano a la zona de la herida poseían gran cantidad de gránulos con contenido celular e incluso sus paredes celulares más engrosadas. El espesor medido en las paredes no engrosadas resultó del orden de 2.44μ mientras que el de las paredes engrosadas osciló entre 4.88μ y 6μ . Modificaciones similares han sido descritas en otras especies forestales y para las células parenquimáticas del floema frente al ataque de hongos patógenos transportados por insectos (Franceschi *et al.* 1998, Nagy *et al.* 2000). Estas reacciones son consideradas como parte del sistema de defensas constitutivas de la planta, en la que se involucran sustancias como polifenoles, gránulos de almidón y gotas lipídicas (Franceschi *et al.* 1998). El conocimiento de la naturaleza de estas sustancias queda fuera del alcance de este estudio.

En las yemas donde la larva apenas había horadado el tejido se observó en general una especie de tapón de resina en forma de cuña a partir de la zona de los canales comprometidos y sin modificaciones en los restantes tejidos. Esta reacción en el sitio del daño podría consistir en una respuesta masiva tendiente a constituir una barrera para sellar la herida, puesto que el daño no tuvo mayor alcance cuando la yema fue abandonada por la larva.

c) Cantidad y superficie ocupada por los canales resiníferos

El número de canales en los preparados de las yemas de *P. radiata* observados osciló entre 13 y 17, mientras que en *P. ponderosa* resultó mayoritariamente 13, en concordancia con lo establecido para la especie según las observaciones efectuadas por Sacher (1954). Sin embargo, en dos oportunidades se contabilizaron nueve y siete canales. Los canales observados en las yemas de *P. radiata* resultaron en promedio de menor diámetro (74.5μ , en un rango amplio comprendido entre 44μ y 105μ) que aquellos observados en las de *P. ponderosa* (valor promedio de 121.5μ , con un mínimo de 80μ y un máximo de 178μ), lo cual redundó en una menor superficie total promedio abarcada por los mismos. La superficie conjunta ocupada por estos canales duplicó en *P. ponderosa* a su correspondiente en *P. radiata* ($37\mu^2$ y $16\mu^2$ respectivamente que representan 1% y 0,5% de la superficie de corte de las yemas). El test U arrojó diferencias significativas entre ambas especies para la superficie individual de los canales resiníferos ($U_{(15,15)}=13$; $P= 0.009$). Ello adquiere especial relevancia considerando que estos canales aún no se han diferenciado completamente al momento de realizarse los cortes, pues esto no ocurre hasta que no se haya detenido el crecimiento de las yemas en el otoño, cuando los canales se ensanchan y alargan casi hasta el ápice de las yemas (Sacher 1954).

En este sentido, podría asumirse que las yemas-brotes de *P. ponderosa* están mejor defendidos en lo que a aspectos estructurales se refiere, pues su sistema de canales ocupa un área mayor en la yema y constituye el sistema de defensa primario de la planta contra el ataque de las larvas. Harris (1960) ha establecido para otras especies de *Pinus* sp. que las yemas más pequeñas tienen canales resiníferos más pequeños y por lo tanto producen menos cantidad de resina. No obstante, no sólo la cantidad de resina producida es importante sino que otros factores relacionados con su composición física y química desempeñan un rol importante en la defensa de la planta (Harris 1960, Hodges *et al.* 1979, Panda y Kusch 1995, De Groot y Turgeon 1998, Barbosa y Wagner 1987).

5.1.4 Himenópteros parasitoides y porcentaje de parasitismo

En la zona de muestreo sólo se detectaron parasitoides e hiperparasitoides de larvas. El parasitoide larval determinado es el braconido *Orgilus obscurator* (Ness) (Fotos 5.2 y 5.3), especie que fue introducida conjuntamente con la plaga como se mencionó oportunamente. Esta especie está presente en todas las plantaciones monitoreadas aunque en diferente grado. El muestreo sistemático durante las tres temporadas sucesivas en la plantación de *P. radiata* cercana a la ciudad de Esquel registró un incremento sostenido muy importante en los niveles de parasitismo de este controlador biológico (Cuadro 5.11). El aumento fue de 20% entre las dos primeras temporadas y alcanzó 30% entre las temporadas T2 y T3. De esta forma, este controlador biológico estaría contribuyendo fuertemente a reducir la densidad poblacional de la plaga. Sin embargo, no se cuenta con datos de densidad como para establecer una comparación al respecto.



Foto 5.2. Larva de *O. obscurator* en brote de pino. 120x



Foto 5.3. Capullo pupal de *O. obscurator* en brote de pino. 70x

Cuadro 5.11. Estado sanitario de las larvas colectadas y disecadas.

| | Larvas vivas | | Larvas parasitadas | | Larvas muertas | | Total larvas |
|----------|--------------|------|--------------------|-----|----------------|-----|--------------|
| | % | Nº | % | Nº | % | Nº | |
| Temp. 00 | 91.06 | 1171 | 5.68 | 73 | 3.26 | 42 | 1286 |
| Temp. 01 | 67.31 | 1007 | 26.80 | 401 | 5.89 | 88 | 1496 |
| Temp. 02 | 28.55 | 475 | 57.27 | 953 | 14.18 | 236 | 1664 |

En lo que se refiere a las larvas próximas a pupar se observaron ocasionalmente ejemplares muertos con una oquedad en la zona ventral (Foto 5.4), similar a los efectos producidos por las hembras fisogástricas de ácaros tarsonémidos que habitualmente parasitan pupas de lepidópteros. No obstante, los agentes de control no pudieron detectarse para identificarlos. Asimismo se registraron, también eventualmente, algunos casos de predación que no fueron identificados ni cuantificados (Foto 5.5).



Foto 5.4. Larva parasitaza próxima a pupar. 65x



Foto 5.5. Larva predada próxima a pupar. 120x

La presencia de hiperparasitoides se detectó únicamente a partir de la última temporada de monitoreo. Se trata de un chalcidoideo gregario (Torymidae, Monodontomerinae) correspondiente al género *Perissocentrus* cuya especie no pudo ser identificada (Fotos 5.6 y 5.7). Las larvas y pupas de este hiperparasitoide se encuentran en los brotes afectados en las proximidades del capullo pupal de *O. obscurator*.



Foto 5.6. Larvas gregarias de *Perissocentrus* sp. 120x



Foto 5.7. Pupas gregarias de *Perissocentrus* sp. 80x

5.2 Modelo fenológico basado en la acumulación de grados día (GD)

5.2.1 Relación entre la acumulación de grados día y el vuelo estacional de *R. buoliana*

5.2.1.1 Capturas en trampas

Los primeros machos se capturaron el 03/12 en la temporada 1999-2000, el 17/12 en la temporada 2000-2001, el 5 /12 en la temporada 2001-2002 y el 29/12 en la temporada 2002- 2003 mientras que las últimas capturas se registraron el 10/01, el 8/02, 21/01 y 10/02 para la primera, segunda, tercera y última temporada respectivamente (Cuadro 5.12). La cantidad de machos capturados fue similar para la primera y tercera temporadas de muestreo –1227 y 1170 respectivamente-, mientras que para la segunda fue 139 y 392 para la última temporada. La diferencia de la segunda temporada respecto de la primera y tercera podría explicarse por los fuertes vientos y lluvias que predominaron durante el período, disminuyendo drásticamente y/o dificultando el vuelo durante el período monitoreado –Ver referencias en Cuadro-. Por otro lado, la baja cantidad de adultos capturados durante la temporada 2002- 2003 podría deberse al muestreo destructivo que se llevó a cabo durante cuatro años consecutivos sumado a las condiciones climáticas predominantes durante este período, las que consistieron en vientos fuertes de hasta 100 km/hora.

Según Green (1962) el vuelo de la mariposa del brote disminuye significativamente por debajo de los 11-12°C, en tanto la lluvia tiene un efecto variable dependiendo de su intensidad. En este sentido se observa habitualmente que el vuelo disminuye significativamente cuanto más intensa es la lluvia.

En el segundo sitio de monitoreo seleccionado se capturaron un total de 403 machos adultos entre el 28/11/01 y 08/01/02. En este sitio el período de vuelo resultó ser de una semana menos de duración respecto del registrado en la plantación monitoreada durante las cuatro temporadas consecutivas.

Cuadro 5.12. Detalle de los GD acumulados y porcentaje de captura acumulada en cada fecha de muestreo y para cada temporada.

| Temporada 1999- 2000 | | | Temporada 2000- 2001 | | | Temporada 2001- 2002 | | | Temporada 2002- 2003 | | |
|-----------------------|---------|----------|-----------------------|---------|----------|-----------------------|---------|----------|-----------------------|---------|----------|
| Fecha | % capt. | GD acum. | Fecha | % capt. | GD acum. | Fecha | % capt. | GD acum. | Fecha | % capt. | GD acum. |
| 03/12/99 ^d | 4 | 10.80 | 17/12/00 | 0.72 | 10.55 | 05/12/01 | 0.17 | 9.95 | 29/12/02 | 0.77 | 7,67 |
| 06/12/99 | 4.16 | 31.40 | 21/12/00 | 5.75 | 47.33 | 10/12/01 | 1.45 | 45.05 | 5/01/03 | 10.71 | 64,98 |
| 14/12/99 | 25.92 | 123.19 | 25/12/00 ^a | 10.07 | 82.09 | 14/12/01 | 13.99 | 92.01 | 9/01/03 | 45.92 | 118,56 |
| 21/12/99 | 39.7 | 194.70 | 29/12/00 | 10.79 | 105.97 | 21/12/01 | 35.49 | 168.74 | 13/01/03 | 58.67 | 144,78 |
| 31/12/99 | 73.02 | 289.98 | 02/01/01 | 43.16 | 157.02 | 26/12/01 | 62.80 | 220.35 | 16/01/03 ^d | 74.74 | 178,47 |
| 03/01/00 | 96.58 | 316.18 | 04/01/01 ^b | 65.47 | 189.47 | 29/12/01 | 75.94 | 248.39 | 20/01/03 ^d | 76.02 | 204,45 |
| 10/01/00 | 100 | 376.30 | 08/01/01 ^b | 74.82 | 234.67 | 02/01/02 | 90.96 | 294.47 | 24/01/03 | 78.06 | 222,52 |
| 13/01/00 | 100 | 380.80 | 11/01/01 ^c | 76.26 | 250.99 | 05/01/02 ^d | 97.87 | 316.19 | 27/01/03 | 92.09 | 252,53 |
| | | | 15/01/01 | 84.17 | 282.70 | 08/01/02 ^b | 98.46 | 344.84 | 3/02/03 ^d | 97.96 | 321,58 |
| | | | 18/01/01 | 88.49 | 308.15 | 12/01/02 | 99.66 | 382.24 | 10/02/03 ^d | 100 | 386,34 |
| | | | 22/01/01 | 92.10 | 341.68 | 18/01/02 | 99.83 | 446.90 | 17/02/03 | 100 | 437,47 |
| | | | 25/01/01 | 94.96 | 373.20 | 21/01/02 | 100 | 488.30 | | | |
| | | | 29/01/01 | 98.56 | 410.17 | 24/01/02 | 100 | 526.70 | | | |
| | | | 05/02/01 | 99.28 | 468.14 | | | | | | |
| | | | 08/02/01 | 100 | 491.09 | | | | | | |
| | | | 12/02/01 | 100 | 518.63 | | | | | | |

Referencias: ^a lluvia torrencial; ^b lluvia intensa y viento; ^c lluvia; ^d viento fuerte.

5.2.1.1.1 Temperatura umbral inferior del estado adulto

La utilización del umbral de temperatura apropiado es uno de los factores importantes en el cálculo de los GD. Diferentes autores (Taylor y Shields 1990 *vide* Palma Prieto 1995, Wang 1960, Higley *et al.* 1986) afirman que cada uno de los estados de desarrollo de un insecto tiene su conjunto propio de temperaturas umbrales que se modifican con la edad. Es por ello que las curvas de tasa de desarrollo en función de la temperatura difieren en cuanto a la pendiente y posición según el estado de desarrollo del que se trate. No obstante, se utiliza habitualmente un umbral único de desarrollo para los diferentes estados inmaduros lo cual es considerado una simplificación de la realidad (Hardman 1976 *vide* Palma Prieto 1995).

Los GD acumulados -calculados a partir de la primera captura en trampas- son variables en cada una de las cuatro temporadas de muestreo y para los distintos umbrales estándar considerados, dificultando de esta forma el cálculo del CV para los datos de las cuatro temporadas en conjunto (Cuadro 5.13). Por esta razón los valores se agruparon en dos grupos de acuerdo a las temporadas que comprendieran los datos más similares entre ellas (grupo 1: temporadas 1999 y 2002 y grupo 2: temporadas 2000 y 2001) y que permitieran así obtener un valor esperable de temperatura umbral.

De esta manera el umbral inferior se estimó en 4.2 °C para ambos grupos de valores establecidos (Cuadro 5.13). Asimismo, este mismo umbral de temperatura se obtuvo para predecir el vuelo estacional calculado a partir de una fecha calendario fija (en este caso 01/07), tal como lo aplican otros modelos (Regan *et al.* 1991 y Richmond *et. al* 1983), como se tratará más adelante. Sin embargo, este valor teórico obtenido dista mucho de aquel de -2.2 °C estimado para la misma especie en el oeste de Oregon (Regan *et al.* 1991), aspecto que se discutirá posteriormente. Por otro lado, el estudio efectuado por Richmond *et. al* (1983) para estimar la temperatura umbral inferior de los adultos de *Rhyacionia frustrana* Comstock, una especie afín que también se alimenta en las yemas y brotes de *Pinus* sp. (Johnson y Lyon 1991), estableció la temperatura umbral inferior en 4.2 °C luego de siete temporadas consecutivas de monitoreo.

Estos umbrales teóricos resultan bajos puesto que habitualmente los umbrales inferiores para aquellos insectos que habitan en ambientes cálidos o templados es generalmente 10 °C, mientras que para los que viven y se alimentan sobre la superficie del suelo, árboles y arbustos los valores oscilan entre 5 °C y 10 °C. Los valores superiores de temperaturas umbral corresponden a algunas especies tropicales y oscilan entre 15 °C y 16 °C (Hale 2000).

Cuadro 5.13. Selección de la temperatura umbral inferior para el estado adulto a partir de la primera captura

| T° umbral | GD acumulados en: | | | | Media ₁ ^a | Media ₂ ^b | CV ₁ ^a | CV ₂ ^b |
|--------------|-------------------|--------|--------|--------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | | | | |
| -6.2 | 769.65 | 1040.2 | 972.05 | 829.5 | 1006.13 | 799.58 | 4.79 | 12.23 |
| -5.2 | 731.65 | 987.2 | 925.05 | 786.5 | 956.13 | 759.08 | 4.6 | 11.33 |
| -4.2 | 693.65 | 934.2 | 878.05 | 743.5 | 906.13 | 718.58 | 4.38 | 11.18 |
| -3.2 | 655.65 | 881.2 | 831.06 | 700.5 | 856.13 | 678.08 | 4.14 | 11.37 |
| -2.2 | 617.65 | 828.2 | 784.1 | 657.5 | 806.15 | 637.58 | 3.87 | 11.21 |
| -1.2 | 579.65 | 775.2 | 737.19 | 614.52 | 756.2 | 597.09 | 3.55 | 11.02 |
| 0 | 534.05 | 711.6 | 681.01 | 563.07 | 696.31 | 548.56 | 3.11 | 10.78 |
| 1.2 | 488.51 | 648.07 | 625.07 | 511.9 | 636.57 | 500.21 | 2.55 | 10.53 |
| 2.2 | 450.75 | 595.29 | 578.88 | 469.55 | 587.09 | 460.15 | 1.98 | 10.3 |
| 3.2 | 413.28 | 542.79 | 533.25 | 427.66 | 538.02 | 420.47 | 1.25 | 10.07 |
| 4.2 | 376.3 | 491.09 | 488.3 | 386.34 | 489.7 | 381.32 | 0.4 | 9.79 |
| 5.2 | 340.1 | 440.67 | 444.21 | 355.4 | 442.44 | 347.75 | 0.57 | 9.92 |
| 6.2 | 305 | 391.79 | 401.29 | 317 | 396.54 | 311.00 | 1.69 | 10.14 |

^a Media y Coeficiente de variación de las temporadas 2000 y 2001.

^b Media y Coeficiente de variación de las temporadas 1999 y 2002.

5.2.1.1.2 Modelo fenológico

El modelo predictivo que mejor describe el vuelo estacional de los adultos es el que inicia la acumulación de GD a partir de la primera captura de los machos en las trampas de feromonas. En este caso el modelo que mejor se ajusta es el de regresión sigmoidea, que mostró que ambas variables están bien correlacionadas (Fig. 5.23). El modelo tiene la siguiente expresión:

$$y = ab + cx^d / b + x^d$$

siendo $r^2 = 0.9558$; $s = 8.340$

donde:

y = porcentaje de captura acumulado,

x = GD acumulados por encima de 4.2 °C,

a, b, c, d = parámetros del modelo que adoptan los siguientes valores:

a = -0.3317407, b = 229518.62, c = 113.51631 y d = 2.3845703.

De la misma forma la regresión sigmoidea fue la que mejor ajustó la curva obtenida con los datos del sitio seleccionado en segunda instancia para monitorear el vuelo de los adultos, a pesar de la dificultad mencionada con el registro de las temperaturas. Los valores de los parámetros variaron sensiblemente y resultaron los siguientes: a = -1.6883174, b = 27712110, c = 113.89834, d = 3.2446582; $r^2 = 0.9658$; $s = 9.531$ (Figura 5.24).

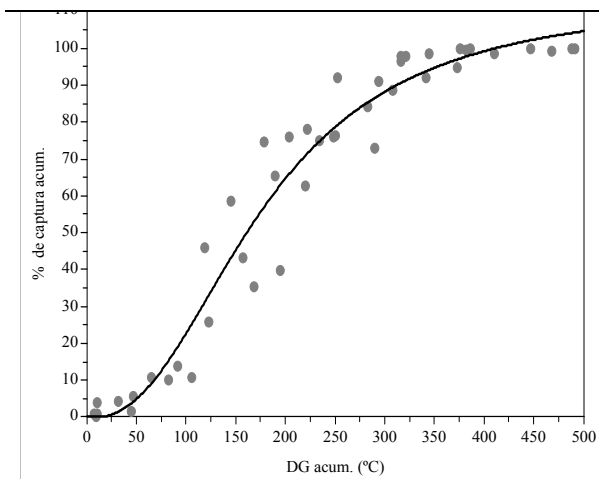


Figura 5.23. Capturas acumuladas de machos en vuelo vs. GD acumulados.

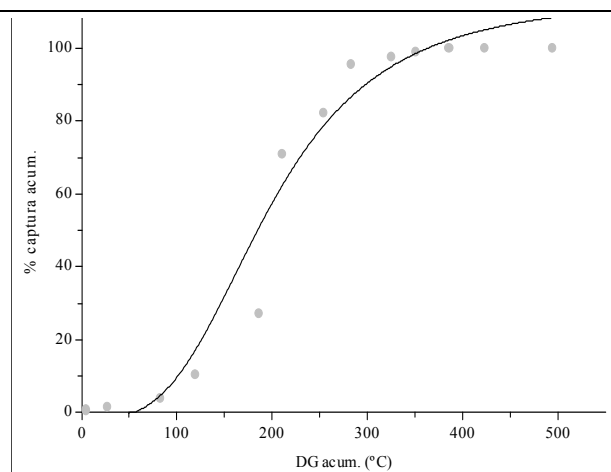


Figura 5.24. Capturas acumuladas de machos en vuelo vs. GD acumulados INTA.

Los porcentajes acumulados de capturas de machos son valores clave en el manejo de esta plaga pues la eficiencia de los insecticidas está relacionada con el porcentaje de emergencia de los adultos y de eclosión de los huevos (Butcher y Haynes 1960). Asimismo, la aplicación de los productos químicos se realiza cuando se registra la emergencia de 30-40% de adultos de ambos sexos o bien de 80%, dependiendo del tipo de compuesto que se aplique (Goycoolea, *com. pers.*).

Cuando la acumulación de GD se inicia con una fecha calendario fija considerada, en este caso primero de julio, tal como se ha empleado exitosamente en otros modelos ya nombrados (Richmond *et al.* 1983, Regan *et al.* 1991) para predecir el comienzo del vuelo estacional, se destacan dos grupos de datos de temperaturas similares. El primer grupo reúne los GD acumulados para las temporadas 1999 y 2000 y el segundo grupo reúne los GD acumulados para las dos temporadas restantes (Figura 5.25). Por este motivo no se pudo encontrar una función que describa la nube de puntos obtenida en el gráfico y por lo tanto se analizaron los datos agrupados de a dos temporadas de acuerdo a la mayor similitud de temperaturas acumuladas. De esta forma se obtuvo el mismo umbral inferior de desarrollo (calculado para el período comprendido entre el 01/07 y la última captura) que el calculado a partir de la primera captura en las trampas y estimado en 4.2 °C (Cuadro 5.14).

Cuadro 5.14. Selección de la temperatura umbral inferior para predecir el inicio del vuelo a partir del 01 de julio.

| T° umbral | GD acumulados en: | | | | Media ₁ ^a | Media ₂ ^b | CV ₁ ^a | CV ₂ ^b |
|-----------|-------------------|---------|---------|---------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | | | | |
| -6.2 | 2314.62 | 2401.41 | 1858.21 | 2135.36 | 2358.02 | 1996.79 | 2.6 | 9.81 |
| -5.2 | 2157.35 | 2233.66 | 1708.52 | 1956.78 | 2195.51 | 1832.65 | 2.46 | 9.58 |
| -4.2 | 2001.09 | 2066.92 | 1560.74 | 1780.32 | 2034.01 | 1670.53 | 2.29 | 9.29 |
| -3.2 | 1846.25 | 1901.77 | 1415.48 | 1607.11 | 1874.01 | 1511.30 | 2.09 | 8.97 |
| -2.2 | 1693.23 | 1738.61 | 1273.51 | 1438.27 | 1715.92 | 1355.89 | 1.87 | 8.59 |
| -1.2 | 1542.72 | 1578.26 | 1135.78 | 1274.63 | 1560.49 | 1205.21 | 1.61 | 8.15 |
| 0 | 1366.34 | 1385.09 | 977.82 | 1086.97 | 1375.72 | 1032.40 | 0.96 | 7.48 |
| 1.2 | 1195.82 | 1206.63 | 829.97 | 911.92 | 1201.23 | 870.95 | 0.64 | 6.65 |
| 2.2 | 1059.02 | 1064.88 | 716.02 | 777.38 | 1061.95 | 746.70 | 0.39 | 5.81 |
| 3.2 | 927.96 | 930.86 | 610.96 | 653.82 | 929.41 | 632.39 | 0.22 | 4.79 |
| 4.2 | 804.39 | 805.58 | 514.66 | 533.33 | 804.99 | 524.00 | 0.1 | 2.52 |
| 5.2 | 689.2 | 690.45 | 427.66 | 443.66 | 689.83 | 435.66 | 0.13 | 2.6 |

^a Media y Coeficiente de variación de las temporadas 1999 y 2000.

