



Facultad de
Ciencias Agrarias
y Forestales



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

Evaluación del parasitoide nativo *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethylinidae) para el control biológico aumentativo de la polilla de la vid *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae)

Tesis doctoral presentada para obtener el título de Doctor de la Facultad Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata

Doctorando: Ing. Agr. Bruno Marcucci



Febrero 2024

Mendoza, Argentina

Dirección: Dra. María
Gabriela Luna

Co-dirección: Dra. Liliana
Cichón

Agradecimientos

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) por darme la posibilidad de desarrollar mi tesis en las instalaciones de la EEA Mendoza junto al grupo del sector de Fitofarmacia y financiar la beca doctoral

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por financiar la beca doctoral la que me permitió realizar este trabajo de tesis.

A mis directores de tesis Gabriela Luna y Liliana Cichón por acompañarme y aconsejarme con su sabiduría.

A Nahir mi compañera de vida que me alentó en todo momento y ayudó, inclusive acompañándome al campo a montar los ensayos.

Al grupo del sector Fitofarmacia de INTA Emilia, Violeta, Daniel, Juan Carlos, Graciela, Eugenia Turaglio, Rosanna, Misael, Carla y Eugenia Herrera quienes me ayudaron cuando lo necesité, sin los cuales no habría podido realizar mi trabajo de tesis.

A Charly De Borbón amigo y colega, cuyos consejos y ayuda mejoraron ampliamente la calidad del trabajo de tesis y de mi persona.

Luis Gómez Manresa que me brindó su viñedo para poder realizar los ensayos en campo y cuya comprensión por los insectos hizo más fácil el trabajo.

A mis amigos Javier Chaar y Marco Seguí, que cuando necesité allí estuvieron.

A Silvina Garrido que con su fuerza y energía me impulsó para llevar adelante los ensayos pendientes y su buena predisposición para enviarme el material que los hizo posibles.

A mis padres que me ayudaron para desarrollarme profesionalmente y apoyaron en mis decisiones.

A mis hermanos y hermanas ...

Abreviaturas

ACB: agente de control biológico

CBA: control biológico aumentativo

Cp: *Cydia pomonella*

CP: cuidado parental

EEA: Estación Experimental Agropecuaria

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

IO: índice de ovigenia

LB: *Lobesia botrana*

NDE: nivel de daño económico

OC: oviposición continua

OTA: ocratoxina A

PI: *Plodia interpunctella*

PIO: periodo inter-oviposición

PPO: periodo pre-oviposición

PSS: proporción sexual secundaria

TCS: técnica de confusión sexual

TIE: técnica del insecto estéril

VIH: volátiles inducidos por herbívoros

UE: umbral económico

Publicaciones derivadas de la Tesis

Presentaciones en eventos científicos

Marcucci, B., Garrido, S. A., Cichón, L. y Luna, M. G. (2023). Evaluation of the native parasitoid *Goniozus legneri* for augmentative biological control of the European grapevine moth *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) in vineyards of Mendoza. Argentina. Presentación oral en 7 th International Entomophagous Insects Conference. CABA, 2023.

Marcucci, B., Garrido, S. A., Cichón, L. y Luna, M. G. (2023). Olfactory cues exploited by *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethyridae) while foraging the European grapevine moth. Póster en 7 th International Entomophagous Insects Conference. CABA, 2023.

Marcucci, B., Mazzitelli, M. E., Puebla, H. D., & Becerra, V. C. (2022). Parasitoides de *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) presentes en viñedos de Mendoza, Argentina. XI CAE y XII CLE. *Publicación Especial Sociedad Entomológica Argentina* (ISSN En línea 2953-4178) 4: 234. Disponible en: <https://seargentina.com.ar/publicacion-especial-sea/>

Marcucci, B., Garrido, S. A., Cichón, L., Luna, M. G. y Becerra, V. C. (2022) Tabla de vida del parasitoide *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethyridae) sobre su hospedero *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). Argentina. San Miguel de Tucumán. XI CAE y XII CLE. *Publicación Especial Sociedad Entomológica Argentina* (ISSN En línea 2953-4178) 4: 234. Disponible en: <https://seargentina.com.ar/publicacion-especial-sea/>

Marcucci, B. (2019) Nueva asociación *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethyridae) y *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae): evaluación para control biológico inundativo en viñedos. Argentina. Santa Rosa. Encuentro. VII Reunión Argentina de Parasitoidólogos. Facultad de Agronomía, UNLPam. Revista Semiárida 29(Supl.): 91-93. Disponible en: <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/semiarida/issue/view/336>

Publicaciones en revistas científicas

Marcucci, B., Mazzitelli, M. E., Garrido, S. A., Cichón, L. I., Becerra, V. C., & Luna, M. G. (2023). Presencia de *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethyridae) y su asociación con lepidópteros plaga en el oasis cultivado Norte de la provincia de Mendoza, Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 82(2): 63-69. <https://doi.org/10.25085/rsea.820209> Disponible en: <https://www.biotaxa.org/RSEA/article/view/76917>