^b Media y Coeficiente de variación de las temporadas 2001 y 2002.

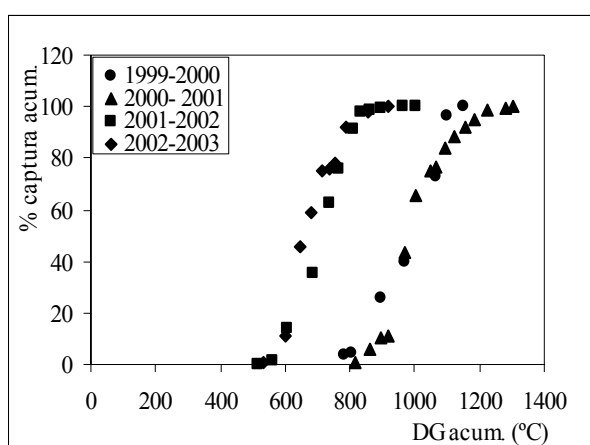


Figura 5.25. Capturas acumuladas de machos en vuelo vs. GD acumulados a partir del 1 de julio.

La utilización de otro evento biológico tal como la detección de la primera pupa en terreno tampoco permitió predecir satisfactoriamente el inicio del vuelo. La acumulación de temperaturas desde el registro de la primera pupa en los brotes hasta la primera captura de machos en trampas resultó muy diferente entre las tres temporadas: 360.32 GD (2000-2001), 180.6 GD (2001-2002) y 285.11 GD (2002-2003), mostrando tres curvas bien diferenciadas y desplazadas entre sí (Figura 5.26). Esta diferencia puede deberse en parte a un error en el muestreo que imposibilitó la detección de la primera pupa en el momento correcto, si bien las fechas calendario sí resultaron similares entre sí (entre el 07/11 y 23/11).

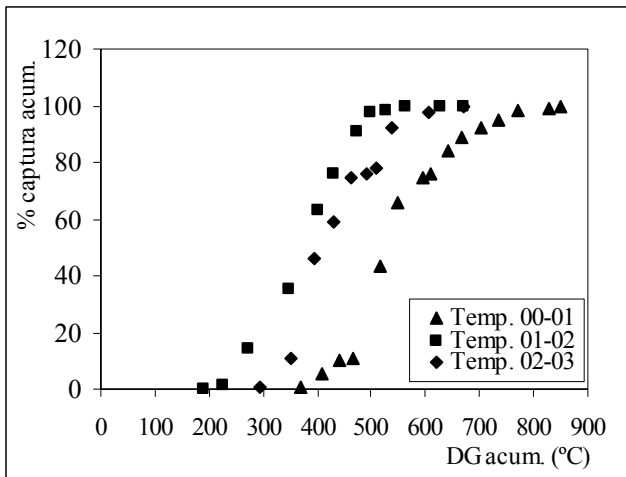


Figura 5.26. GD acumulados a partir del registro de la primera pupa vs. captura de machos.

Otra explicación posible a las diferencias térmicas entre temporadas se basa en la observación del comportamiento de la temperatura en años sucesivos, es decir, conocer qué tan variable puede ser la temperatura para una misma época del año pero en los diferentes años de una extensa serie. En este sentido, la información correspondiente no es accesible y sólo se pudo disponer de los datos de las temperaturas tomadas a las 12hs. de una serie de 15 años (comprendidos entre 1985-2000) en una estación meteorológica situada aproximadamente a 23 km de la ciudad de Esquel.

De este análisis surge que las temperaturas pueden ser altamente variables entre las distintas temporadas en los años sucesivos (Figuras 5.27 y 5.28). En este caso se grafican los meses de verano e invierno en que se registran las temperaturas más altas o las más bajas, considerando la temperatura mensual promedio a las 12hs. Con estos datos no es posible observar una tendencia de las curvas hacia temporadas más cálidas o frías pero sí se puede observar claramente que si el presente estudio ocupó sólo cuatro temporadas, corresponde a una pequeña fracción en una extensa serie que perfectamente podría abarcar casos extremos de temperaturas para los años comprendidos en el mismo. De esta forma se podría estar incluyendo un período sumamente variable que obviamente introduce demasiada variación entre temporadas impidiendo un buen del ajuste del modelo. En este caso podría seguirse el monitoreo durante varias temporadas (siendo altamente deseable que se pueda incorporar un número elevado, usualmente se consideran 8- 10 años sucesivos) a fin de abarcar la mayor variación posible y concluir si es posible o no ajustar el mismo. También es válido tener en cuenta que este método predictivo puede no ser aplicable para *R. buoliana*.

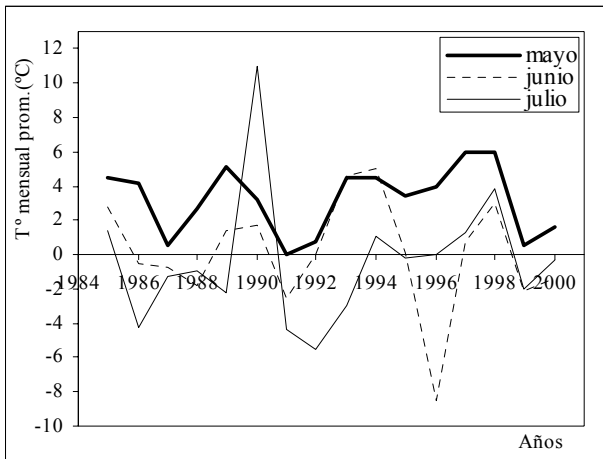


Figura 5.27. Variación de la temperatura mensual promedio en una serie de 15 años durante los meses más fríos.

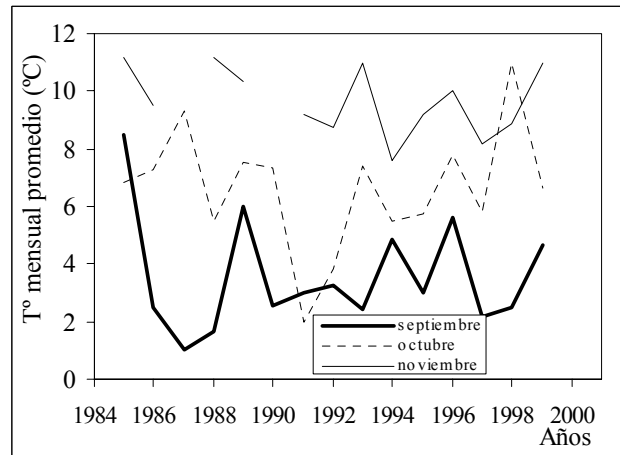


Figura 5.28. Variación de la temperatura mensual promedio en una serie de 15 años durante los meses más cálidos.

Nota: La discontinuidad en la curva del mes de noviembre se debe a la falta de datos.

De la misma manera, si se grafican las temperaturas medias mensuales para las tres temporadas completas monitoreadas durante el estudio, se observa que en algunos meses la variación entre temporadas es importante (Figuras 5.29 y 5.30).

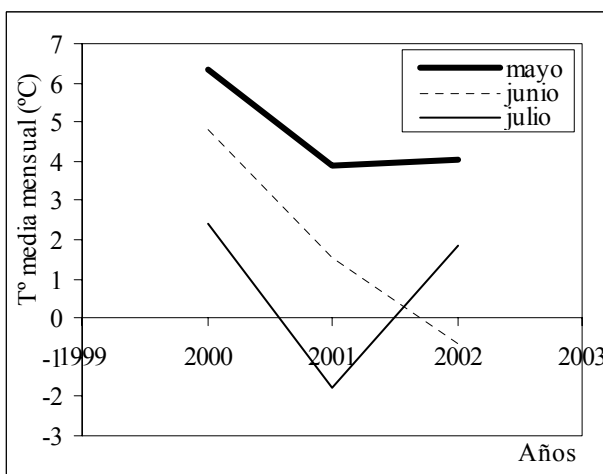


Figura 5.29. Variación de la temperatura mensual promedio para las temporadas 2000- 2002 durante los meses más fríos.

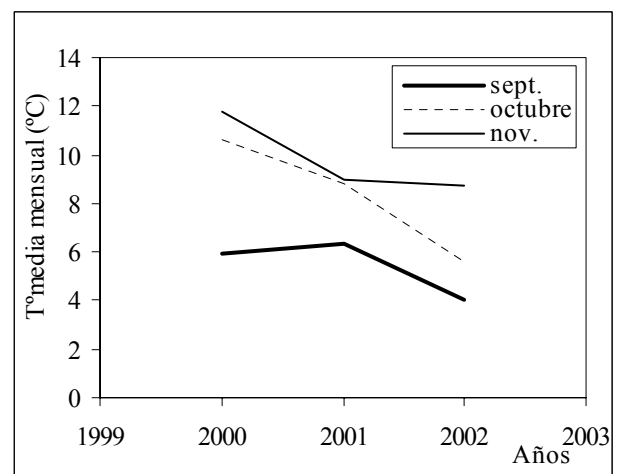


Figura 5.30. Variación de la temperatura mensual promedio para las temporadas 2000- 2002 durante los meses más cálidos.

En la figura 5.31 se observa que en las curvas de capturas no acumuladas aparece una mayor concentración de valores de porcentajes de captura en torno a un valor central de GD. Sin embargo, este valor central de GD no coincide para las cuatro temporadas sino que hay un desplazamiento entre ellas indicando una diferencia mínima de aproximadamente 50 GD entre las temporadas 2000-2001 y 2001-2002 y de 200 GD entre la primera y la última. Una de las posibles explicaciones podría ser que se comenzó a registrar la acumulación de los GD a partir de la primera captura de un macho en vuelo; concretamente 03/12/1999 para la primera, 17/12 para la segunda temporada, 05/12 para la tercera y

29/12 para la última. Ese retraso de aproximadamente dos semanas en la segunda temporada y tres semanas en la cuarta respecto de la primera y la tercera, sugiere que puede haber habido diferencias importantes en las temperaturas previas a las fechas de las primeras capturas de machos en vuelo. Sin embargo, este efecto se deshecha puesto que la acumulación de temperaturas de los 30 días previos a la fecha de la primera captura fue de 287 GD, 160 GD y 213 GD para la segunda, tercera y cuarta temporada respectivamente (no se dispone de los registros previos a la captura correspondiente a la primera temporada de muestreo). Por el contrario, un hecho que llama la atención es que las temporadas que acumularon mayor cantidad de GD antes del registro de la primera captura son aquellas en las que se observa el retraso que se menciona precedentemente. Precisamente entre estas temporadas se observa el menor desplazamiento entre curvas respecto del valor central de GD especificado.

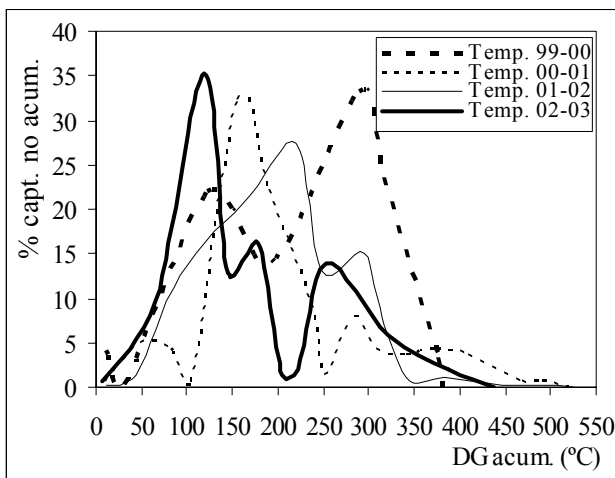


Figura 5.31. Capturas no acumuladas de machos adultos en vuelo vs. GD acumulados.

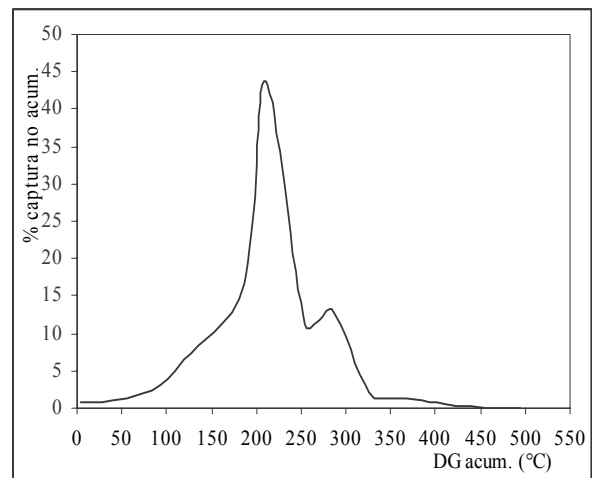


Figura 5.32. Capturas no acumuladas de machos adultos en vuelo vs. GD acumulados en INTA.

Los máximos porcentajes de captura no acumulados resultaron similares entre las temporadas y variaron entre 27% y 35%. Las caídas y luego los ascensos que se observan en las curvas se deben a las condiciones climáticas preponderantes durante los días comprendidos en ese período. Una escasa cantidad de machos capturados en las trampas se corresponde con días de vientos muy fuertes y/o lluvias torrenciales ocurridos entre las fechas de registro de las trampas, explicando de esta manera las oscilaciones más marcadas en las curvas.

A pesar de la naturaleza de los datos de temperaturas disponibles para la segunda plantación monitoreada, se observó que el valor central de GD es prácticamente coincidente en ambos sitios de muestreo (220 GD en la primera plantación y 211 GD en la segunda) con una diferencia de siete días entre ambos registros (Figuras 5.31 y 5.32).

5.2.1.2 Conteo de exuvias

La curva de emergencias de adultos de ambos sexos tendió a ser sigmoidea (Figura 5.33), como se ha obtenido para otras especies como *R. frustrana* (Comstock) (Richmond *et al.* 1983). Las oscilaciones que se aprecian pueden atribuirse a la pérdida de exuvias por el viento, a la dificultad para detectarlas en

ramas muy atacadas o bien a que las fechas de registro no se corresponden necesariamente con las de emergencia de los adultos, pues las exuvias pueden caer en forma inmediata o permanecer en el árbol durante cierto tiempo. Por otro lado, hay que considerar que no emerge el 100% de las pupas debido al parasitismo y a la predación, entre otras causas. Si bien las larvas parasitadas no se consideraron en el cálculo de los porcentajes de emergencia, se destaca que a partir de la captura del primer macho se extrajeron 43 larvas -22 pertenecientes al estadio cinco y 21 al estadio seis- de un total de 1100 brotes disectados. El 67% de estas larvas estaban parasitadas con el braconido *O. obscurator*, por lo que no alcanzarían el estado de pupa (Cuadro 5.15).

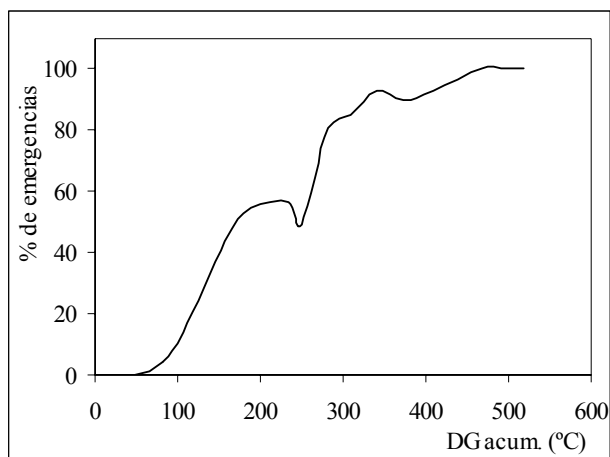


Figura 5.33. Curva de emergencia de adultos de ambos sexos vs. GD acumulados.

Cuadro 5.15. Muestreo de exuvias y porcentaje de emergencia de adultos.

| Fecha | N° larvas | | | N° pupas | | | N° exuvias | % emerg. |
|----------|-----------|-------------|-------|----------|---------|-------|------------|----------|
| | Parasit. | No parasit. | Total | Machos | Hembras | Total | | |
| 17/12/00 | 0 | 8 | 8 | 47 | 37 | 84 | 0 | 0 |
| 21/12/00 | 17 | 5 | 22 | 62 | 59 | 124 | 0 | 0 |
| 25/12/00 | 4 | 0 | 4 | 94 | 81 | 175 | 8 | 4 |
| 29/12/00 | 1 | 1 | 2 | 56 | 53 | 109 | 18 | 14 |
| 02/01/01 | 1 | 0 | 1 | 20 | 29 | 49 | 39 | 44 |
| 04/01/01 | 0 | 0 | 0 | 25 | 15 | 40 | 49 | 55 |
| 08/01/01 | 0 | 0 | 0 | 10 | 21 | 31 | 40 | 56 |
| 11/01/01 | 0 | 0 | 0 | 13 | 22 | 35 | 34 | 49 |
| 15/01/01 | 5 | 0 | 5 | 2 | 3 | 5 | 42 | 81 |
| 18/01/01 | 0 | 0 | 0 | 1 | 8 | 9 | 53 | 85 |
| 22/01/01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 53 | 93 |
| 25/01/01 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 5 | 44 | 90 |
| 29/01/01 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 3 | 51 | 93 |
| 05/02/01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 33 | 100 |
| 08/02/01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 35 | 100 |

Las trampas con feromonas capturaron el primer macho ocho días antes de que fueran detectadas las primeras exuvias en los brotes ratificando así su confiabilidad como método de detección.

5.2.2 Relación entre los estados de desarrollo inmaduros y los GD acumulados

5.2.2.1 Estado de huevo

El período completo de existencia de este estado requirió 436 GD, 577.17 GD, 581.01 GD y 394.27 GD para la primera, segunda, tercera y cuarta temporadas respectivamente (Cuadro 5.16). Las temperaturas medias de cada etapa que comprende el período estimado de presencia del estado de huevo (oviposición e incubación) resultaron similares entre la primera y tercera temporadas, mientras que las diferencias oscilaron entre 1.87 °C y 2.25 °C para las dos restantes y respecto del máximo valor de temperatura media (Cuadro 5.16). Estas diferencias son importantes, pues el período de incubación se extiende un día más en el tiempo por cada grado centígrado menos en la temperatura media del período considerado (Robredo 1978). Estudiando la relación entre la temperatura y los períodos de oviposición e incubación, este autor observó que a 18.5 °C de temperatura media, el período de incubación comprende 12 días.

Diferentes autores precisan un período de incubación que oscila entre 9 y 18 días (De Gryse 1932, Miller y Neisswander 1955 *vide* Robredo 1978, Pointing 1963). A pesar de comprender un intervalo amplio, estos valores concuerdan con la estimación obtenida en este estudio (Cuadro 5.16).

Cuadro 5.16. Período de presencia y GD acumulados para el estado de huevo.

| Período considerado | T° Media (°C) | Duración período incub. (días) | Período de presencia estimado * | GD acum. presencia |
|----------------------|---------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------|
| 8/12/99 al 3/01/00 | 14.90 | 15 | 8/12/99 al 18/01/00 | 436 |
| 22/12/00 al 5/02/01 | 13.27 | 17 | 22/12/00 al 22/02/01 | 577.17 |
| 10/12/01 al 18/01/02 | 14.55 | 15.5 | 10/12/01 al 2/02/02 | 581.01 |
| 3/01/03 al 03/02/03 | 13.03 | 17.5 | 3/01/03 al 20/02/03 | 394.27 |

* Estimado a partir del quinto día de la primera captura y prolongando el número de días de incubación de acuerdo con el período considerado a partir de la fecha anterior al 100% de vuelo.

Los GD acumulados para todo el período de presencia de este estado estimados en base al monitoreo efectuado con las bolsas de malla resultaron 333.1, es decir sensiblemente inferiores respecto de los anteriormente estimados. Sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados empleando este método. En la mayoría de las mismas se hallaron los adultos muertos y se registraron pocos huevos (Cuadro 5.17). En la mayoría de los casos los huevos ya habían eclosionado, por lo que tampoco se pudo estimar el momento real de su presencia. Esto puede explicarse en parte por la imposibilidad de manipular la cantidad y el sexo de las pupas sin extraerlas de los brotes, de forma tal de no comprometer su viabilidad en el campo; tampoco es posible sincronizar la emergencia de los adultos para facilitar la cópula entre los que se encuentran en la misma bolsa. Por tales motivos este

procedimiento sólo se llevó a cabo durante la primera temporada de muestreo y por lo tanto los GD acumulados para el estado de huevo se estimaron en base al período de emergencia de los adultos, tal como se precisó anteriormente.

Cuadro 5.17.. Resumen del recuento de las bolsas de malla por fecha de muestreo.

| Fecha de recolección | Huevos | | Larvas | | Pupas | | Adultos | |
|----------------------|--------|--|--------|-----------------------|-------|-----------|---------|-----------|
| | Nº | Condición | Nº | Estadío | Nº | Condición | Nº | Condición |
| 10/12/99 | ---- | ----- | 15 | 3L5- 12L6 * | 11 | V | 2 | M |
| 17/12/99 | 15 | s/eclosionar | 10 | 6 | 10 | V | 5 | M |
| 26/12/99 | 17 | 2 s/eclos., 15 eclosados | 13 | 4L6-9L1 | 8 | V | 7 | 3V, 4M |
| 3/01/00 | 19 | 3 s/eclos., 3 inviábiles, 13 eclosados | 14 | 11L1, 3L6 parasitadas | 9 | 5V, 4M | 9 | 2V, 7M |
| 10/01/00 | 11 | 3 inviábiles, 8 eclosados | 9 | 7 L1, 2L6 parasitadas | 1 | M | 8 | 3V, 5M |
| 18/01/00 | 5 | 3 eclosados, 2 s/ eclosar | ---- | ----- | 5 | M | 9 | M |
| 26/01/00 | 12 | 3 inviábiles, 9 eclosados | 9 | 5L2, 4 L3 | 2 | M | 13 | M |
| 3/02/00 | 20 | eclosados | 16 | 2L1,5L2, 9L3 | ---- | ----- | 10 | M |
| 9/02/00 | 7 | eclosados | 12 | 3L2, 9L3 | 1 | M | 9 | ----- |

* Las larvas L5 y L6 corresponden a la temporada anterior 1998- 1999. M: muerto; V: vivo

5.2.2.2 Estado de larva

5.2.2.2.1 Estadío larval L1

El primer registro de L1 para la primera temporada (T1) corresponde al 04/01 y el último al 10/02, para la segunda temporada (T2) la primera larva se registró el 20/01 y la última el 08/03, y para la temporada restante (T3) el período se halla entre 08/01 al 13/02. La temperatura umbral inferior estimada para este estadío es 7.2 °C, que es el umbral estándar seleccionado que arrojó el menor coeficiente de variación (Cuadro 5.18).

Cuadro 5.18. Selección de la temperatura umbral inferior para el primer estadio larval.

| T° umbral | GD acumulados en: | | | Media | CV |
|-----------|-------------------|---------|--------|--------|-------------|
| | 2000 | 2001 | 2002 | | |
| -8.2 | 848.3 | 1023.85 | 865.85 | 912.67 | 10.59 |
| -7.2 | 810.3 | 975.85 | 828.85 | 871.67 | 10.41 |
| -6.2 | 772.3 | 927.85 | 791.85 | 830.67 | 10.2 |
| -5.2 | 734.3 | 879.85 | 754.85 | 789.67 | 9.98 |
| -4.2 | 696.3 | 831.85 | 717.85 | 748.67 | 9.73 |
| -3.2 | 658.3 | 783.85 | 680.85 | 707.67 | 9.46 |
| -2.2 | 620.3 | 735.85 | 643.85 | 666.67 | 9.16 |
| -1.2 | 582.3 | 687.85 | 606.85 | 625.67 | 8.83 |
| 0 | 536.7 | 630.3 | 562.47 | 576.49 | 8.39 |
| 1.2 | 491.15 | 572.91 | 518.19 | 527.42 | 7.9 |
| 2.2 | 453.43 | 525.34 | 481.44 | 486.74 | 7.45 |
| 3.2 | 416.07 | 478.17 | 445.01 | 446.42 | 6.96 |
| 4.2 | 379.24 | 431.75 | 409.02 | 406.67 | 6.46 |
| 5.2 | 343.08 | 386.26 | 373.62 | 367.65 | 6.04 |
| 6.2 | 307.72 | 342.05 | 338.91 | 329.56 | 5.76 |
| 7.2 | 273.45 | 299.33 | 304.97 | 292.58 | 5.74 |
| 8.2 | 240.4 | 258.53 | 271.9 | 256.94 | 5.84 |
| 9.2 | 208.75 | 220.14 | 240.03 | 222.97 | 7.1 |
| 10.2 | 178.76 | 184.65 | 209.72 | 191.04 | 8.61 |

Los GD acumulados para el período de presencia de L1 resultaron muy semejantes entre las temporadas monitoreadas: 273.45, 299.33 y 304.97 GD (Cuadro 5.18) puesto que considerando los GD diarios promedio para este período la diferencia máxima es de cuatro días calendario (entre T1 y T3) mientras que la diferencia mínima es de un día calendario (entre T2 y T3). A pesar de esta similitud la duración de este período en número de días resultó sensiblemente mayor para la segunda temporada - 47 días-. Esta extensión del período en el tiempo se corresponde con la temperatura mensual promedio y los GD diarios promedio calculados para el mismo, que resultaron sensiblemente inferiores a las otras dos temporadas (Cuadro 5.19).

Cuadro 5.19. Temperaturas mensuales promedio y GD diario promedio para el período de L1.

| Mes | Temporada 2000 | | Temporada 2001 | | Temporada 2002 | |
|------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | T° mensual promedio | GD diario promedio | T° mensual promedio | GD diario promedio | T° mensual promedio | GD diario promedio |
| Enero | 14.49 | 7.58 | 12.91 | 6.03 | 15.14 | 8.14 |
| Febrero | 14.27 | 6.13 | 13.62 | 6.67 | 15.31 | 8.43 |
| Marzo | ----- | ----- | 11.74 | 5.04 | ----- | ----- |
| Período L1 | 14.38 | 7.20 | 12.75 | 6.24 | 15.22 | 8.24 |

De la misma forma, los GD acumulados desde la primera captura de machos hasta el primer registro de L1 en terreno también resultaron muy similares entre temporadas: 256.75 GD, 255.41 GD y 236.01 GD. Si se consideran los GD diarios promedio para el período (comprendido entre la primera captura y el primer registro de L1) las diferencias indican nuevamente un retraso entre dos días y medio y tres, que prácticamente es desechable.

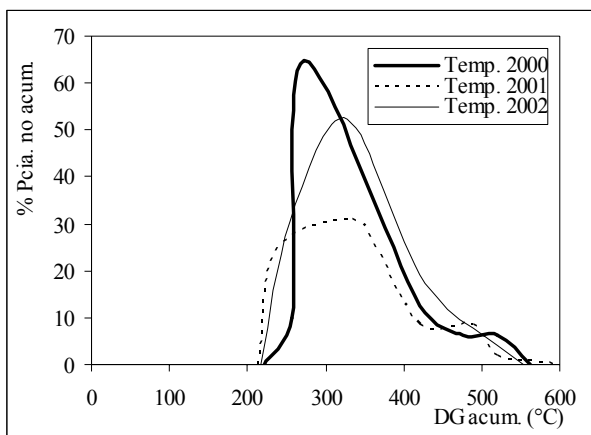


Figura 5.34. Presencia no acumulada de L1 respecto de sí mismo vs. GD acumulados.

Las curvas de presencia no acumulada -respecto del total de L1- muestran una mayor concentración de valores de porcentajes de presencia en torno a un valor central de GD. Sin embargo, este valor central de GD no es coincidente para las tres temporadas sino que hay un ligero desplazamiento de las curvas. La variación entre temporadas en GD acumulados para el máximo porcentaje de presencia no acumulada osciló entre 90 GD y 56 GD (Figura 5.34).

El mayor porcentaje de presencia alcanzó 65% durante la primera temporada (271.25 GD) mientras que resultó muy inferior durante las dos restantes (31% -361 GD- y 52% -327.34 GD- respectivamente).

A pesar de estas similitudes en la relación temperatura- fenología de L1 entre los tres períodos de muestreo cabe destacar que para la fecha correspondiente al primer registro los porcentajes de presencia -en función de los restantes estadios- oscilaron entre 52% y 70% para las dos últimas temporadas, los que estarían indicando que esta detección en terreno no coincide con la primera aparición real de las larvas. Por el contrario, existe un período de tiempo en el que las larvas no están siendo registradas precisamente por la aparición tardía de la sintomatología correspondiente a esta fase de alimentación larval.

Esta detección tardía de la sintomatología asociada se relaciona con la dificultad para visualizar las larvas tan pequeñas que en esta etapa se ubican en la vaina del braquiblasto, sitio donde se alimentan (Foto 5.8). El síntoma de esta forma de alimentación recién puede detectarse entre los 7-10 días posteriores al ataque, cuando comienzan a decolorarse las acículas comprometidas



Foto 5.8. Fase de alimentación de las acículas en la vaina del braquiblasto. 65x

Luego del primer registro de L1 (respecto de la presencia de los restantes estadios en el tiempo) que como se mencionó precedentemente coincide en general con la máxima presencia, se observa un desplazamiento entre las curvas que oscila entre 50 y 100 GD -comprendidos entre 10% y 50% del porcentaje de presencia del estadio en la porción descendente de la curva (Figura 5.35)-.

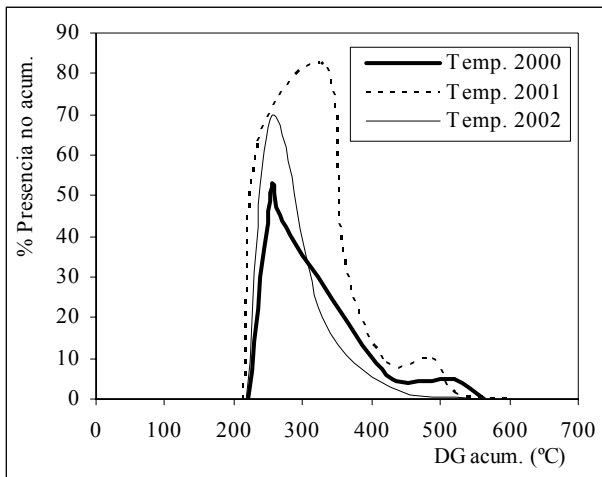


Figura 5.35. Presencia no acumulada de L1 respecto de los restantes estadios vs. GD.

5.2.2.2.2 Estadio larval L2

El primer registro de L2 para la primera temporada corresponde al 04/01 y el último al 10/04. Para la segunda temporada la primera larva se registró el 20/01 y la última el 06/05, y para la temporada restante el período se halla entre 08/01 y 16/04. La temperatura umbral inferior estimada para este estadio es 3.2 °C, que es el umbral estándar seleccionado que arrojó el menor coeficiente de variación (Cuadro 5.20).

Cuadro 5.20. Selección de la temperatura umbral inferior para el estadio L2.

| T° umbral | GD acumulados en: | | | Media | CV |
|-----------|-------------------|---------|---------|---------|-------------|
| | 2000 | 2001 * | 2002 | | |
| -7.2 | 1986.65 | 1822.62 | 2225.5 | 2106.08 | 8.02 |
| -6.2 | 1889.65 | 1715.79 | 2104.5 | 1997.08 | 7.61 |
| -5.2 | 1792.65 | 1609.26 | 1983.56 | 1888.11 | 7.15 |
| -4.2 | 1695.65 | 1503.3 | 1862.73 | 1779.19 | 6.64 |
| -3.2 | 1598.65 | 1398.14 | 1742.05 | 1670.35 | 6.07 |
| -2.2 | 1501.66 | 1294.08 | 1621.71 | 1561.69 | 5.44 |
| -1.2 | 1404.79 | 1191.3 | 1501.91 | 1453.35 | 4.73 |
| 0 | 1288.96 | 1070.14 | 1359.18 | 1324.07 | 3.75 |
| 1.2 | 1173.87 | 952.06 | 1214.97 | 1194.42 | 2.43 |
| 2.2 | 1079.01 | 856.84 | 1101.23 | 1090.12 | 1.44 |
| 3.2 | 985.5 | 754.73 | 990.77 | 988.14 | 0.38 |
| 4.2 | 893.76 | 676.32 | 884.46 | 889.11 | 0.74 |
| 5.2 | 804.24 | 592.06 | 783.11 | 793.68 | 1.88 |
| 6.2 | 717.34 | 512.6 | 687.41 | 702.38 | 3.01 |
| 7.2 | 633.82 | 438.3 | 597.99 | 615.91 | 4.11 |

* Los datos de este año se excluyeron para el cálculo de la media y del CV.

Los GD acumulados para el período de presencia de L2 resultaron muy semejantes entre 2000 y 2002: 985.5 y 990.77 GD, mientras en 2001 descendieron a 754.73 GD. Considerando los GD diarios promedio para este período la diferencia máxima es de treinta y dos días calendario (entre T1 y T2) mientras que la diferencia mínima es de medio día (entre T1 y T3). De la misma manera, la extensión en

número de días calendario resultó similar entre T1 y T3 (97 y 96 días) mientras que fue sensiblemente mayor para la segunda temporada (106 días). Esta extensión del período en el tiempo se corresponde con la temperatura mensual promedio y los GD diarios promedio calculados para el mismo, que resultaron inferiores a las otras dos temporadas (Cuadro 5.21). La pequeña diferencia que se observa en la temperatura media mensual y los GD diarios promedio para el período L2 correspondiente a T1 y T3 puede deberse al carácter quincenal del muestreo que podría estar adicionando o restando días y grados de temperatura en el período entre fechas de muestreo, sin ajustarse precisamente al momento del último registro de L2.

Cuadro 5.21. Temperaturas mensuales promedio y GD diario promedio para el período de L2.

| Mes | Temporada 2000 | | Temporada 2001 | | Temporada 2002 | |
|------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | T° mensual promedio | GD diario promedio | T° mensual promedio | GD diario promedio | T° mensual promedio | GD diario promedio |
| Enero | 14.80 | 11.31 | 13.40 | 9.73 | 14.53 | 11.96 |
| Febrero | 14.27 | 11.09 | 13.62 | 10.45 | 14.74 | 11.67 |
| Marzo | 12.39 | 9.30 | 9.01 | 5.54 | 9.28 | 6.29 |
| Abril | 9.90 | 6.99 | 7.16 | 4.82 | 8.35 | 4.39 |
| Mayo | ----- | ----- | 3.64 | 2.40 | ----- | ----- |
| Período L2 | 12.84 | 10.16 | 9.36 | 7.15 | 11.72 | 9.09 |

No obstante la mayor similitud entre T1 y T3, la predicción del primer registro o aparición de L2 en terreno utilizando los GD acumulados calculados a partir de la primera captura de machos resultó muy semejante para las tres temporadas: 382.66 GD, 366.76 GD y 383.82 GD. Si se consideran los GD diarios promedio para el período (comprendido entre la primera captura y el primer registro de L2) la diferencia máxima en días calendario es nuevamente de dos días entre temporadas.

En las curvas de presencia no acumulada en el tiempo de L2 respecto de sí mismo, se observa claramente que los valores de máxima presencia que oscilan entre 24% y 52% para las tres temporadas también se disponen en torno a un valor central de GD que difiere entre 6 y 59 GD (Figura 5.36). Tales valores son concretamente 626.75 GD, 574.2 GD y 632.9 GD para T1, T2 y T3 respectivamente.

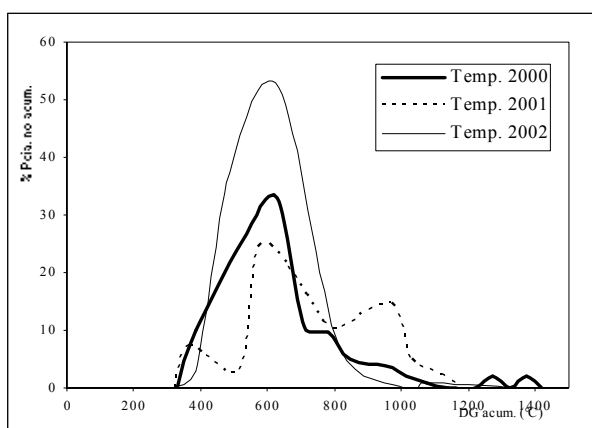


Figura 5.36. Presencia no acumulada de L2 respecto de sí mismo vs. GD acumulados.

No obstante, en las curvas de capturas no acumuladas se observa que los valores de máxima presencia de L2 respecto de los restantes estadios (que oscilan entre 51% y 65% para las tres temporadas) se disponen en torno a un valor central de GD que difiere entre 53 y 138 GD, mientras que para los porcentajes que varían entre 40% y 25% las curvas prácticamente se superponen en la porción descendente (Figura 5.37). Asimismo se observan oscilaciones en los valores de porcentajes más bajos cercanos a 2-3%, que pueden deberse al submuestreo entre fechas sucesivas.

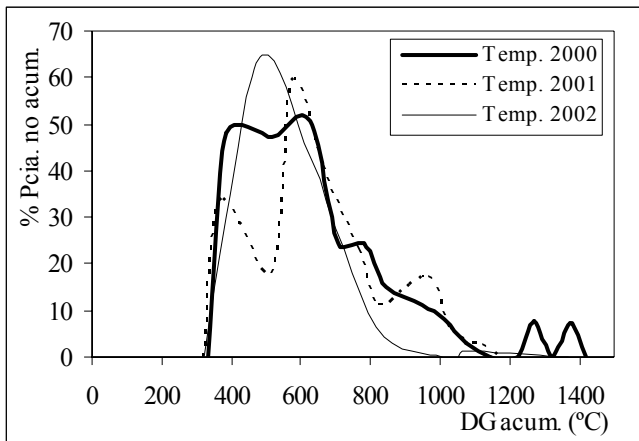


Figura 5.37. Presencia no acumulada de L2 respecto de los restantes estadios vs. GD acumulados.

5.2.2.2.3 Estadio larval L3

El primer registro de L3 para T1 corresponde al 18/01 y el último al 09/10, para T2 el período de presencia se extiende entre el 20/01 y 10/10, y para T3 entre el 18/01 y 24/10. La temperatura umbral inferior estimada para este estadio resultó 3.2 °C (Cuadro 5.22).

Cuadro 5.22. Selección de la temperatura umbral inferior para L3.

| T° umbral | GD acumulados en: | | | Media | CV |
|-----------|-------------------|---------|---------|---------|-------------|
| | 2000* | 2001 | 2002 | | |
| -7.2 | 4059.76 | 3487.98 | 3624.48 | 3556.23 | 2.71 |
| -6.2 | 3795.7 | 3230.74 | 3349.51 | 3290.13 | 2.55 |
| -5.2 | 3532.35 | 2975.88 | 3077.38 | 3026.63 | 2.37 |
| -4.2 | 3270.31 | 2724.58 | 2809.26 | 2766.92 | 2.16 |
| -3.2 | 3010.34 | 2477.94 | 2546.43 | 2512.19 | 1.93 |
| -2.2 | 2753.29 | 2237.11 | 2290.54 | 2263.83 | 1.67 |
| -1.2 | 2500.36 | 2003.56 | 2043.43 | 2023.5 | 1.39 |
| 0 | 2205.03 | 1736.7 | 1762.17 | 1749.44 | 1.03 |
| 1.2 | 1920.42 | 1487.36 | 1498.28 | 1492.82 | 0.52 |
| 2.2 | 1694.37 | 1294.79 | 1300.95 | 1297.87 | 0.34 |
| 3.2 | 1480.73 | 1117.18 | 1121.3 | 1119.24 | 0.26 |
| 4.2 | 1281.46 | 954.57 | 959.5 | 957.04 | 0.36 |
| 5.2 | 1099.12 | 807.52 | 815.51 | 811.52 | 0.7 |
| 6.2 | 933.93 | 676.17 | 688.57 | 682.37 | 1.28 |
| 7.2 | 786.15 | 559.82 | 577.87 | 568.85 | 2.24 |

* Los datos de este año se excluyeron para el cálculo de la media y del CV.

Los GD acumulados para el período de presencia de L3 resultaron muy semejantes entre 2001 y 2002: 1121.3 y 1117.18 GD mientras en 2000 ascendieron a 1480.73 GD. La extensión en número de días calendario resultó similar entre T1 y T2 (265 y 263 días) a pesar de las diferencias registradas en las temperaturas medias mensuales y los GD diarios promedio (Cuadro 5.23); mientras que fue sensiblemente mayor para la tercera temporada (279 días). En este último caso, la mayor duración del período podría estar relacionada con las temperaturas más bajas que se produjeron especialmente a partir del mes de junio en que las medias mensuales y los GD diarios promedios calculados para el período de presencia de L3 resultaron inferiores (Cuadro 5.23). Sin embargo los GD acumulados a partir del mes de junio y hasta el final del registro del estadio resultaron 376 GD, 303 GD y 217.5 GD para cada período de muestreo.

Cuadro 5.23. Temperaturas mensuales promedio y GD diario promedio para el período de L3.

| Mes | Temporada 2000 | | Temporada 2001 | | Temporada 2002 | |
|------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | T° mensual promedio | GD diario promedio | T° mensual promedio | GD diario promedio | T° mensual promedio | GD diario promedio |
| Enero | 15.44 | 12.26 | 12.91 | 9.73 | 15.71 | 12.52 |
| Febrero | 14.27 | 11.08 | 13.62 | 10.45 | 14.74 | 11.67 |
| Marzo | 12.39 | 9.3 | 8.99 | 6.3 | 9.28 | 6.29 |
| Abril | 9.95 | 7.08 | 7.16 | 4.82 | 7.16 | 4.39 |
| Mayo | 6.35 | 3.86 | 3.87 | 2.06 | 4.14 | 2.47 |
| Junio | 4.82 | 2.5 | 1.53 | 0.93 | -0.67 | 0.32 |
| Julio | 2.43 | 1.59 | -1.8 | 0.24 | 1.84 | 1.36 |
| Agosto | 5.83 | 3.22 | 4.66 | 2.66 | 1.95 | 1.07 |
| Septiembre | 5.92 | 3.39 | 6.31 | 3.98 | 4.02 | 2.15 |
| Octubre | 8.39 | 5.58 | 9.28 | 5.28 | 5.15 | 2.84 |
| Período L3 | 8.58 | 5.76 | 6.65 | 4.64 | 6.33 | 4.51 |

A diferencia de los dos estadios de desarrollo anteriores, los GD acumulados desde la primera captura de machos hasta el primer registro de L3 en terreno resultaron semejantes entre T1 y T3: 519.93 y 488.85 GD respectivamente, lo cual contabiliza una diferencia de 2.5 días calendario considerando los GD diarios promedio. Durante la temporada 2000- 2001 (T2) se acumularon solamente 357.42 GD; esta diferencia que puede deberse a que las temperaturas medias mensuales y por ende los GD diarios promedio durante el período resultaron 1 °C por debajo de las otras temporadas.

El gráfico de presencia no acumulada de L3 en el tiempo (Figura 5.38) muestra variaciones continuas a lo largo del período de presencia sin que destaque claramente un valor central de GD para el máximo porcentaje obtenido, tal como se visualizó en las figuras 5.34 y 5.36. Los valores de máxima presencia de L3 resultaron extremadamente bajos oscilando entre 4.5% y 14%. El desplazamiento entre curvas para estos valores es muy pronunciado.

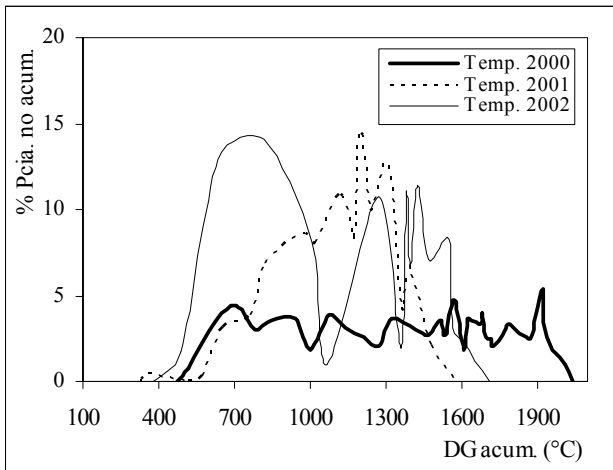


Figura 5.38. Presencia no acumulada de L3 respecto de sí mismo vs. GD acumulados.

Las curvas de presencia no acumulada en relación con los restantes estadios larvales para cada momento de muestreo (Figura 5.39), muestran para T1 oscilaciones en torno a valores altos de porcentaje comprendidos entre 50% y 90%. Si bien en esta temporada se registró un máximo valor de presencia, éste no destaca claramente como valor central alrededor del cuál se ubiquen los restantes valores. Para las restantes temporadas, las oscilaciones observadas permiten igualmente destacar un valor central de GD (92% y 82% respectivamente) a pesar que estas variaciones ocurren próximas a los valores máximos obtenidos de porcentaje. Los GD calculados para cada valor de máxima presencia resultaron: 1321.68, 1245 y 1008.47 para cada período. Las oscilaciones continuas en los valores de porcentaje podrían deberse a la extensa duración del período de presencia en relación con el muestreo entre fechas sucesivas.

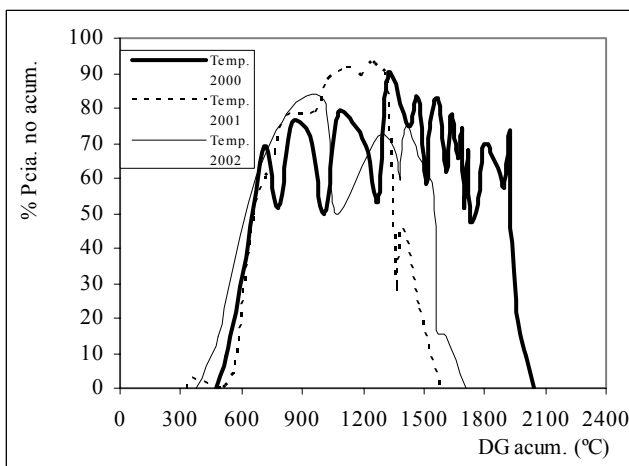


Figura 5.39. Presencia no acumulada de L3 respecto de los restantes estadios vs. GD acumulados.

5.2.2.2.4 Estadio larval L4

El primer registro de L4 para T1 corresponde al 10/02 y el último al 13/11, para T2 el período de presencia se extiende entre el 08/03 y 7/11 y para T3 entre el 13/02 y 11/11. El menor CV se obtuvo

para 1.2 °C; valores semejantes del CV se obtuvieron para 2.2 °C y 3.2 °C, en tanto la diferencia fue sólo 0.12 (Cuadro 5.24). Se adoptó el valor umbral de 3.2 °C considerando que también se estimó para L3 y que es razonable suponer que a medida que progresa el desarrollo durante la primavera- verano el umbral de temperatura se mantiene igual al estadio anterior o bien se incrementa, sumado a que además la menor diferencia en GD acumulados entre las temporadas consideradas (2001- 2002) para los valores de umbrales estándares corresponde a 3.2°C.

Cuadro 5.24. Selección de la temperatura umbral inferior para el cuarto estadio larval.

| T° umbral | GD acumulados en: | | | Media | CV |
|-----------|-------------------|---------|---------|---------|-------------|
| | 2000 * | 2001 | 2002 | | |
| -6.2 | 3915.65 | 2733.19 | 3038.86 | 2886.03 | 7.49 |
| -5.2 | 3640.3 | 2497.34 | 2774.73 | 2636.04 | 7.44 |
| -4.2 | 3366.26 | 2265.11 | 2514.67 | 2389.89 | 7.38 |
| -3.2 | 3068.05 | 1979.96 | 2201.24 | 2090.60 | 7.48 |
| -2.2 | 2825.25 | 1816.33 | 2012.64 | 1914.49 | 7.25 |
| -1.2 | 2560.42 | 1602.8 | 1774.28 | 1688.54 | 7.18 |
| 0 | 2244.83 | 1361.11 | 1503.89 | 1432.50 | 7.05 |
| 1.2 | 1948.36 | 1137.12 | 1251.37 | 1194.25 | 6.76 |
| 2.2 | 1712.99 | 965.33 | 1064.02 | 1014.68 | 6.88 |
| 3.2 | 1490.83 | 811.87 | 894.85 | 853.36 | 6.88 |
| 4.2 | 1283.98 | 672.76 | 743.54 | 708.15 | 7.07 |
| 5.2 | 1095.06 | 549.87 | 612.04 | 580.96 | 7.57 |
| 6.2 | 924.46 | 443.02 | 497.68 | 470.35 | 8.22 |

* Los datos de este año se excluyeron para el cálculo de la media y del CV.

Los GD acumulados para el período de presencia de L4 resultaron similares entre 2001 y 2002: 811.87 y 894.85 GD mientras que, al igual que para L3, en 2000 ascendieron notablemente a 1490.83 GD. Esta diferencia tan importante entre T2 y T3 respecto de T1 se mantuvo para todos los umbrales estándar considerados dado que la misma se extendió 277 días y que durante todo el período de presencia de L4 durante la temporada 2000, la temperatura mensual promedio resultó 2.8 - 2.6 °C por encima de las restantes. De la misma manera los GD diarios promedio resultaron superiores en valores que oscilaron entre 2 y 1.7 (Cuadro 5.25). Para la segunda y tercera temporadas la duración en días calendario fue de 244 y 271 respectivamente. Esta mayor duración del período resulta llamativa dadas las temperaturas medias mensuales y los GD diarios promedios calculados para el período de presencia de L4 (Cuadro 5.25). Tal como se mencionó para los estadios anteriores el carácter quincenal del muestreo pudo influir en este desfasaje de tiempos y por lo tanto en las unidades de calor acumuladas durante el período.

Cuadro 5.25. Temperaturas mensuales promedio y GD diario promedio para el período de L4.

| Mes | Temporada 2000 | | Temporada 2001 | | Temporada 2002 | |
|------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | T° mensual promedio | GD diario promedio | T° mensual promedio | GD diario promedio | T° mensual promedio | GD diario promedio |
| Febrero | 14.27 | 11.63 | ----- | ----- | 14.74 | 10.96 |
| Marzo | 12.39 | 9.3 | 8.99 | 5.85 | 9.28 | 6.29 |
| Abril | 9.95 | 7.08 | 7.16 | 4.82 | 7.16 | 4.39 |
| Mayo | 6.35 | 3.86 | 3.87 | 2.06 | 4.14 | 2.47 |
| Junio | 4.82 | 2.5 | 1.53 | 0.93 | -0.67 | 0.32 |
| Julio | 2.43 | 1.59 | -1.8 | 0.24 | 1.84 | 1.36 |
| Agosto | 5.83 | 3.22 | 4.66 | 2.66 | 1.95 | 1.07 |
| Septiembre | 5.92 | 3.39 | 6.31 | 3.98 | 4.02 | 2.15 |
| Octubre | 8.39 | 5.58 | 9.28 | 5.28 | 5.15 | 2.84 |
| Noviembre | 11.74 | 6.6 | 8.97 | 5.26 | 8.69 | 6.05 |
| Período L4 | 8.21 | 5.47 | 5.43 | 3.45 | 5.63 | 3.79 |

Sin embargo, a pesar de las diferencias existentes entre la primera temporada respecto de las restantes, la predicción de la aparición de L4 desde la primera captura de machos resultó similar para las tres temporadas monitoreadas: 790.77, 835.6 y 822.18 GD respectivamente. En las curvas de presencia no acumulada de L4 en el tiempo se observa -igual que para L3- que durante la primera temporada los valores de porcentaje de presencia son extremadamente bajos alcanzando el máximo de 12% hacia el final del período. Para las otras temporadas los valores máximos alcanzaron 34% y 78%; sin embargo los GD respectivos de estos porcentajes no fueron coincidentes. La diferencia en GD acumulados en torno al valor central es importante y resultó de 247 GD (Figura 5.40).

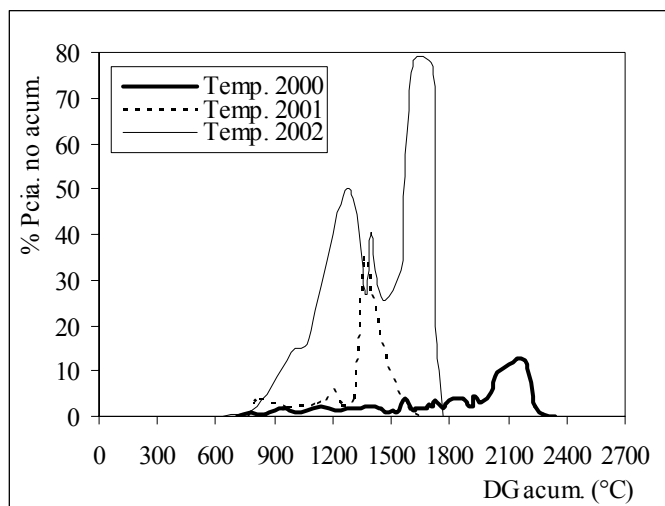


Figura 5.40. Presencia no acumulada de L4 respecto de sí mismo vs. GD acumulados.

En las curvas de presencia no acumulada en el tiempo respecto de los restantes estadios, se observan variaciones importantes y constantes en los valores de porcentaje correspondientes al primer período de muestreo, hasta alcanzar el valor máximo cercano a 81% que es similar para T3 -mientras que para T2 este valor resultó 61.5%-. Los GD respectivos de estos porcentajes no fueron coincidentes en las tres temporadas estudiadas, pues se observa un desplazamiento importante entre las curvas que osciló entre 200 y 677 GD. Al igual que para L3, durante la primera temporada los porcentajes registrados resultaron ser más variables hasta alcanzar el valor máximo (Figura 5.41).

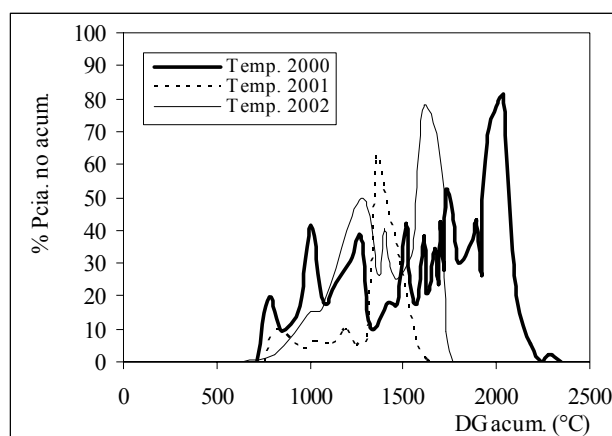


Figura 5.41. Presencia no acumulada de L4 respecto de los restantes estadios vs. GD acumulados.

5.2.2.2.5 Estadio larval L5

El primer registro de L5 para T1 corresponde al 02/10 y el último al 25/12, para T2 el período de presencia se extiende entre el 22/09 y 26/12, y para T3 entre el 03/10 y 20/01. Al igual que para los estadios anteriores (L3 y L4) el menor CV se obtuvo para 3.2°C (Cuadro 5.26). Cabe destacar que en la primera y en la última temporadas el primer registro de L5 se realizó excepcionalmente en momentos muy tempranos (19 de junio y 19 de julio respectivamente), habiéndose registrado solamente un ejemplar de L5 en cada fecha de muestreo. Dado que estas fechas son extremas e involucraron una proporción muy baja de organismos no fueron incluidas formalmente como parte de la duración del período de presencia de este estadio.

Cuadro 5.26. Selección de la temperatura umbral inferior para el quinto estadio larval.

| T° umbral | GD acumulados en: | | | Media | CV |
|-----------|-------------------|---------|---------|---------|-------------|
| | 2000 | 2001 | 2002 | | |
| -6.2 | 1559.95 | 1571.15 | 1730.15 | 1620.42 | 5.87 |
| -5.2 | 1474.95 | 1475.16 | 1620.19 | 1523.43 | 5.50 |
| -4.2 | 1389.95 | 1379.26 | 1510.4 | 1426.54 | 5.10 |
| -3.2 | 1304.95 | 1283.59 | 1400.95 | 1329.83 | 4.70 |
| -2.2 | 1219.97 | 1188.45 | 1292.09 | 1233.50 | 4.31 |
| -1.2 | 1135.07 | 1094.18 | 1183.99 | 1137.75 | 3.95 |
| 0 | 1027.58 | 982.63 | 1055.82 | 1022.01 | 3.61 |
| 1.2 | 928.04 | 873.38 | 930.75 | 910.72 | 3.55 |
| 2.2 | 838.24 | 796.67 | 830.06 | 821.66 | 3.89 |
| 3.2 | 750.84 | 720.75 | 733.10 | 734.90 | 2.06 |
| 4.2 | 680.46 | 636.23 | 640.57 | 652.42 | 3.74 |
| 5.2 | 604.69 | 557.96 | 557.54 | 573.40 | 4.73 |
| 6.2 | 532.18 | 484.46 | 477.93 | 488.19 | 5.94 |

Los GD acumulados para el período de presencia de L5 resultaron similares para las tres temporadas (Cuadro 5.26). La duración en días resultó 84, 95 y 116 para las temporadas 2000, 2001 y 2002 respectivamente. Las diferencias en la extensión del período se corresponden con las temperaturas mensuales promedio y los GD diarios pertinentes (Cuadro 5.27), los que descendieron desde T1 hacia

T3. En lo que respecta a T3, esta apreciación es válida si se ignoran los datos correspondientes al mes de enero, momento a partir del cual se produce un incremento importante de la temperatura respecto de los meses anteriores.

En este sentido el mes de enero también podría considerarse una fecha extrema para contabilizar la presencia de L5, puesto que se estaría produciendo un alto grado de solapamiento entre los estadios larvales más jóvenes y los maduros. A pesar que durante T3 ocurre una situación especial que viene dada por el retraso observado en el ciclo biológico -principalmente en lo que respecta a la emergencia de los adultos ocurrida a fines de diciembre- las disecciones comprobaron que todas las larvas vivas de L5 encontradas en esta época del año estaban parasitadas por *O. obscurator*, circunstancia que ratifica la acción del parásito retrasando y posteriormente interrumpiendo el desarrollo del insecto.

Cuadro 5.27. Temperaturas mensuales promedio y GD diario promedio para el período de L5.

| Mes | Temporada 2000 | | Temporada 2001 | | Temporada 2002 | |
|------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | T° mensual promedio | GD diario promedio | T° mensual promedio | GD diario promedio | T° mensual promedio | GD diario promedio |
| Septiembre | ----- | ----- | 6.31 | 3.98 | ----- | ----- |
| Octubre | 8.39 | 7.71 | 9.28 | 5.28 | 5.15 | 2.84 |
| Noviembre | 11.74 | 8.4 | 8.97 | 6.11 | 8.69 | 5.75 |
| Diciembre | 14.4 | 11.31 | 14.1 | 10.79 | 11.59 | 8.49 |
| Enero | ----- | ----- | ----- | ----- | 12.87 | 10.16 |
| Período L5 | 11.51 | 9.14 | 9.66 | 6.54 | 9.57 | 6.81 |

A pesar de la similitud en cuanto a las temperaturas acumuladas para todo el período de presencia de L5, la predicción de su aparición a partir de la primera captura de machos resultó ser muy variable: 1968.05 GD, 1367.26 GD y 1553.47 GD para las temporadas 2000, 2001 y 2002 respectivamente.

El valor máximo de porcentaje de presencia no acumulada resultó bajo y estuvo comprendido entre 21% y 27% mostrando un marcado desplazamiento entre las curvas respecto del valor central de GD que osciló entre 2105 GD y 1475 GD. De esta manera la diferencia entre temporadas respecto de esta variable estuvo comprendida entre 295 GD y 635 GD (Figura 5.42).

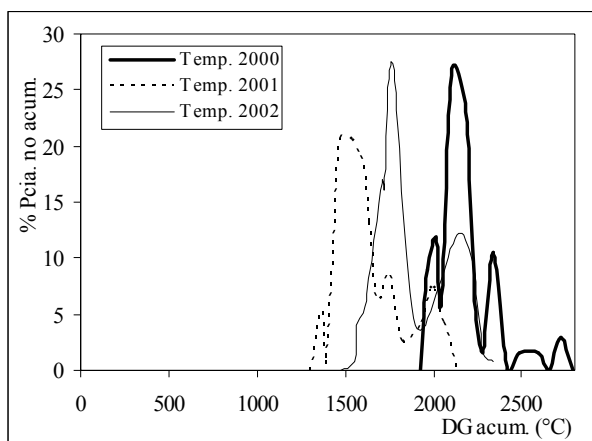


Figura 5.42. Presencia no acumulada de L5 respecto de sí mismo vs. GD acumulados.

En el caso de la presencia en función de la existencia de los restantes estadios el máximo porcentaje estuvo comprendido entre 44% y 52% para T1-T2 y T3 respectivamente. Las fluctuaciones continúan caracterizando a las curvas. Asimismo es notorio el desplazamiento entre curvas para los valores máximos de porcentaje respecto de los GD acumulados que osciló entre 236 GD y 700 GD (Figura 5.43).

En la figura 5.43 se hace más evidente la sobreestimación del cálculo de los porcentajes de presencia no acumulada de los estadios larvales respecto de los restantes estadios. El segundo pico de máxima presencia que se aprecia en las curvas de las dos primeras temporadas se relaciona con una muy escasa cantidad de larvas comprendidas entre los dos últimos estadios y un predominio de pupas que no están incluidas en los cálculos de porcentaje.

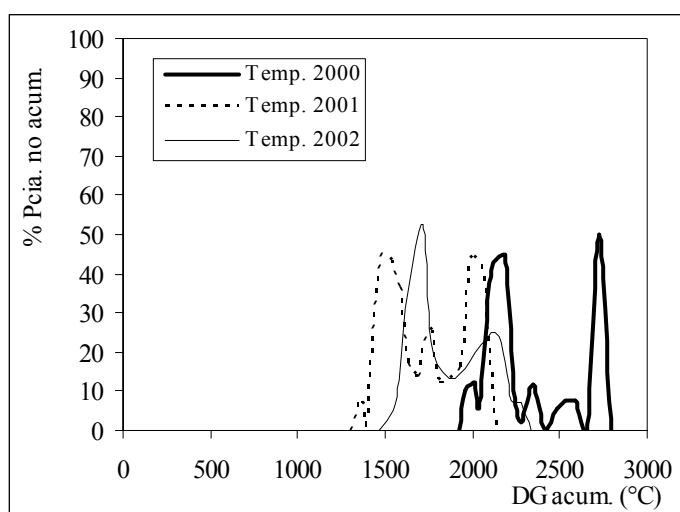


Figura 5.43. Presencia no acumulada de L5 respecto de los restantes estadios vs. GD acumulados.

5.2.2.2.6 Estadío larval L6

El período de presencia de este estadio se extendió entre el 16/10 y el 25/12 para T1, entre el 10/10 y el 15/12 para T2, y por último entre el 24/10 y 27/01 para T3. El último registro de este estadio resultó muy difícil de establecer debido al grado de parasitismo de *O. obscurator* que se incrementó con las temporadas sucesivas alcanzando niveles muy importantes. Tal como se destacó en el cuadro 5.11 el grado de parasitismo se incrementó 21% entre T1 y T2, y 30% entre T2 y T3.

Este parasitoide, que abandona las larvas de la mariposa del brote cuando éstas alcanzan el sexto estadio, retrasa el desarrollo de las mismas y prolonga su ocurrencia en el tiempo. De esta forma se dificulta determinar con cierta precisión el momento de muestreo que registre la última larva no parasitada, dado que se requiere procesar una gran cantidad de brotes para contar con un número significativo de larvas no parasitadas. Se estaría incurriendo en un error si se tomara como último registro la fecha correspondiente a la última detección en terreno puesto que todas las larvas L6 estaban parasitadas. Hacia el final del período larval especialmente durante el predominio de L6 y cuando está presente aproximadamente 50% de las pupas, todas las larvas encontradas en los brotes están parasitadas. En esta instancia es importante aclarar que para la estimación de la fecha del último registro de los estadios larvales previos se consideraron solamente las últimas larvas no parasitadas.

En este contexto, la estimación de la temperatura umbral inferior para el sexto estadio conlleva cierto grado de imprecisión puesto que tiene incorporada más fuertemente la influencia del parasitismo en la duración del desarrollo. Por tales motivos se excluyó la última temporada para realizar esta estimación.

El umbral estándar que arrojó el menor coeficiente de variación resultó sumamente bajo en relación con los valores obtenidos para los estadios anteriores (Cuadro 5.28). De esta forma y debido a las dificultades mencionadas se adoptó la misma temperatura umbral inferior -3.2°C - calculada para los estadios previos.

Cuadro 5.28. Selección de la temperatura umbral inferior para el sexto estadio larval.

| T° umbral | GD acumulados en: | | Media | CV |
|-----------|-------------------|---------|---------|--------------|
| | 2000 | 2001 | | |
| -6.2 | 1364.35 | 1072.9 | 1218.63 | 16.91 |
| -5.2 | 1293.35 | 1005.91 | 1149.63 | 17.68 |
| -4.2 | 1222.35 | 939 | 1080.68 | 18.64 |
| -3.2 | 1151.35 | 872.34 | 1011.85 | 19.50 |
| -2.2 | 1080.35 | 806.18 | 943.27 | 20.55 |
| -1.2 | 1009.39 | 740.79 | 875.09 | 21.70 |
| 0 | 918.49 | 663.65 | 791.07 | 22.78 |
| 1.2 | 835.05 | 588.43 | 711.74 | 24.50 |
| 2.2 | 766.02 | 527.66 | 646.84 | 26.06 |
| 3.2 | 697.73 | 469.07 | 583.40 | 27.71 |
| 4.2 | 630.7 | 413.13 | 521.92 | 29.48 |
| 5.2 | 565.29 | 360.15 | 462.72 | 31.35 |
| 6.2 | 501.98 | 310.35 | 406.17 | 33.36 |

Los GD acumulados para todo el período de presencia de L6 difieren entre 114 GD y 229 GD (Cuadro 5.28). Por otro lado, la predicción de su aparición a partir de la primera captura de machos también fue variable: 2040 GD, 1475 GD y 1610 GD para cada una de las temporadas.

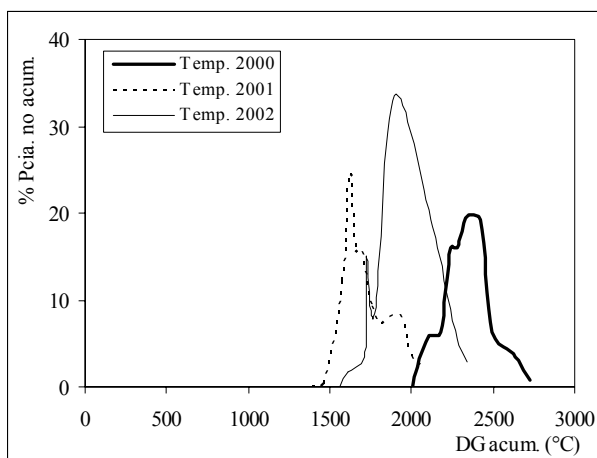


Figura 5.44. Presencia no acumulada de L6 respecto de sí mismo vs. GD acumulados.

El valor máximo de porcentaje de presencia no acumulada varió entre 19.7, 24.5 y 33.61 para T1, T2 y T3 respectivamente, mostrando además un marcado desplazamiento entre las curvas respecto del valor central de GD que osciló entre 2343 y 1899 (Figura 5.44).

Es probable que las diferencias que se manifiestan entre las temporadas estén relacionadas en parte con la imposibilidad de establecer con mayor precisión la amplitud del intervalo de presencia de L6 a causa del parasitismo.

En la figura 5.45 se observa que, dado que se trata del último estadio larval, los porcentajes de presencia respecto de los restantes estadios alcanzan los valores máximos con una o dos fluctuaciones cercanas también a 70-80%. En general, al final del período larval solo están presentes L5 y L6 con cierto grado de superposición. Es posible que las variaciones en las curvas se relacionen con problemas de muestreo.

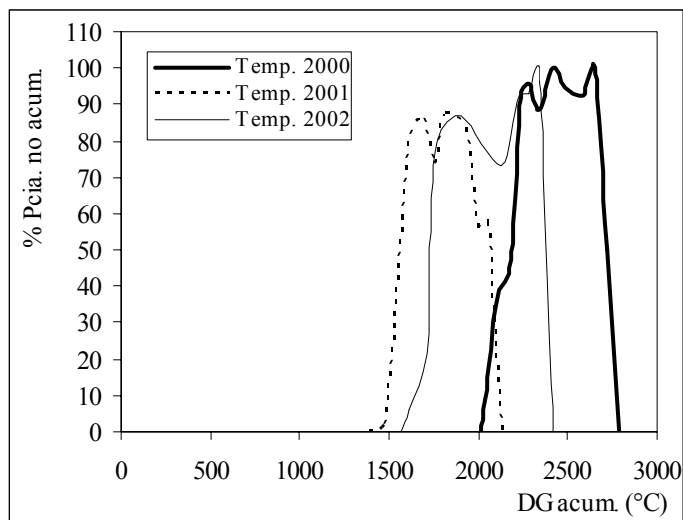


Figura 5.45. Presencia no acumulada de L6 respecto de los restantes estadios vs. GD acumulados.

5.2.2.2.7 Estado de pupa

El período de presencia de este estado estuvo comprendido entre el 13/11 y 02/01, 07/11 y 08/01 y entre el 23/11 y 19/01 para cada una de las temporadas sucesivas. La temperatura umbral inferior estimada resultó la misma que para los estadios larvales L2 a L6 (Cuadro 5.29), aunque el CV del umbral estándar inmediato anterior no se diferencia prácticamente del correspondiente a 3.2°C. Se adoptó este umbral dado que coincide con el adoptado para los estadios larvales mencionados.

Cuadro 5.29. Selección de la temperatura umbral inferior para el estado de pupa.

| T° umbral | GD acumulados en: | | | Media | CV |
|-----------|-------------------|---------|---------|---------|-------------|
| | 2000 | 2001 | 2002* | | |
| -6.2 | 1055.25 | 1144.4 | 1055.05 | 1099.83 | 5.73 |
| -5.2 | 1003.25 | 1081.4 | 997.05 | 1042.33 | 5.3 |
| -4.2 | 929.55 | 1018.41 | 939.05 | 973.98 | 6.45 |
| -3.2 | 899.25 | 955.52 | 881.05 | 927.39 | 4.29 |
| -2.2 | 847.25 | 892.82 | 823.06 | 870.04 | 3.7 |
| -1.2 | 795.26 | 830.38 | 765.12 | 812.82 | 3.06 |
| 0 | 732.94 | 756.02 | 695.74 | 744.48 | 2.19 |
| 1.2 | 670.75 | 682.69 | 626.86 | 676.72 | 1.25 |
| 2.2 | 619.1 | 622.86 | 570.13 | 620.98 | 0.43 |
| 3.2 | 567.74 | 564.42 | 514.29 | 566.08 | 0.41 |
| 4.2 | 516.97 | 507.62 | 459.75 | 512.3 | 1.29 |
| 5.2 | 467.09 | 452.72 | 407.12 | 459.91 | 2.21 |
| 6.2 | 418.45 | 400.16 | 356.89 | 409.31 | 3.16 |

* Los datos de este año se excluyeron para el cálculo de la media y del CV.

Los GD acumulados para el período de presencia de las pupas resultaron similares para las tres temporadas mostrando una diferencia máxima de 53.5°C (Cuadro 5.29). El leve retraso del ciclo en lo que respecta a las fechas calendario que se observa en la última temporada está en concordancia con los GD diarios promedio acumulados durante los meses anteriores al estado de pupa (Cuadro 5.30), hecho que a su vez se relaciona con la demora en el inicio de la temporada de vuelo pertinente.

Cuadro 5.30. Temperaturas mensuales promedio y GD diario promedio para el período de pupa

| Mes | Temporada 2000 | | Temporada 2001 | | Temporada 2002 | |
|--------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | T° mensual promedio | GD diario promedio | T° mensual promedio | GD diario promedio | T° mensual promedio | GD diario promedio |
| Noviembre | 11.74 | 9.46 | 8.97 | 6.29 | 8.69 | 6.98 |
| Diciembre | 14.4 | 11.31 | 14.10 | 10.79 | 11.59 | 8.49 |
| Enero | 19.55 | 16.75 | 12.09 | 8.98 | 13.44 | 10.27 |
| Período pupa | 15.23 | 12.51 | 11.72 | 8.69 | 11.24 | 8.58 |

La cantidad de temperatura necesaria para predecir la detección de la primera pupa en terreno resultó más cercana entre T2 y T3 -1634.51 GD y 1769.73 GD respectivamente-; mientras que para T1 fue muy superior -2280.72 GD-.

No hubo coincidencia en cuanto a la temperatura necesaria para alcanzar el valor de máxima presencia de este estado en cada temporada. El valor central de GD de las curvas muestra un desplazamiento marcado que oscila entre 912 GD y 468 GD (Figura 5.46). Asimismo, se observa que la cantidad de pupas registrada durante el último período fue extremadamente baja. Es posible que el elevado nivel de parasitismo larval esté relacionado con esta disminución.

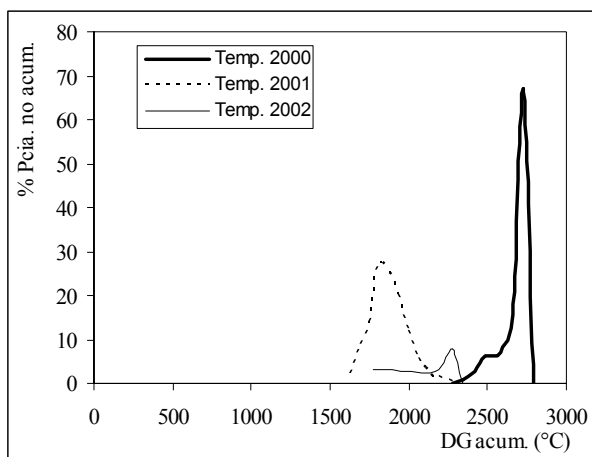


Figura 5.46. Presencia no acumulada de pupas vs. GD acumulados.

5.3 Variación genética y estructura genética de las poblaciones de *R. buoliana*

5.3.1 Sistemas enzimáticos seleccionados

Los sistemas enzimáticos y los buffers que dieron mejores resultados y que por lo tanto se seleccionaron y emplearon durante el estudio fueron los siguientes: AAT, G6PDH, ME, MDH y G3PDH para tris citrato pH 6.5 y PGM, IDH y EST para tris citrato pH 7.5. Se siguieron los protocolos de coloración de Pasteur para el caso de EST, G3PDH, AAT y PGM; mientras que para los restantes sistemas se siguieron los de Hillis y Moritz (1990). Se monitorearon 216 larvas en total (156 provenientes la plantación *e* de *P. radiata* –población *e*-, 60 provenientes la plantación *b* de *P. radiata* –población *b*- y 25 provenientes la plantación *f* de *P. ponderosa* –población *f*).

En el caso de los ejemplares de Oberberghausen se monitorearon en total 35 larvas y 126 pupas. En esta población también se monitoreó el locus HK, que no se incluyó en las poblaciones argentinas, a pesar de haberse obtenido una buena resolución en los preensayos.

5.3.2 Variación genética en poblaciones argentinas

La variación genética observada es muy baja pues se analizaron en total ocho loci en los sistemas enzimáticos monitoreados, seis de los cuales son monomórficos y los dos restantes polimórficos en los que se identificaron dos alelos en cada uno. El locus conformado por dos alelos observado en G3PDH no fue considerado en el análisis dado el escaso número de organismos en los que pudo ser evaluado (Figura 5.47).

Los sistemas monomórficos observados fueron AAT, PGM, G6PDH, IDH y MDH mientras que ME y EST resultaron polimórficos. (Figura 5.47 y Cuadro 5.31). En ME se observaron dos patrones: ME 1 y ME 2 que se interpretó como un locus con dos alelos. No obstante resulta sumamente llamativo que no se registraron heterocigotas para este locus.

El locus EST-2 fue el más interesante puesto que se observaron tres patrones EST 1, EST 2 y EST 1-2. Esto se interpretó como un locus con dos alelos: EST-2¹ y EST-2² y sobre el mismo se basaron la mayor parte de los análisis que se detallarán más adelante. En el locus EST-1 se observó una sola banda más rápida, monomórfica y más próxima al ánodo (Figura 5.47). Es pertinente destacar que la baja cantidad de loci y alelos encontrados en EST es llamativa, puesto que este sistema generalmente es complejo y altamente polimórfico en los insectos (Willhite & Stock 1983) y actúa a nivel de los sustratos que vienen de la ingesta (Confalonieri *et al.* 1990).

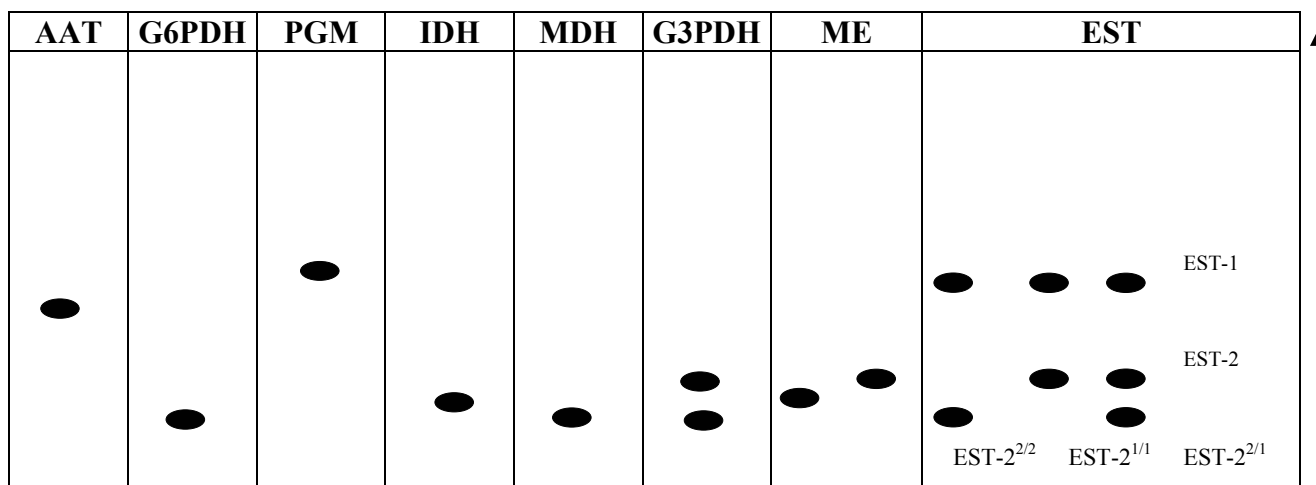


Figura 5.47. Sistemas de isoenzimas monitoreados y su movilidad relativa.

El locus EST-2 no tiene una distribución homogénea en las tres poblaciones, $P=0.0000001$ (g.l.=2), como así tampoco la tiene en las dos poblaciones asociadas a la misma especie hospedante *-P. radiata-* ($P=0.0001$, g.l.=1). Sin embargo esta distribución resultó homogénea ($P=0.59$, g.l.=1) en las poblaciones más próximas *e* y *f* de *P. radiata* y *P. ponderosa* respectivamente indicando un flujo génico intenso dada la escasa separación entre ambas.

La población asociada con la plantación *b* mantiene las proporciones de equilibrio de Hardy-Weinberg para este locus por lo que se comporta como una población panmíctica, sin embargo las restantes dos poblaciones mostraron diferencias significativas de las proporciones esperadas las que se deben a un gran déficit de heterocigotas (Cuadros 5.31, 5.33 y 5.34). El grado de heterocigosis esperada en la población asociada a *b* es aproximadamente la mitad de la esperada en las restantes poblaciones *e* y *f* en las que es similar (Cuadros 5.33 y 5.34). Asimismo en el cuadro 5.31 se observa la distribución genotípica de las tres poblaciones estudiadas donde se destaca el déficit de heterocigotas en todos los loci. Las frecuencias alélicas correspondientes a los loci polimórficos se muestran en el Cuadro 5.32.

Cuadro 5.31. Distribución genotípica en las poblaciones estudiadas

| | Pobl. <i>e</i> | Pobl. <i>b</i> | Pobl. <i>f</i> |
|----------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| EST-2 ^{1/1} | 8 | 21 | 7 |
| EST-2 ^{1/2} | 3 | 6 | 3 |
| EST-2 ^{2/2} | 20 | 1 | 14 |
| X ² * | 19.52 ^a | 0.62 ^b | 13.55 ^c |
| EST-1 ^{1/1} | 59 | 28 | 25 |
| AAT | 44 | No analizado | 12 |
| G6PDH | 87 | 29 | 12 |
| PGM | 62 | 32 | 12 |
| IDH | 82 | 32 | 25 |
| ME ^{1/1} | 32 | 22 | 11 |
| ME ^{2/2} | 12 | 34 | 6 |
| MDH | 80 | 32 | 18 |

Test X² para el equilibrio de Hardy-Weinberg en EST- 2; g.l. =1; a: $P = 0.00001$, b: $P = 0.42$, c: $P = 0.00023$

Cuadro 5.32. Frecuencias alélicas de los loci polimórficos

| Alelo\Locus | Pobl. e | | Pobl. b | | Pobl. f | |
|-------------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
| | ME | EST-2 | ME | EST-2 | ME | EST-2 |
| 1 | 0.7273 | 0.3065 | 0.5676 | 0.8571 | 0.6471 | 0.3542 |
| 2 | 0.2727 | 0.6935 | 0.4324 | 0.1429 | 0.3529 | 0.6458 |

Cuadro 5.33. Frecuencias genotípicas de los heterocigotas observados (Ho) y esperados (He) y test de X^2 para el locus EST- 2.

| | Ho | He | $X^2 *$ |
|---------|----|-------|---------|
| Pobl. e | 3 | 13.39 | 8.06 |
| Pobl. b | 6 | 6.98 | 0.138 |
| Pobl. f | 3 | 11.21 | 6.01 |

*g. l. = 1; Los niveles de probabilidad para cada caso son los mismos que para el cuadro anterior.

Cuadro 5.34. Proporción de los heterocigotas observados (Ho) y esperados (He) para el locus EST- 2 en las tres plantaciones monitoreadas.

| | Pobl. e | | Pobl. b | | Pobl. f | |
|-------|---------|-------|---------|--------|---------|-------|
| | Ho | He | Ho | He | Ho | He |
| EST-2 | 0.0968 | 0.432 | 0.2143 | 0.2494 | 0.125 | 0.467 |

He estimada según Levene (1949)

Por otra parte resulta interesante analizar si es que existe variación en el locus EST-2 entre las poblaciones asociadas con las dos especies de hospedantes tratadas. Cuando se unifican los datos obtenidos de ambas plantaciones de *P. radiata* y se los contrasta con aquellos obtenidos de *P. ponderosa* (el test G indicó que este locus no tiene una distribución homogénea en las poblaciones asociadas a uno y otro hospedante $-P=0.012$, g.l.=1-) resulta llamativo que en ambas especies de hospedantes son diferentes los alelos de EST-2 más frecuentes y que contribuyen al mayor porcentaje de homocigotas. En el caso de *P. radiata* el alelo más frecuente es el correspondiente a EST-2^{1/1} con el 49% y en el caso de *P. ponderosa* es EST-2^{2/2} con el 58%. Posiblemente la población *b* es la que está contribuyendo con esta observación puesto que el alelo más frecuente y que aporta el mayor porcentaje de homocigotos es precisamente el opuesto de la otra población asociada a *P. radiata* y que comparte el mismo alelo más frecuente con la población asociada a *P. ponderosa*. En este contexto y atendiendo las observaciones señaladas con anterioridad es pertinente considerar que este sistema varía con las condiciones ambientales y que, justamente la especie hospedante es parte del ambiente donde viven los organismos testeados. En este mismo sistema es donde precisamente se apreciaron estas observaciones en las poblaciones asociadas con las dos especies forestales.

Las frecuencias genotípicas en ambos hospedantes no son consistentes con las proporciones esperadas por el equilibrio de Hardy- Weinberg. El test de X^2 para comparar las frecuencias esperadas de los homocigotas y heterocigotas arrojó diferencias significativas en ambos casos (Cuadro 5.35).

Cuadro 5.35. Frecuencias genotípicas y test de X^2 para el locus EST- 2 en *P. radiata* y *P. ponderosa*.

| | <i>P. radiata</i> | | | <i>P. ponderosa</i> | | |
|----------------------|-------------------|----------|---------|---------------------|----------|---------|
| | Obs. | Esperada | X^2 a | Obs. | Esperada | X^2 b |
| EST-2 ^{1/1} | 29 | 18.89 | 5.4 | 7 | 2.89 | 5.82 |
| EST-2 ^{1/2} | 9 | 29.20 | 13.97 | 3 | 11.21 | 6.01 |
| EST-2 ^{2/2} | 21 | 10.89 | 9.36 | 14 | 9.89 | 1.70 |
| Total | 59 | 59 | 28.73 | 24 | 23.99 | 13.53 |

* g.l.=1; a: P = 0.00001, b: P=0.00023

5.3.2.1 Diferenciación genética entre las poblaciones argentinas.

Tal como era esperable, se observó un alto nivel de similitud o identidad genética entre las poblaciones cuyos valores oscilaron entre 0.999-0.879 quedando comprendidos dentro del rango de valores que se ha determinado entre poblaciones de la misma especie (Ayala 1975 fide Stock y Castrovillo 1981). Conforme a los resultados del test de homogeneidad, los valores de distancia e identidad genética de Nei estimados reafirmaron que no hay diferenciación genética entre los pares de poblaciones geográficamente más próximos (poblaciones *e* y *f*); mientras que cierto grado de “diferenciación” ocurre entre las poblaciones *e* y *b* cuya separación geográfica es intermedia considerando las tres distancias entre pares de poblaciones (Cuadro 5.36). Sin embargo puede considerarse que esta separación geográfica entre ambas poblaciones *e* y *b* no es tan significativa puesto que la distancia que separa la población de localización intermedia *e* de la población ubicada en el extremo más próximo *f* es de 6km.

Cuadro 5.36. Identidad genética (arriba diagonal) y distancia genética de Nei (abajo diagonal).

| Poblaciones | Pobl. <i>e</i> | Pobl. <i>b</i> | Pobl. <i>f</i> |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Pobl. <i>e</i> | ----- | 0.8787 | 0.9988 |
| Pobl. <i>b</i> | 0.1293 | ----- | 0.9892 |
| Pobl. <i>f</i> | 0.0012 | 0.0109 | ----- |

Por otra parte los valores de Fst obtenidos por pares de poblaciones muestreadas oscilaron entre 0.005 y 0.175, mientras que los valores de Fis resultaron superiores y variaron entre 0.798 y 0.87 (Cuadro 5.37) sustentando de esta forma la escasa variabilidad y diferenciación existente entre las poblaciones estudiadas.

Cuadro 5.37. Valores de Fis (arriba diagonal) y Fst (abajo diagonal) entre pares de poblaciones.

| Poblaciones | Pobl. <i>e</i> | Pobl. <i>b</i> | Pobl. <i>f</i> |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Pobl. <i>e</i> | ----- | 0.798 | 0.870 |
| Pobl. <i>b</i> | 0.175 | ----- | 0.842 |
| Pobl. <i>f</i> | 0.005 | 0.039 | ----- |

Analizando en forma conjunta todos los parámetros de diferenciación genética estimados precedentemente, se observó (atendiendo siempre la escasa variación genética existente) que entre el par de poblaciones *e-b* asociadas a la especie forestal *P. radiata* ocurre el mayor grado de diferenciación dado que entre ellas se obtuvo el menor valor de identidad genética y de coeficiente de endogamia Fis, como así también el valor mayor para la distancia genética y Fst.

De la misma manera el valor de Fst correspondiente a la correlación de genes entre poblaciones asociadas a *P. radiata* y la población asociada a *P. ponderosa* resultó 0.0241 mientras que el valor de Fis fue de 0.849. Nuevamente la relación inversa entre ambos parámetros indica un alto grado de endogamia y que por lo tanto la variabilidad genética es muy baja. Este valor de Fst es muy inferior al obtenido entre las poblaciones *e* y *b* asociadas a *P. radiata* (Cuadro 5.37) mientras que el correspondiente al coeficiente de endogamia es mayor. En este sentido la planta hospedante parece no influir en la estructura genética de las poblaciones a pesar de la diferencia, ya explicitada, en cuanto a cuál es el alelo que contribuye al mayor porcentaje de homocigotas en cada especie.

5.3.3 Variación genética en la población alemana de referencia

Se analizaron en total diez loci en los sistemas enzimáticos monitoreados, un locus por cada sistema a excepción de EST y HK en los que se registraron 2 loci: EST-1, EST-2, HK-1 y HK-2. Todos los loci estudiados resultaron polimórficos siendo 2 el número de alelos más frecuente y registrado en los siguientes loci: AAT, G3PDH, G6PDH, HK-1, HK-2, IDH, PGM, mientras que 3 alelos se registraron en MDH y EST-2 y 4 alelos en EST-1. En IDH, G3PDH y MDH ^{3/1} no se registraron heterocigotas. Esterasa es claramente el sistema estudiado que resultó más polimórfico en concordancia con lo mencionado anteriormente. El locus ME no pudo ser evaluado pues no se obtuvo buena resolución de las bandas. El locus EST-2 se consideró como el correspondiente al locus polimórfico en las poblaciones argentinas.

Las frecuencias genotípicas no son consistentes con las proporciones esperadas por el equilibrio de Hardy-Weinberg para los loci AAT, EST-1, EST-2, G3PDH, IDH y G6PDH, mientras que para PGM, HK-1 y HK-2 las desviaciones resultaron significativas entre $0.03 < P < 0.06$, en el caso de MDH no resultaron significativas por lo que este locus mostró las proporciones de equilibrio (Cuadro 5.38). Estas diferencias se deben a un déficit de heterocigotos en los loci mencionados. Las frecuencias alélicas correspondientes se muestran en el cuadro 5.39.

Cuadro 5.38. Distribución genotípica para cada locus y test de X^2 para el equilibrio de Hardy-Weinberg.

| Locus | Genotipo | Locus | Genotipo | Locus | Genotipo | Locus | Genotipo |
|-------------------------|-------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|------------------|
| AAT-1 ^{1/1} | 4 | HK-1 ^{1/1} | 3 | EST-1 ^{1/1} | 7 | MDH-1 ^{1/1} | 0 |
| AAT-1 ^{1/2} | 4 | HK-1 ^{1/2} | 6 | EST-1 ^{1/2} | 0 | MDH-1 ^{1/2} | 2 |
| AAT-1 ^{2/2} | 105 | HK-1 ^{2/2} | 19 | EST-1 ^{2/2} | 11 | MDH-1 ^{2/2} | 116 |
| X²* a | 51,78 (1) | X²* b | 4,23 (1) | EST-1 ^{3/1} | 5 | MDH-1 ^{3/1} | 0 |
| IDH-1 ^{1/1} | 2 | HK-2 ^{1/1} | 15 | EST-1 ^{3/2} | 10 | MDH-1 ^{3/2} | 1 |
| IDH-1 ^{1/2} | 0 | HK-2 ^{1/2} | 9 | EST-1 ^{3/3} | 54 | MDH-1 ^{3/3} | 0 |
| IDH-1 ^{2/2} | 120 | HK-2 ^{2/2} | 7 | EST-1 ^{4/1} | 0 | X²* d | 0,012 (3) |
| X²* a | 162 (1) | X²* c | 4,84 (1) | EST-1 ^{4/2} | 1 | | |
| PGM-1 ^{1/1} | 74 | G6PDH-1 ^{1/1} | 3 | EST-1 ^{4/3} | 4 | | |
| PGM-1 ^{1/2} | 33 | G6PDH-1 ^{1/2} | 4 | EST-1 ^{4/4} | 5 | | |
| PGM-1 ^{2/2} | 9 | G6PDH-1 ^{2/2} | 68 | X²* a | 127,44 (6) | | |
| X²* e | 3,57 (1) | X²* a | 27,31 (1) | EST-2 ^{1/1} | 59 | | |
| G3PDH-1 ^{1/1} | 100 | | | EST-2 ^{1/2} | 20 | | |
| G3PDH-1 ^{1/2} | 0 | | | EST-2 ^{2/2} | 20 | | |
| G3PDH-1 ^{2/2} | 2 | | | EST-2 ^{3/1} | 5 | | |
| X²* a | 135,34 (1) | | | EST-2 ^{3/2} | 6 | | |
| | | | | EST-2 ^{3/3} | 7 | | |
| | | | | X²* a | 60,97 (3) | | |

Grados de libertad entre paréntesis. a: P= 0.0000001, b: P= 0.04, c: P= 0.03, d: P= 0.99, e: P= 0.06

Cuadro 5.39. Frecuencias alélicas en la población estudiada

| Alelo\Locus | AAT | EST-1 | EST-2 | G3PDH | G6PDH | HK-1 | HK-2 | IDH | MDH | PGM |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0,053 | 0,098 | 0,611 | 0,980 | 0,067 | 0,214 | 0,629 | 0,016 | 0,008 | 0,780 |
| 2 | 0,947 | 0,170 | 0,282 | 0,020 | 0,933 | 0,786 | 0,371 | 0,984 | 0,987 | 0,220 |
| 3 | | 0,655 | 0,107 | | | | | | 0,004 | |
| 4 | | 0,077 | | | | | | | | |

Otro de los parámetros de la diversidad genética que se estimó para la población de referencia es la diversidad génica como una medida de la variación genética por cada locus y que se corresponde con la heterocigosis esperada; en este caso la diversidad génica promedio resultó 0,256 y los valores más bajos se correspondieron con aquellos loci en los que no se detectaron heterocigotos (Cuadro 5.40).

Cuadro 5.40. Diversidad génica en la población alemana de *R. buoliana*.

| | Locus | | | | | | | | | | Prom. |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | AAT | EST-1 | EST-2 | G3PDH | G6PDH | HK-1 | HK-2 | IDH | MDH | PGM | |
| Div. gén. | 0.101 | 0.531 | 0.539 | 0.039 | 0.126 | 0.345 | 0.477 | 0.033 | 0.025 | 0.345 | 0.2561 |

6 DISCUSIÓN

6.1 Consideraciones sobre la biología de *R. buoliana*

6.1.1 Eficiencia biológica de las larvas transferidas a un nuevo hospedante

La amplia diferencia entre los procedimientos –modelo de regresión vs. porcentajes- respecto de la cantidad de tejido consumido puede estar relacionada con errores inherentes a ambos procedimientos de estimación: para aquel basado en porcentajes hubo una sobreestimación en el cálculo del volumen de tejido consumido por las larvas puesto que se consideraron los tejidos internos como el meristemático, parénquima, de sostén, etc. y no aquellos que forman parte de la cobertura externa como la epidermis de las escamas y tejidos leñosos en la base de las mismas. De este modo, se consideró por ejemplo el 100% de consumo cuando las yemas estaban completamente ahuecadas siendo que restaba tejido de las mismas que forma parte del volumen y contribuye a su peso seco. El método basado en la construcción del modelo de regresión sobreestimó aún más esta cantidad puesto que en el registro del peso seco estuvieron incluidas las acículas que estaban presentes en los brotes. Posiblemente sea éste uno de los factores que interfirió con los datos del ensayo 2 en el que los brotes estaban más desarrollados y con más acículas.

Las dos debilidades principales que tienen estos experimentos y que es importante nombrar en función de la imposibilidad de conseguir plantas más adecuadas en el mercado son la diferencia de edad entre las plantas y la procedencia de diferentes viveros de los lotes de plantas de las dos especies. Esto significa que las condiciones bajo las cuales fueron tratadas y conservadas no son las mismas, aspecto que puede influir en el tamaño y crecimiento de las yemas/brotes y de la planta en general.

6.1.2 Intensidad de oviposición

6.1.2.1 Efecto de la humedad relativa ambiente en el número de huevos

Tal como se hizo referencia, las hembras liberadas en las jaulas depositaron en promedio muy pocos huevos (nueve huevos/ hembra, rango de valores del número de huevos/jaula comprendido entre 0 y 66). Una de las posibles razones que explican este resultado reside en las condiciones físicas bajo las que se mantuvieron las jaulas de apareamiento y oviposición, principalmente en lo que respecta a la humedad relativa ambiente. Según Cisternas y Zuñiga (1988), el valor óptimo de humedad relativa ambiente que garantiza la mayor postura de huevos es el 70%. Los ensayos específicos de Daterman (1972) demostraron que la sequedad en los estudios bajo ambientes controlados provocan efectos adversos contundentes en la fecundidad de las hembras. Sus resultados indicaron que existe una relación inversa entre ambas variables consideradas; el número de huevos promedio por cada hembra osciló entre 130 y 51 para los valores extremos de déficit de presión de vapor testeados (4- 24 mmHg). Esta variable ambiental crítica y decisiva en la fecundidad de las hembras no pudo cumplirse durante el desarrollo de este trabajo debido a problemas técnicos en la construcción de la cámara climatizada que no permitieron regular y sostener la humedad por encima del umbral indicado de 40- 45%.

6.1.2.2 Influencia de la experiencia de los estados inmaduros y alcance de las preferencias

Los resultados de los ensayos de preferencias por la especie hospedante demuestran que en asociación con la cópula las hembras depositan mayor cantidad de huevos en la especie forestal de la cual proceden los estados inmaduros previos. En términos de fidelidad por el hospedante, es decir la tendencia a permanecer y oviponer en la planta natal hospedante (Craig *et al.* 2001), ambas procedencias exhibieron fidelidad por el habitat del cual provienen sin que ésta resultara muy marcada dado que no ovipusieron exclusivamente en su especie de origen. En este sentido, sin considerar al genotipo, podría asumirse que la preferencia puede estar condicionada o influenciada por la experiencia previa de las larvas y pupas que se criaron en dichos hospedantes. Varios estudios han demostrado que la experiencia de los adultos puede influir en esta preferencia (Wood 1980, Jaenike 1982, Wood y Guttman 1983 *fide* Craig *et al.* 2001, Jaenike 1990). Asimismo, se ha propuesto pero nunca se ha afirmado enfáticamente que la experiencia de las larvas puede influir en la preferencia del adulto (Craig *et al.* 2001).

No obstante, el alcance de los ensayos llevados a cabo no permite constatar o rechazar la plausibilidad de esta hipótesis sino simplemente considerarla. Más adelante será necesario completarlos con otros tratamientos que contemplen “híbridos” entre ambas procedencias criados sobre las dos especies de hospedantes diferentes (*P. ponderosa* y *P. radiata*). Si esta hipótesis fuera cierta los “híbridos” deberían tener preferencias opuestas, cada uno dependiendo de la especie donde fue criado.

Además de la experiencia previa otros factores pueden influir en la preferencia por el hospedante, por ejemplo el genotipo y el estado fisiológico del insecto (Miller y Strickler 1984, Cortney 1989 *fide* Craig *et al.* 2001). Los modelos que simulan el comportamiento de aceptación del hospedante basados en el estado fisiológico del organismo predicen que un insecto que se comporta de manera óptima aceptaría hospedantes de bajo rango en su escala jerárquica de preferencias o bien nuevos hospedantes cuando su carga de huevos es elevada o a medida que aumenta el tiempo de búsqueda para un sitio de oviposición. No obstante, se ha comprobado un amplio espectro de posibilidades al respecto, las que varían con las especies. En algunos casos los ovocitos maduran continuamente aún en ausencia de potenciales hospedantes forzando así a las hembras a aceptar hospedantes de bajo rango, mientras que en otros casos sucede lo contrario. En consecuencia la privación de hospedantes adecuados no siempre conduce a aceptar algún hospedante, puesto que muchas especies retienen sus ovocitos hasta su muerte en ausencia de los hospedantes preferidos (Jaenike 1990).

En los tratamientos que contemplaron la oferta de un hospedante únicamente, este último factor – estado fisiológico del insecto- está incluido en los resultados sin que pueda aislarse. Dada la naturaleza del ensayo no es posible conocer el momento en que se produjo la oviposición para poder así apreciar en el análisis la posible urgencia de las hembras por dejar su descendencia independientemente de la especie sustrato. Tampoco se conoce para la mariposa del brote, a pesar de ser una especie sinovigénica, el comportamiento de las hembras en lo referente a la maduración de los ovocitos en los ovarios ante la ausencia de hospedantes adecuados. Las disecciones practicadas sobre las hembras de estos ensayos muestran ovocitos en diferentes estados de desarrollo a lo largo de los ovarios. De todas formas la falta de fidelidad estricta por la planta natal, es decir las hembras que no ovipusieron exclusivamente en su hábitat de origen, no contribuye completamente a este nuevo supuesto.

Una de las principales implicancias involucradas en la magnitud o grado de extensión de la fidelidad por la planta hospedante es el aislamiento reproductivo que puede generarse. Si la fidelidad está determinada genéticamente deberían encontrarse diferencias en las frecuencias de isoenzimas entre las poblaciones asociadas a diferentes especies hospedantes, siempre que esta técnica resultara adecuada para analizar las poblaciones de *R. buoliana* que aún son relativamente recientes.

6.1.3 Caracteres de las yemas relacionados con la intensidad de ataque

En diferentes investigaciones pudo demostrarse que el ataque de *R. buoliana* depende de la producción de resina, exposición y fuerza de crecimiento de las plantas (Escherich 1931). En rodales de plantaciones afectadas por este insecto se observa que los árboles próximos se diferencian en cuanto a la intensidad de ataque; este fenómeno también es frecuente en otros sistemas fitófago-árbol hospedante tal como ha sido reportado por Mopper y Simberloff (1995) y Wagner y Zhang (1993). La variación fenotípica en la vulnerabilidad al ataque de insectos es un concepto íntimamente asociado al de resistencia y en los últimos años, tanto uno como el otro, han cobrado importancia en el marco de la producción de árboles forestales. En este sentido, un cuestionamiento de gran interés es cómo las características de las plantas afectan el ataque de los fitófagos. Se ha postulado la hipótesis que predice que las plantas o partes de ellas que crecen más lentamente son más propensas al ataque de los herbívoros debido a que son más nutritivas y están menos protegidas por los compuestos de defensa (Rhoades 1979, White 1984 fide Prado y Monteiro Vieira 1999). En forma alternativa se propone que, las plantas o partes de ellas que son más vigorosas y de rápido crecimiento serán preferidas por aquellos herbívoros que dependan de una alta actividad meristemática o de algunas propiedades químicas o nutritivas asociadas con el vigor (Price 1991 fide Prado y Monteiro Vieira 1999). Los resultados de este trabajo concuerdan con la primera de las hipótesis enunciadas puesto que claramente las plantas de *P. radiata* que soportan mayor intensidad de ataque son aquellas en las que el crecimiento resultó significativamente más lento respecto de las que soportan una menor intensidad. En el análisis comparativo de ambas especies forestales esta hipótesis no es sustentada por los resultados obtenidos puesto que en general, el crecimiento más lento de los brotes de *P. ponderosa* respecto de *P. radiata* no se corresponde con plantas más intensamente atacadas. Esta observación apoya la hipótesis de que otros factores -distintos del crecimiento de las yemas- propician el menor grado de ataque observado en esta especie cuando coexiste con *P. radiata*, como se mencionará más adelante.

Gruppe *et al.* (2001) demostraron en la relación *P. sylvestris*-*Blastethia turionella* (otro lepidóptero tortricido barrenador de yemas y brotes) que tanto las características fenológicas como las bioquímicas y genéticas pueden ser responsables de las diferencias en la intensidad de ataque entre las plantas de un mismo rodal. Estos autores observaron que las plantas clasificadas como “sin ataque” eran aquellas cuyos brotes eran más largos y de mayor diámetro, coincidiendo así con los estudios de Kletecka en los géneros *Rhyacionia* sp., *Blastethia* sp. y *Retina* sp (1992 fide Gruppe *et al.* 2001). En el presente estudio, el mayor tamaño comprobado en las yemas de *P. ponderosa* desempeña un rol fundamental en la magnitud de los daños ocasionados por el insecto, y posiblemente, sea uno de los factores que influya en la menor intensidad de ataque observada en estas plantas cuando coexisten en el mismo sitio con la otra especie. Otro de los factores importantes que ha sido señalado es la morfología de las yemas, puesto que las larvas deben penetrar en ellas para alimentarse y dado que son capaces de consumir varias yemas antes de entrar en el período de dormancia deben superar la barrera defensiva que conforman las

escamas que están recubriendo las yemas. Esta morfología que generalmente consiste en escamas erguidas y persistentes asociada con una mayor producción de resina dificulta la penetración de las larvas (Schröder 1978, Gruppe *et al.* 2001).

Harris (1960) ha establecido para otras especies de *Pinus* sp. que las yemas más pequeñas tienen canales resiníferos más pequeños y que por lo tanto producen menos cantidad de resina. Tanto el tamaño superior de las yemas de *P. ponderosa* como así también el mayor área de la yema que es ocupada por el sistema de canales resiníferos (los que constituyen el sistema de defensa primario de la planta contra el ataque de las larvas) propician que las yemas en esta especie estén mejor defendidas que en *P. radiata* en lo que se refiere a los aspectos estructurales, apoyando nuevamente lo antes mencionado. El énfasis debe darse no sólo a la cantidad de resina producida sino también a otros factores relacionados con su composición física y química los que son de suma importancia en la defensa de la planta (Harris 1960, Hodges 1979, Panda y Kusch 1995, De Groot y Turgeon 1998, Barbosa y Wagner 1987).

6.2 Análisis de modelos fenológicos basados en la acumulación de grados día (GD)

6.2.1 Análisis comparativo entre el modelo propuesto y el construido para el oeste de Oregon

La primera diferencia significativa que surge de este análisis es la temperatura umbral inferior para el estado adulto que en este estudio se estimó en 4.2°C, valor que dista mucho de aquel de -2.2°C estimado para la misma especie en el oeste de Oregon (Regan *et al.* 1991) y que, como se explicitó en el capítulo de resultados no concuerda con los valores habituales. En el trabajo indicado (Regan *et al.* 1991) se utilizó la misma metodología para la estimación del CV aunque el monitoreo incluyó cinco temporadas y el modelo fenológico contempla una fecha calendario fija (primero de julio) para el inicio de la acumulación de GD.

Según el modelo de Regan *et al.* (1991) se necesitan 1712 GD, 1958 GD y 2205 GD para 10%, 50% y 90% de las capturas en trampas respectivamente. Estos resultados no pueden compararse directamente con los obtenidos en el presente estudio, puesto que no se emplea un evento biológico sino una fecha fija para el inicio del cálculo de las temperaturas acumuladas, el umbral inferior de desarrollo estimado es considerablemente menor y además se aplica el modelo de regresión lineal para las capturas comprendidas entre 5% y 95%.

En consecuencia y a los efectos de poder comparar los datos de ambos estudios se construyó, con los datos obtenidos en el presente estudio, un modelo para la porción lineal de la curva sigmoidea a partir de una fecha fija para el comienzo del cálculo de los GD. Con tal propósito se reubicaron estos datos empleando la misma escala utilizada por Regan *et al.*, transformando así la fecha 01/01 en 01/07, dado que sus datos fueron colectados en el Hemisferio Norte. De esta forma se calcularon los GD desde el día 01/07 hasta el día de la última captura con -2.2 °C como temperatura umbral inferior y se asignaron los porcentajes de vuelo pertinentes. Luego se construyó un modelo de regresión lineal de las capturas acumuladas vs. GD, tal como se había procedido con el modelo anteriormente desarrollado.

La función: $y = 0.0219x$ que describe la recta de regresión obtenida no brinda un buen ajuste de la distribución de los valores muestrales de GD y porcentaje de vuelo por lo que no permite de esta forma

validar su capacidad predictiva y aplicabilidad. El ajuste de este modelo lineal para el porcentaje de capturas acumuladas entre 5 y 95% y los GD acumulados no resultó adecuado y mostró que ambas variables no están muy bien correlacionadas (Figura 6.1), a diferencia del modelo de Regan *et al.* La recta de regresión corta el eje vertical cerca de 20% de las capturas acumuladas; si el ajuste fuera el adecuado la ordenada al origen del ajuste por regresión debería pasar por el origen del sistema. Esto ocasiona una sobreestimación de las capturas respecto de los GD necesarios. Obviamente, los GD necesarios para los distintos valores de emergencias de adultos difieren considerablemente de los calculados según la ecuación de ajuste del modelo.

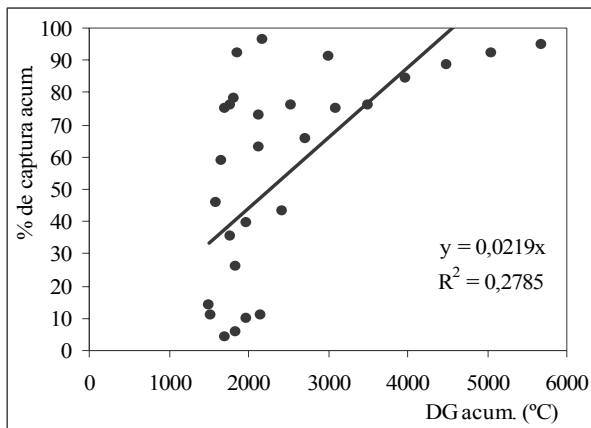


Figura 6.1. Modelo lineal de capturas acumuladas de machos vs. GD acumulados.

Sin embargo, si se consideran los GD acumulados desde el primero de julio y la primera captura para cada una de las temporadas de muestreo en Esquel, y se las compara con los 1659.25 GD pronosticados por el modelo de Regan *et al.*, las diferencias no fueron tan marcadas para las primeras dos temporadas de muestreo (Cuadro 6.1) en tanto se acentuaron en las dos restantes, que acumularon menos unidades de calor.

Cuadro 6.1. Comparación de GD acumulados entre Esquel y el modelo de Regan *et al.*

| Temporada | GD | Diferencia en GD acum. | GD diario promedio | Nro. de días ¹ |
|------------|---------|------------------------|--------------------|---------------------------|
| 1999- 2000 | 1693.23 | 33.98 | 10.6 | 3 |
| 2000- 2001 | 1738.61 | 79.36 | 10.29 | 8 |
| 2001- 2002 | 1273.51 | 385.74 | 8.11 | 48 |
| 2002- 2003 | 1438.24 | 220.98 | 7.9 | 28 |

¹ = Número de días de diferencia referidos a los GD diarios promedio durante el período de cálculo de GD acumulados

Posiblemente estas discrepancias se deban a las diferencias geográficas y climáticas como así también a la ocurrencia de diferentes biotipos del insecto asociados a otra especie de hospedante. Además, aún cuando la utilidad y validación del modelo de Regan *et al.* hayan sido comprobadas, es factible que bajo condiciones geográficas y climáticas diferentes la selección azarosa de una fecha calendario influya notablemente en su capacidad predictiva.

En este sentido, una de las mayores imprecisiones en los modelos de grados día se produce cuando existen dificultades en definir un tiempo discreto o un evento biológico que pueda emplearse para iniciar la acumulación de temperaturas (Dent y Walton 1997). La selección arbitraria de este momento, tal como pueden ser las fechas calendario, se basa en que el desarrollo del insecto durante el período previo a la fecha elegida es insignificante o desechable, justificación que carece de sustento biológico. Generalmente ello se aplica cuando se trata de predecir el desarrollo luego de un período de dormancia o diapausa. A través de diferentes estudios se ha demostrado que estos modelos son exitosos cuando las acumulaciones de temperatura se inician con la presencia de un determinado estado de desarrollo y para predecir futuros estados (Pruess 1983; Gargiulo *et al.* 1984).

En concordancia con los trabajos de los autores citados en el párrafo precedente, este estudio ratifica la bondad del empleo de un evento biológico, en este caso la captura del primer macho en trampas de feromonas, como momento de inicio de cálculo de GD.

6.2.2 Análisis comparativo entre el modelo propuesto y los GD acumulados calculados para la VIII Región chilena

Otro estudio similar realizado por Palma Prieto en 1995 en Los Arenales, VIII Región de Chile, que relaciona los GD acumulados y el ciclo biológico de la mariposa del brote, permite también efectuar algunas comparaciones con los resultados obtenidos en el presente trabajo. En el estudio citado se empleó directamente el umbral inferior de desarrollo estimado por Regan *et al.* y no se construyó un modelo fenológico, pues se tomaron datos durante un solo ciclo de vida del insecto. Para posibilitar la comparación se recalcularon los GD del presente estudio empleando como umbral inferior la temperatura de -2.2 °C.

Las únicas temperaturas acumuladas especificadas en el estudio realizado por Palma Prieto son las que corresponden a 50%, 80% y 100% de emergencia de los adultos, para los que se necesitan entre 241.5-184.2 GD y entre 298.1 GD-270.7 GD para 50% y 80% de emergencia respectivamente, valores que no coinciden con los predichos por el modelo de regresión (Figura 6.2). Las temperaturas acumuladas necesarias para los respectivos porcentajes de emergencias recalculadas empleando el citado umbral inferior superan entre 18 GD y 76 GD para 50% de las capturas y entre 120 GD y 148 GD para 80% de las capturas a los valores absolutos de GD del estudio considerado, mientras que para el máximo porcentaje de emergencia, éstas se encuentran entre 182 GD y 205 GD por debajo de los valores absolutos de GD (Gomez 2003). En términos de número de días de diferencia -referidos a los GD diarios promedio para el período de vuelo- las variaciones oscilan entre 3.5 y 6 días para 50% de las emergencias, entre 10 y 12 días para 80% y entre 11 y 19 días en menos para la máxima emergencia. Posiblemente, estas discrepancias se deban a diferencias climáticas a excepción de la temperatura, pues se supone que el desarrollo de una especie tiene los mismos requerimientos térmicos independientemente de la ubicación geográfica, a menos que haya, por ejemplo, diferencias de biotipos.

Si se analizan las diferencias solamente en términos absolutos se observa que las mismas se suavizan al final del período de vuelo en que los valores absolutos son muy similares. Para Chile oscilan entre 888.1 y 903.6 para dos estaciones climáticas diferentes pero para un solo muestreo anual, mientras que para

Patagonia oscilan entre 841.7 y 881.1 correspondientes a dos períodos consecutivos de vuelo (2000-2001 y 2001-2002) (Figura 6.2).

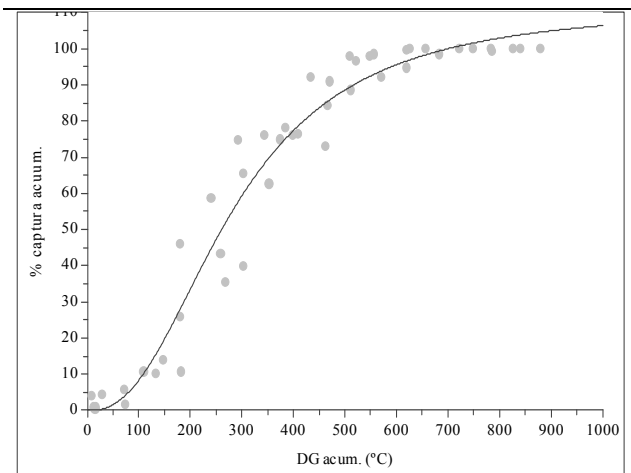


Figura 6.2. Capturas acumuladas de machos adultos en vuelo vs. GD.

El modelo correspondiente a la función expresada gráficamente es el siguiente:

$$y = ab + cx^d / b + x^d;$$

siendo $r^2 = 0.9612$; $s = 7.799$

Los valores que adoptan los coeficientes son: $a = -0.074702141$, $b = 702518.41$, $c = 111.66034$ y $d = 2.3838288$.

6.2.3 Perspectivas, potencialidad y aplicación del modelo en el manejo de la plaga

La construcción, ajuste y validación de este modelo fenológico es uno de los primeros pasos necesarios hacia la planificación y estructuración de un sistema que facilite el seguimiento de la plaga y proporcione información para la toma de decisiones en su manejo. Un segundo elemento, que es tan importante como la existencia del modelo, es la disponibilidad de los datos climáticos registrados en las diferentes estaciones meteorológicas asentadas en el área.

Un avance interesante en este sentido lo constituyen los estudios de Damario y Pascale (1971, 1974 y 1983) y Rodríguez *et al.* 2001 (Fide Rodríguez *et al.* 2001), que son los primeros pasos hacia la integración de esta información y la generación de cartas de disponibilidades calóricas en Argentina. Estos trabajos, que están orientados fundamentalmente a los requerimientos energéticos de los cultivos agrícolas, tienen como principal limitante que se han basado en las temperaturas medias mensuales en lugar de las temperaturas diarias. De esta forma la posibilidad de utilizar estos datos es restringida, al menos en lo que respecta a la comparación de mapas históricos de grados día.

A pesar que se reconoce la importancia del conocimiento de las disponibilidades calóricas para la agroclimatología de una región, no es usual su registro continuo y sostenido en el tiempo. Al mismo tiempo, el acceso a esta información es restringido y arancelado. La planificación e implementación de

redes de información de esta naturaleza, con acceso directo para los usuarios, es un proceso lento que requiere de la cooperación, coordinación e integración interinstitucional de diferentes grupos de trabajo.

Por otra parte cabe destacar que el modelo construido luego de las cuatro temporadas consecutivas de monitoreo se halla aún en una instancia no formal de validación, que implica su puesta a prueba en la región para observar cómo funciona. Se pueden por ejemplo predecir los GD para el vuelo de los adultos utilizando el modelo fenológico y luego compararlo con los GD actuales para el mismo monitoreo del vuelo utilizando las capturas en trampas como forma de muestreo, o bien la inversa. De esta manera, observando los mismos eventos y comparándolos con las predicciones del modelo durante varios años, se puede ajustarlo al área en cuestión.

La validación formal implica registrar los datos climáticos de un sitio particular, monitorear la especie plaga y combinar ambos grupos de datos con programas estadísticos para computar o relacionar GD y eventos biológicos, empleando también umbrales de temperaturas estándares que puedan provenir de otros modelos fenológicos.

El monitoreo con los GD permite conocer cuándo una plaga alcanzará sus estados más susceptibles. Si la densidad de plaga es elevada y su distribución es amplia, el monitoreo de los GD ayuda a prescindir de la decisión “intuitiva” para determinar el momento de implementación de estas acciones.

6.3 Aproximación al conocimiento de la estructura genética de poblaciones de *R. buoliana*

6.3.1 Comparación entre las poblaciones argentinas de *R. buoliana* y la población de referencia

La comparación entre ambas poblaciones puede realizarse mediante los siguientes tres parámetros principales: a) número de alelos registrado por cada locus, b) índice de fijación F_{is} y c) diversidad genética, que evidencian de manera elocuente que la variación genética en las poblaciones argentinas es muy escasa y que sólo está presente una pequeña parte de la variación genética encontrada en la población de referencia.

a) En las poblaciones argentinas el 25% de los loci analizados son polimórficos mientras que en la población patrón lo son todos los loci. Además en los dos loci polimórficos de las poblaciones argentinas sólo se registraron dos alelos mientras que en la población alemana, si bien el número predominante de alelos por locus es dos, este número varió entre 2 y 4 (Cuadro 6.2). Esterasa es el sistema con mayor grado de polimorfismo en la población alemana mostrando dos loci con tres y cuatro alelos, mientras que en las poblaciones locales uno sólo de los loci es polimórfico y con dos alelos solamente. Investigaciones realizadas en otras especies de lepidópteros del género *Choristoneura*, perteneciente a la misma familia que *R. buoliana*, han demostrado que esterasa es el sistema más altamente polimórfico (Stock y Castrovillo 1981). Estos autores registraron cinco loci con tres, cuatro, cinco y siete alelos. Asimismo en otras plagas forestales tal como el escolítido *Ips typographus* L. (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) se identificaron, en poblaciones alemanas, hasta 23 alelos en este mismo sistema (Gruppe com. pers.).

Cuadro 6.2. Cuadro comparativo del número de alelos registrado por cada locus en las poblaciones argentinas y la población de referencia.

| Locus | N° de alelos | |
|-------|--------------|-------------|
| | Pobl. arg. | Pobl. ref. |
| AAT | 1 | 2 |
| EST-1 | 1 | 4 |
| EST-2 | 2 | 3 |
| ME | 2 | No evaluado |
| G6PDH | 1 | 2 |
| HK-1 | No analizado | 2 |
| HK-2 | No analizado | 2 |
| IDH | 1 | 2 |
| MDH | 1 | 3 |
| PGM | 1 | 2 |

b) El coeficiente de endogamia o índice de fijación de Wright (Fis) obtenido para el locus EST-2 en las dos poblaciones argentinas que no cumplen con las proporciones esperadas por el equilibrio de Hardy-Weinberg, superó ampliamente al valor obtenido para el mismo locus en la población patrón aún cuando también en este caso no se cumple con las proporciones de equilibrio (Cuadro 6.3). Ello evidencia un gran déficit de heterocigotas y en cierta forma es una medida que también contribuye a calificar la escasa variación genética. La población argentina que no se desvía de las proporciones de equilibrio mostró un valor más bajo de Fis. Agrupando las muestras de las tres poblaciones argentinas el coeficiente de endogamia también superó ampliamente a su correspondiente en la población patrón, reafirmando así lo antedicho (Cuadro 6.3).

Cuadro 6.3. Cuadro comparativo de los valores de Fis en las poblaciones argentinas y la población patrón.

| Poblaciones | Fis |
|--------------------------------|----------------------|
| Pobl. <i>e</i> | 0.7723 |
| Pobl. <i>b</i> | 0.1250 |
| Pobl. <i>f</i> | 0.7268 |
| Pobl. argentina | 0.7108 |
| <i>Pobl. referencia</i> | <i>0.5053</i> |

c) La diversidad genética promedio en las poblaciones argentinas es la mitad de la diversidad registrada en la población patrón analizada y estimada como promedio de todos los loci analizados (0.1191 y 0.256 respectivamente).

6.3.2 Posibles razones que explican la variabilidad genética encontrada en las poblaciones argentinas

Son varias las razones a las que puede atribuirse la escasa variabilidad genética de las poblaciones argentinas. Por un lado, es posible que la población inicial que se estableció en plantaciones cercanas a

Esquel haya sido probablemente pequeña y con escaso grado de variabilidad (efecto fundador), de allí que la variabilidad genética encontrada sea también escasa. Por otro lado, es factible que el tiempo desde la introducción de la plaga en Argentina, Patagonia no fue suficiente para que ocurriera una divergencia genética entre poblaciones.

El flujo génico entre las poblaciones comparadas es probablemente intenso, ya que la distancia en kilómetros que las separa no es muy grande, por lo tanto hay homogeneidad. Por otro lado, dado que la estructura entre demos está controlada en gran parte por el grado de flujo génico, podría esperarse que su magnitud fuera relativamente baja en muchas especies de insectos especialmente los voladores con alta capacidad de dispersión (Mc Cauley y Goff 1988); tal como es el caso de la mariposa del brote (Pointing 1962). Incluso, estudios electroforéticos de insectos muestran a menudo niveles bajos de estructura interdemos, especialmente cuando se los compara con taxa menos vágiles tales como salamandras o caracoles terrestres aunque esta tendencia no es universal (Wright 1978 fide Mc Cauley and Goff 1988; Roderick 1996).

Los resultados obtenidos permiten descartar, en principio, la diferenciación de poblaciones en función de su asociación con distintos hospedantes. Hecho que también es respaldado por los resultados de los ensayos realizados en laboratorio y en el campo. Esto explica, en parte, que *P. radiata* y *P. ponderosa* sean igualmente susceptibles al ataque, ocurrido en los últimos años, a pesar de que *P. ponderosa* posee caracteres anatómicos y de crecimiento que la harían menos vulnerable. La diferenciación genética de poblaciones relacionada con la especie hospedante ha sido reportada a través de varias investigaciones en las que se demostró que la planta hospedante ejerce una mayor influencia que la ubicación geográfica (Jaenike 1990, Roininen *et al.* 1992, Nason *et al.* 2002). Entre otros autores, Sezer y Butlin (1998) y Huettel y Bush (1972) (fide Craig 2001) coinciden que la preferencia por el hospedante está determinada por pocos loci con dominancia por la preferencia por un solo hospedante. En *Drosophila grimshawi* Carson y Otha (1981) (fide Craig 2001) encontraron que la preferencia estaba determinada por un solo locus con dos alelos indicando que en la preferencia por el hospedante es posible la determinación genética simple.

De la misma forma la estrecha asociación con la especie hospedante puede conducir a la formación de razas, fenómeno que constituye el paso intermedio en la especiación simpátrica de los insectos herbívoros y sucede con cierta frecuencia (Craig *et al.* 1993, Abrahamson *et al.* 2001, Nason *et al.* 2002). Se han mencionado varios factores o la combinación de ellos como los responsables de esta diferenciación genética, entre ellos las preferencias de oviposición, es decir un alto grado de selectividad por parte de las hembras en la postura de huevos y también el apareamiento asociado a la especie hospedante (Abrahamson *et al.* 2001, Roininen *et al.* 1992). En este sentido, nuevamente los resultados de este trabajo han demostrado que si bien *R. buoliana* tiene preferencias de oviposición por la especie hospedante de la cual proviene, también es capaz de oviponer en otro hospedante ante la ausencia de esta especie.

Otro aspecto a tener en cuenta es que ante huéspedes similares e igualmente palatables, los insectos fitófagos prefieren generalmente el que está disponible con mayor frecuencia. Niemela *et al.* (1982) han demostrado que la frecuencia de las especies de macrolepidópteros finlandeses está positivamente correlacionada con la frecuencia de las especies de plantas. Cuando una especie de planta es

extremadamente abundante, la tasa de encuentro por los insectos es relativamente alta y, con el transcurso del tiempo, los individuos la prefieren (Pérez-Contreras 1999). La disponibilidad tanto en el espacio como en el tiempo desempeñan un rol importante en este sentido (Jaenike 1990, Mayhew 1997), por eso probablemente al aumentarse el área de las plantaciones de *P. ponderosa*, el insecto comenzó a atacar dicha especie con mayor intensidad.

El hecho de que no se haya encontrado variación genética a nivel de isoenzimas, entre poblaciones próximas asociadas con distintos huéspedes, no significa que no se pueda detectar variación a nivel de marcadores moleculares del ADN, ya sea en relación con distintos huéspedes, o con diferentes áreas geográficas. En una próxima etapa de investigación, se realizará una caracterización de poblaciones de *R. buoliana* procedentes de diferentes regiones de Argentina, Chile y de los países europeos de origen, utilizando marcadores moleculares del ADN. Mediante un enfoque filogeográfico, se intentará reconstruir la historia evolutiva de la especie en América del Sur y establecer sus vías de dispersión, comparando los datos que se obtengan, con los registros históricos conocidos.

6.3.3 Análisis de los valores de F_{st} en relación con los estándares para insectos

Los tres parámetros estadísticos de Wright representan desviaciones de la distribución de la varianza genética neutral bajo condiciones de panmixia completa. F_{st} representa el componente de la varianza genética entre poblaciones (subpoblaciones respecto del total) y relaciona la distribución de los alelos entre subpoblaciones o demos dentro del área total estudiada. El estadístico F_{is} representa los efectos del apareamiento no al azar dentro de las subpoblaciones en la distribución de la varianza genética entre individuos dentro de las subpoblaciones. Es decir que relaciona la distribución de los alelos entre organismos dentro de subpoblaciones. Usualmente se lo utiliza como una medida de endogamia o exceso de homocigotas. La relación entre ambos estadísticos da una idea de la variabilidad genética y del grado de diferenciación entre poblaciones.

Cuando los valores de F_{st} son inferiores a los de F_{is} significa que las poblaciones no están bien separadas y que existe muy poca variabilidad, tal como es el caso de las poblaciones argentinas estudiadas. Generalmente los valores de F_{st} estimados para insectos y sobre la base de estudios de isoenzimas están comprendidos entre 0.01- 0.2, aún cuando las muestras son tomadas de poblaciones distribuidas a lo largo de todo el rango de la especie (Mc Cauley & Eanes 1987 fide Mc Cauley and Goff 1988; Roderick 1996). En este rango de valores están comprendidos los valores estimados para los pares de poblaciones ***b-f*** y ***e-b*** estudiados (basados en un sólo locus) quedando excluido el par ***e-f***.

Wright (fide Hartl 1989) establece los siguientes tres intervalos de valores de F_{st} que indican distintos grados de diferenciación: a) 0.05- 0.15 = diferenciación moderada; b) 0.15- 0.25 = diferenciación grande; c) >0.25 = diferenciación muy grande. Esta clasificación es menos amplia que el rango sostenido por Mc Cauley y Eanes y de esta forma quedaría fuera del rango de la clasificación el valor de F_{st} para los pares de poblaciones ***e-f*** y ***b-f***. No obstante Wright sostiene que aún los valores inferiores a 0.05 no serían desechables. Por otra parte a pesar de que la mayoría de las especies de insectos muestran estructuras genéticas estadísticamente significativas entre subpoblaciones, éstas son a menudo de magnitud relativamente pequeña ($F_{st} < 0.10$) (Mc Cauley and Goff 1988).

7 CONCLUSIONES

El incremento de la superficie forestada con *P. ponderosa* en el área de los bosques andinopatagónicos de Chubut favoreció una mayor incidencia de ataque de *Rhyacionia buoliana* sobre dicha especie, al constituirse en un recurso más abundante y predecible para el insecto. De esta forma, la intensidad de ataque iguala a la observada sobre *P. radiata*, especialmente en los sitios donde no coexisten ambas especies forestales. Los diferentes resultados obtenidos a partir de las investigaciones realizadas sustentan esta afirmación, por ejemplo, el haber comprobado que las larvas de la mariposa “aceptan” la especie de pino en la que son implantadas a pesar de provenir de otra especie. Dado que la eficiencia de las larvas en términos de alimento consumido es variable, aún no es posible afirmar si éstas se desarrollan más eficientemente en una u otra especie de hospedante. En este sentido los resultados no muestran uniformidad con respecto a los distintos índices nutricionales obtenidos a partir de los ensayos practicados.

La información generada a través de este estudio constituye un aporte al conocimiento de la ecología nutricional de *R. buoliana*, puesto que no existen antecedentes de investigaciones al respecto. La eficiencia en la conversión del alimento ingerido por la especie es baja y está comprendida entre 5% y 19%. Del mismo modo, son también bajas la tasa relativa de consumo -valores entre 0.17 y 0.86 mg/mg/día- y la tasa relativa de crecimiento promedio, que oscila entre 0.003 y 0.02 mg/mg/día. Las larvas crecen menos que la cantidad de alimento que ingieren, lo cual podría relacionarse con la presencia de compuestos aleloquímicos en la resina tales como los fenoles.

Los resultados sobre preferencias de oviposición representan otra evidencia que sustenta el aumento en la magnitud del ataque sobre *P. ponderosa*, pues las hembras de *R. buoliana* prefieren ovipositar en la especie hospedante de la cual proceden, siempre que se les ofrezca la posibilidad de seleccionar entre especies diferentes. Si este no es el caso, las hembras depositan sus huevos sobre la especie de *Pinus* ofertada.

La susceptibilidad diferencial de ambas especies de pino frente al ataque del insecto se relaciona especialmente con la magnitud del daño observado. El tamaño de las yemas-brotes cumple un rol fundamental en este sentido; el mayor tamaño de las mismas en la especie *P. ponderosa* determina que la proporción de tejido comprometido respecto del total sea menor, compensando así el consumo significativamente superior de las larvas. Además del tamaño, la mayor superficie ocupada por el sistema de canales resiníferos presentes en las yemas contribuye a que estas yemas estén mejor defendidas.

La velocidad de crecimiento de las yemas-brotes es otra de las características fenotípicas asociadas con la susceptibilidad de las plantas. En aquellas yemas-brotes de *P. radiata* que crecen más lentamente, la intensidad de ataque es mayor y condicionaría la magnitud del daño a la planta. Esta comprobación no puede trasladarse al análisis comparado de ambas especies puesto que el incremento en longitud y diámetro de las yemas-brotes es diferente para determinados períodos del crecimiento vegetativo. No se observa una correspondencia entre el crecimiento generalmente más lento de los brotes de *P. ponderosa* - respecto de los de *P. radiata*- y una mayor intensidad de ataque. Los factores antes mencionados

propiciarían la menor susceptibilidad al ataque observado en esta especie, cuando coexiste con *P. radiata*.

Dado que el ambiente ejerce su influencia sobre estas y otras características fenotípicas, una pauta de manejo en el marco de prevención del ataque debería estar orientada al establecimiento de las especies en sitios con buena aptitud forestal, capaces de promover un rápido crecimiento y desarrollo de las yemas, posibilitando así que las plantas estuviesen en mejores condiciones de defenderse.

Desde un enfoque anatómico, en ambas especies de pinos se observan las mismas respuestas generales a la perforación producida por las larvas. El parénquima de las yemas es el tejido en el que se evidencian los mayores cambios producidos por el ataque. Las células modifican su forma, sentido de división, engrosan sus paredes y se observan llenas de gránulos.

El modelo fenológico para predecir el vuelo estacional de los machos es una herramienta importante en los sitios con alta intensidad de ataque y densidad de la plaga, en los que es indispensable implementar medidas de supresión mediante la aplicación de productos químicos que disminuyan drásticamente la densidad poblacional. Los métodos de supresión son más efectivos cuando se aplican en el momento que ha emergido una determinada proporción de adultos de la población. El modelo construido permite predecir el comportamiento del vuelo estacional de los adultos a partir de la fecha de la primera captura de los machos en trampas en el noroeste de la provincia de Chubut, empleando la temperatura base estimada para este estado.

La temperatura umbral inferior estimada para el estado adulto es de 4.2°C, mientras que para el estado de pupa y todos los estadios larvales es 3.2°C (exceptuando L1 que es 7.2°C y L6). Es posible predecir el inicio de los estadios L1, L2, L3 y L4 a partir de las temperaturas acumuladas calculadas desde la captura del primer macho en las trampas. Se necesitan entre 236 GD-257 GD, 367 GD-384 GD, 489 GD-520 GD, 791 GD-836 GD para la aparición de los respectivos estadios larvales en el campo.

El modelo construido para predecir el comportamiento del vuelo estacional de los machos constituye el primer paso para facilitar el monitoreo de la plaga, ya que no requiere del control permanente de las trampas en el campo por parte de personal capacitado. Su implementación requiere un sistema eficiente para el registro sistemático y formal de temperaturas, que esté disponible para ser empleado por los propietarios de las plantaciones. Dado que el modelo fenológico se encuentra aun en una etapa de validación informal, podría ser objeto de ajustes y correcciones en las diferentes regiones de la Patagonia, donde debería ser probado. Las cuatro temporadas monitoreadas fueron climáticamente atípicas y muy disímiles entre sí, motivo por el cual se recomienda que hasta que el modelo construido no esté completamente validado, la información relativa al comportamiento del vuelo de los adultos sea complementada con un monitoreo de la plaga mediante la instalación de trampas.

El incremento registrado en los niveles de parasitismo de *R. buoliana*, por parte del himenóptero *Orgilus obscurator* (Braconidae) en el área en estudio, es un aspecto positivo que también debería ser considerado en las pautas de manejo de la plaga, ya que este agente de control biológico se halla bien establecido en plantaciones de pinos con una antigüedad de por lo menos siete años y alta densidad poblacional de plaga. Es menester destacar también que la reciente detección del hiperparasitoide *Perissocentrus* sp.

indica que el monitoreo de los niveles de parasitismo en el campo debe ser permanente aún cuando se haya establecido el parasitoide.

En lo que respecta a los análisis electroforéticos de isoenzimas cabe destacar que éstos permitieron, en primer lugar, desarrollar y ajustar el protocolo adecuado para el estudio genético-poblacional de *R. buoliana*, dado que no se contaba con antecedentes de un trabajo de estas características en ningún sitio a lo largo de la distribución de la especie. Los resultados de esta investigación demuestran que en las poblaciones argentinas se halla presente sólo una proporción muy pequeña de la variación genética encontrada en la población procedente del área de distribución original de la plaga. Esto se evidencia en el predominio de loci monomórficos, en contraposición con la presencia de loci polimórficos en la población de referencia –Alemania-. La única variación hallada en las poblaciones argentinas de Patagonia corresponde al sistema esterasa con un solo locus polimórfico. Este sistema, que es por lo general altamente polimórfico en los insectos, resultó ser el más polimórfico en la población alemana. Del mismo modo, la cantidad de alelos identificados en esta última superó ampliamente a la de las poblaciones argentinas, y la diversidad genética duplicó a su correspondiente en las poblaciones locales.

La escasa variación intra e interpoblacional de las tres poblaciones argentinas analizadas y su similitud genética, se evidenció en valores elevados de identidad genética y del coeficiente de endogamia, los cuales indican que existe un déficit de heterocigotos. Esto se explica por el “principio fundador” -una plaga introducida representa sólo una pequeña fracción de la variación genética de la especie- y por el escaso tiempo transcurrido desde la introducción del insecto. Por otra parte los resultados obtenidos señalan que no existe una diferenciación genética poblacional asociada con los distintos hospedadores de *R. buoliana* en el área de estudio -plantaciones de *P. ponderosa* y *P. radiata*-, aunque es posible que haya algún tipo de diferencia en lo que respecta al alelo más frecuente presente en las mismas. Para corroborar esta hipótesis será necesario abarcar un mayor número de poblaciones asociadas con ambos hospedantes tanto en Argentina como en Chile, y emplear marcadores moleculares del ADN (microsatélites o ADN mitocondrial), los cuales permiten realizar una mejor caracterización poblacional, especialmente cuando se trata de poblaciones que han divergido recientemente. Asimismo estos métodos moleculares se están empleando con éxito para determinar con precisión el o los sitios de origen de las especies plaga y sus principales vías de dispersión.

8 LITERATURA CITADA

- Abrahamson, W.; M. Eubanks; C. Blair y A. Whipple. 2001. Gall flies, inquilines and goldenrods: a model for host-race formation and sympatric speciation. *Am. Zool.* 41: 928-938.
- Arnold, C. 1959. The determination and significance of the base temperature in a linear heat unit system. *Am. Soc. For Horticultural Science.* 74: 430- 445.
- Arnold, C. 1960. Maximum- minimum temperatures as basis for computing heat units. *Am. Soc. For Horticultural Science.* 76: 682- 692.
- Baldini, A.; G. Alvarez de Araya; G. Tornquist y O. Puentes. 1993. Evaluación de las pérdidas de volumen aprovechable ocasionadas por la polilla del brote en plantaciones de pino. CONAF. Departamento de Manejo y Desarrollo Forestal. Santiago. Chile. 22 pp.
- Baldini, A. y G. Alvarez de Araya. 1998. Evaluación de pérdidas económicas en plantaciones de *Pinus radiata* ocasionadas por polilla del brote. Actas del Congreso Latinoamericano de Plagas Forestales. IUFRO. Chile.
- Barbosa, P. y M. Wagner. 1987. Introduction to Forest and Shade tree insects. Academic Press. 578 pp.
- Bean, L. y F. Wilson. 1964. Comparing various methods for predicting development of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*, in northern Minnesota. *J. Econ. Entomol.* 57 (6): 925-928.
- Brewer, M.; F. Boleslaw; R. Montenegro y K. Naumann. 1968. Datos y conclusiones preliminares sobre la mariposita del ápice de los pinos *Rhyacionia buoliana* (Den. & Schiff.) (Lepid. Tortricidae) en el Valle de Calamuchita, Córdoba. Fac. de Cs. Exactas, Físicas y Naturales. Informe Técnico. 38 pp.
- Carabelli, F.; S. Antequera; G. Martín y M. Gomez. 2000. Análisis Ambiental y Social de las Cuencas Hidrográficas Cordilleranas de la Provincia del Chubut. CIEFAP- GTZ-Dirección General de Bosques y Parques. Serie Técnica N° 5. 56 pp.
- Cimma Bozzo, F. 1986. Determinación del ciclo biológico de la polilla del brote *Rhyacionia buoliana* Den. et Schiff., en la décima región del país. Tesis Ing. Forestal. Santiago, Chile, Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 80 pp.
- Cisternas, E. y E. Zuñiga. 1988. Crianza artificial de la polilla europea del brote del pino, *Rhyacionia buoliana* Den. Et Schiff. (Lep.: Tortricidae). Agricultura Técnica 48 (1): 48- 50.
- CONAF. 1993. Estrategia nacional para el control integrado de la polilla del brote temporada 1993-1994. Documento Técnico 74. Chile Forestal. 8 pp.

- Confaloniari, V.; J. Vilardi y B. Saidman. 1990. Esterase variation among Argentine populations of *Trimerotropis pallidipennis* (Orthoptera). *Genet. Sel. Evol.* 22 : 279-288.
- Craig, T. ; J. Itami ; W. Abrahamson y J. Horner. 1993. Behavioral evidence for host- race formation in *Eurosta solidaginis*. *Evolution* 47(6): 1696-1710.
- Craig, T.; J. Horner y J. Itami. 2001. Genetics, experience, and host- plant preference in *Eurosta solidaginis*: implications for host shifts and speciation. *Evolution* 55 (4): 773- 782.
- D´Ambrogio de Argüeso, A. 1986. Manual de técnicas en histología vegetal. Ed. Hemisferio Sur. 83 pp.
- Daterman, G. 1972. Effects of high temperature and vapor pressure deficit on european pine shoot moth, *Rhyacionia buoliana* (Lepidoptera: Olethreutidae), egg production and survival. *Can. Ent.* 104: 1387- 1396.
- Dean, L.; M. Haynes y J. Butcher. 1961. An evaluation of some larval growth criteria in European Pine Shoot Moth larvae. *Can. Ent.* 43: 561- 563.
- De Ferrari Fontecilla, L. 1997. Bases para definir la estrategia de control del daño provocado por la polilla del brote (*Rhyacionia buoliana* Den. et Schiff.). Documento Técnico Controladora de Plagas Forestales. 19 pp.
- De Groot, P. y J. Turgeon. 1998. Insect pine interactions. In Ecology and Biogeography of *Pinus*. 354-380 pp. Ed. Richardson, D. Cambridge University Press.
- Dent, D. y M. Walton. 1997. Quantifying insect populations: estimates and parameters. En Methods in ecological and agricultural entomology. Eds. Dent, D.; M. Walton. CAB International. 385 pp.
- Escherich, K. 1930. Die Forstinsekten Mitteleuropas. Tomo III. Ed. Parey. Berlin. 825 pp.
- Franceschi, V.; T. Krekling; A. Berryman y E. Christiansen. 1998. Specialized parenchyma cells in Norway spruce (Pinaceae) bark are an important site of defense reaction. *Am. J. of Botany* 85(5):601-615.
- Gargiulo, P.; C. Berisford; C. Canals; J. Richmond y S. Cade. 1984. Mathematical descriptions of *Rhyacionia frustrana* (Lepidoptera: Tortricidae) cumulative catches in pheromone traps, cumulative eggs hatching and their use in timing of chemical control. *Environmental Entomology* 13 (6): 1681- 1685.
- Gomez, C. 2001. Studies on the adaptation of the European pine shoot moth *Rhyacionia buoliana* (Den. et Schiff.) to *Pinus ponderosa* (Laws) in Patagonia, Argentina. Informe técnico a la International Foundation for Science, Suecia. 33 pp.

- Gomez, C. 2003. Relación entre la acumulación de días grado y el vuelo estacional de la mariposa europea del brote del pino en Esquel, Argentina. *Bosque*. 24: 1.
- Gruppe, A.; P. Männer, y G. Müller-Starck. 2001. Untersuchungen zur Resistenz von Kiefern (*Pinus sylvestris* L.) gegenüber *Blastethia turionella* L. (Lepidoptera, Tortricidae).
- Hale, F. 2000. Decision- making handbook for insect and mite pests of ornamental plants. Agricultural Extension Service. University of Tennessee. 28 pp.
- Harris, P. 1960. Production of pine resin and its effect on survival of *Rhyacionia buoliana* (Schiff.) (Lepidoptera: Olethreutidae). *Can. J. Zool.* 38: 121-131.
- Hartl, D. 1989. Principles of genetic differentiation. Sinauer Associates, inc. Publishers. 488 pp.
- Higley , L.; L. Pedigo y K. Ostle. 1986. DEGADAY: A program for calculating degree- days, and assumptions behind the degree- day approach. *Environ. Entomol.* 15 (5): 999- 1016.
- Hillis, D. y C. Moritz. 1990. Molecular Systematics. Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachussetts, USA.. 588 pp.
- Hodges, J.; W. Elam; W. Watson y E. Nebeker. 1979. Oleoresin characteristics and susceptibility of four southern pines to southern pine beetle (Coleoptera: Scolytidae) attacks. *Can. Ent.* 111: 889-896.
- Ide, S. y D. Lanfranco. 1994. Fluctuaciones poblacionales de *Rhyacionia buoliana* (Lep.: Tortricidae) en una plantación de *Pinus radiata* en la X Región. *Bosque*: 15(2): 39-44.
- Jaenike, J. 1990. Host specialization in phytophagous insects. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21: 243- 273.
- Johnson, W. y H. Lyon. 1991. Insects that feed on trees and shrubs. Cornell University Press. Second Edition 560 pp.
- Jones, V.; D. Davis; S. Smith y D. Allred. 1989. Phenology of apple maggot (Diptera Tephritidae) associated with cherry and hawthorn in Utah. *J. Econ. Entomol.* 82: 788- 792.
- Juillet J. 1960. Immature stage, life histories and behavior of two hymenopterous parasites of the European pine shoot moth, *Rhyacionia buoliana* (Schiff.) (Lepidoptera: Olethreutidae). *Can. Ent.* 92: 342- 346.
- Klasmer, P.; D. Lanfranco; E. Botto; S. Die y J. Villacide. 1999. Evaluación física y biológica del daño ocasionado por la mariposa europea del brote del pino: *Rhyacionia buoliana* Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) en las provincias de Río Negro y Chubut (Argentina): Avances hacia su control biológico y evaluación económica. Informe de avance inédito.

- Kogan, M. y D. Cope. 1974. Feeding and nutrition of insects associated with soybeans. Food intake, utilization, and growth in the soybean Looper, *Pseudoplusia includens*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 67 (1): 66- 72.
- Lanfranco, D.; S. Ide; E. Rojas; C. Ruiz; R. Carrillo; C. Martínez; P. Jofré; A. Simeone; R. Schlatter; J. Valencia y R. Calderón. 1997. Biocontroladores nativos de *Rhyacionia buoliana* en Chile. Informe técnico. UACH. 52 pp.
- Lindsey, A. y J. Newman. 1956. Use of official weather data in spring time temperature analysis of an Indiana phenological record. *Ecology* 37 (4): 812- 823.
- Mayhew, P. 1997. Adaptive patterns of host-plant selection by phytophagous insects. *Oikos* 79: 417-428.
- Mc Cauley, D. y P. Goff. 1988. Intrademic genetic structure and natural selection in insects. Cap. IX. En S. Mopper y S. Strauss (Eds.), Genetic structure and local adaptation in Natural insect populations. Effects of ecology, life history and behavior. Chapman & Hall. 449 pp.
- Miller, W. y R. Neiswander. 1955. Biology and control of the European pine shoot moth. *Ohio Agric. Expt. Sta. Res. Bull.* 760. 31 pp.
- Miller, W. y H. Heikkinen. 1959. The relative susceptibility of eight pine species to European pine shoot moth attack in Michigan. *Jour. For.* 57: 912-914.
- Mitchell, G. y L. Sower. 1991. Life history of the western pine shoot borer (Lepidoptera: Olethreutidae) and effects on lodgepole pine in Central Oregon. *J. Econ. Entomol.* 84 (1): 206- 211.
- Mopper, S. y D. Simberloff. 1995. Differential herbivory in an oak population: the role of plant phenology and insect performance. *Ecology* 76 (4): 1233-1241.
- Nagy, N.; V. Franceschi; H. Solheim; T. Krekling y E. Christiansen. 2000. Wound induced traumatic resin duct development in stems of Norway spruce (Pinaceae): anatomy and cytochemical traits. *Am. J. of Botany* 87(3):302-313.
- Nason, J. ; S. Heard y F. Williams. 2002. Host-associated genetic differentiation in the goldenrod elliptical-gall moth, *Gnorimoschema gallaesolidaginis* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Evolution* 57(7): 1475-1488.
- Niemela, P.; J. Tahvanainen; J. Sorjonen; T. Hokkanen y S. Neuvonen. 1982. The influence of host plant growth form and phenology on the life strategies of Finnish macrolepidopterous larvae. *Oikos* 39: 164-170.

- Palma Prieto, M. 1995. Relación entre la acumulación de grados día y el ciclo biológico de la polilla del brote (*Rhyacionia buoliana* Den. et Schiff.) en la zona de Los Arenales, VIII Región. Tesis de grado. Universidad Austral de Chile. 186 pp.
- Panda, N. y G. Khush. 1995. Host Plant Resistance to Insects. CAB International, 431 pp.
- Pérez-Contreras, T. 1999. La especialización en los insectos fitófagos: una regla más que una excepción. *Bol. SEA* N°26: 759-776. España.
- Pointing, P. 1961. The biology and behaviour of the European pine shoot moth (*Rhyacionia buoliana* Schiff.) in Southern Ontario. I. Adult. *Can. Ent.* 93 (12): 1098- 1112.
- Pointing, P. 1962. Flight and dispersal of the European pine shoot moth, *Rhyacionia buoliana* (Schiff.). II. Natural dispersal of egg- laden females. *Can. Ent.* 94 (1): 299- 314.
- Pointing, P. 1963. The biology and behaviour of the European pine shoot moth (*Rhyacionia buoliana* Schiff.) in Southern Ontario. II. Egg, larva and pupa. *Can. Ent.* 95: 884- 863.
- Potter, D. y G. Timmons. 1983. Forecasting emergence and flight of the lilac borer (Lepidoptera: Sesiidae) based on pheromone trapping and degree- day accumulations. *Environ. Entomol.* 12: 400- 403.
- Potter, D.; M. Jensen y F. Gordon. 1989. Phenology and degree-day relationship of the obscure scale (Homoptera: Diaspididae) and associated parasites on pin oak in Kentucky. *J. Econ. Entomol.* 82: 551- 555.
- Prado, P. y E. Monteiro Vieira. 1999. The interplay between plant traits and herbivore attack: a study of a stem galling in the neotropics. *Ecological Entomology.* 24: 80-88.
- Pruess, K. 1983. Day- degree methods for pest management. *Environ. Entomol.* 12 (3): 613- 619.
- Regan, R.; J. De Angelis y G. Gredler. 1991. Predicting seasonal flight of european pine shoot moth (Lepidoptera: Tortricidae) in western Oregon. *Environ. Entomol.* 20 (5): 1403- 1406.
- Richmond, J.; H. Thomas y H. Bhattacharyya. 1983. Predicting spring flight of Nantucket pine tip moth (Lepidoptera: Olethreutidae) by het unit accumulation. *J. Econ. Entomol.* 76: 269- 271.
- Robredo, F. 1970. Contribución al conocimiento de la bioecología de *Rhyacionia buoliana* Schiff. y sus daños. *Bol. Serv. de Plagas Forestales* 13 (26) 181- 186.
- Robredo, F. 1978. Contribución al conocimiento de la bioecología de *Rhyacionia buoliana* Schiff.(Lep.: Tortricidae). II Estudio de los estados inmaduros: puesta, oruga y crisálida. *Bol. Serv. de Plagas Forestales* 4 (1):69-88.

- Roderick, G. 1996. Geographic structure of insect populations: Gene flow, phylogeography and their uses. *Ann. Rev. Entomol.* 41: 325- 352.
- Rodríguez, R.; S. Gómez y M. Alonso. 2001. Disponibilidades calóricas y su variabilidad en la Argentina. *Rev. Arg. de Agrometeorología.* 1 (2): 61- 69.
- Roininen, H.; J. Vuorinen; J. Tahvanainen y R. Julkunen-Tihito. 1992. Host preference and allozyme differentiation in shoot galling sawfly, *Euura atra*. *Evolution* 47(1): 300-308.
- Sacher, J. 1954. Structure and seasonal activity of the shoot apices of *Pinus lambertiana* and *Pinus ponderosa*. *Am. J. of Botany* 41: 747-759.
- Schröder, D. 1966. Zur Kenntnis der Systematik und Ökologie der *Evetria*- Arten (Lepid.- Tortricidae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 58: 279- 307.
- Schröder, D. 1978. Eucosmini und Olethreutini. En Schwenke: Die Forstschädlinge Europas. Tomo III. Ed. Parey. Berlin 109-134.
- Sokal, R. y F. Rolf. 1999. Introducción a la bioestadística. Ed. Reverté. México. 362 pp.
- Stock, M. y P. Castrovillo. 1981. Genetic relationships among representative populations of five *Choristoneura* species: *C. occidentalis*, *C. retiniana*, *C. biennis*, *C. lambertiana* y *C. fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Ent.* 113: 857-865.
- Vallejos Morán, R. 1992. Efecto de *Rhyacionia buoliana* (Schiff.) en el crecimiento de plantaciones jóvenes de *Pinus radiata* D. Don en la X Región. Tesis de grado. UACH. Chile. 73 pp.
- Wagner, M. y Z. Zhang 1993. Host plant traits associated with resistance of ponderosa pine to the sawfly, *Neodiprion fulviceps*. *Can. J. For. Res.* 23: 839-845.
- Wang, J. 1960. A critique of the heat unit approach to plant response studies. *Ecology* 41: 785- 790.
- Weir, B. 1990. Genetics data analysis. Sinauer Associates, Sunderland, M. A.
- Willhite, E. y M. Stock. 1983. Genetic variation among western spruce budworm (*Choristoneura occidentalis*) (Lepidoptera: Tortricidae) outbreaks in Idaho and Montana. *Can. Ent.* 115: 41-54.
- Yeh, F.; R. Yang; T. Boyle; B. Ye y M. Judy. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.