Índice

AGRADECIMIENTOS	II
ABREVIATURAS	III
PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS	IV
RESUMEN	VII
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	13
1.1 PARADIGMAS EN EL MANEJO DE PLAGAS	14
1.2 EL CULTIVO DE VID EN MENDOZA: ESTATUS SANITARIO	15
1.3 POLILLA DE LA VID, <i>LOBESIA BOTRANA</i>	17
1.3.1 DISTRIBUCIÓN	17
1.3.2 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA	18
1.3.3 BIOLOGÍA Y DAÑOS	20
1.3.4 MÉTODOS DE CONTROL	23
1.3.5 CONTROL BIOLÓGICO	31
1.4 CONTROL BIOLÓGICO EN <i>L. BOTRANA</i>	36
1.5 EL PARASITOIDE, <i>GONIOZUS LEGNERI</i>	42
1.5.1 TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA	42
1.5.2 BIOLOGÍA	44
1.5.3 ANTECEDENTES DEL PARASITOIDE	46
1.6 OBJETIVOS E HIPÓTESIS	47
CAPÍTULO 2. PRESENCIA DE <i>GONIOZUS LEGNERI</i> (HYMENOPTERA: BETHYLIDAE) Y SU ASOCIACIÓN CON LEPIDÓPTEROS PLAGAS EN EL OASIS NORTE DE LA PROVINCIA DE MENDOZA, ARGENTINA	49
2.1 INTRODUCCIÓN	50
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	53
2.2.1 SITIOS DE MUESTREO	53
2.2.2 MUESTREOS	57
2.2.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS PARASITOIDES	58
2.3 RESULTADOS	60
2.4 DISCUSIÓN	64
CAPÍTULO 3. BIOLOGÍA Y PARÁMETROS POBLACIONALES DE <i>GONIOZUS LEGNERI</i> CRIADO SOBRE <i>LOBESIA BOTRANA</i>	67
3.1 INTRODUCCIÓN	68
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	70
3.2.1 HOSPEDERO Y PARASITOIDE	70

3.2.2 SUPERVIVENCIA Y TIEMPOS DE DESARROLLO DE ESTADOS PRE-IMAGINALES	73
3.2.3 PARÁMETROS POBLACIONALES	73
3.3 RESULTADOS	75
3.3.1 OBSERVACIONES DEL COMPORTAMIENTO DE OVIPOSICIÓN DE <i>G. LEGNERI</i> SOBRE <i>L. BOTRANA</i>	75
3.3.2 SUPERVIVENCIA Y TIEMPOS DE DESARROLLO DE ESTADOS PRE-IMAGINALES	76
3.3.3 PARÁMETROS POBLACIONALES	78
3.4 DISCUSIÓN	80

CAPÍTULO 4. FORRAJEO DEL HOSPEDERO: PISTAS OLFATIVAS UTILIZADAS Y PREFERENCIA POR DISTINTOS HOSPEDANTES

4.1 INTRODUCCIÓN	86
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	89
4.2.1 MATERIAL EMPLEADO	89
4.2.2 ENSAYO DE DOBLE ELECCIÓN DE HEMBRAS DE <i>G. LEGNERI</i> FRENTE A DISTINTAS ESPECIES DE HOSPEDEROS	89
4.2.3 TAMAÑO CORPORAL DE LA PROGENIE DE <i>G. LEGNERI</i> SEGÚN LA ESPECIE DEL HOSPEDERO SOBRE LA QUE SE DESARROLLAN	91
4.2.4 PISTAS OLFATIVAS UTILIZADAS POR <i>GONIOZUS LEGNERI</i> EN EL FORRAJE DE LA POLILLA DE LA VID <i>L. BOTRANA</i> EN INTERACCIÓN CON RACIMOS DE VID (<i>VITIS VINIFERA</i> VAR. MALBEC)	92
4.3 RESULTADOS	95
4.3.1 ENSAYO DE DOBLE ELECCIÓN DE HEMBRAS DE <i>G. LEGNERI</i> FRENTE A DISTINTAS ESPECIES DE HOSPEDEROS	95
4.3.2 TAMAÑO CORPORAL DE LA PROGENIE DE <i>G. LEGNERI</i> SEGÚN LA ESPECIE DEL HOSPEDERO SOBRE LA QUE SE DESARROLLAN	96
4.3.3 PISTAS OLFATIVAS UTILIZADAS POR <i>GONIOZUS LEGNERI</i> EN EL FORRAJE DE LA POLILLA DE LA VID <i>L. BOTRANA</i> EN INTERACCIÓN CON RACIMOS DE VID (<i>VITIS VINIFERA</i> VAR. MALBEC)	98
4.4 DISCUSIÓN	99

CAPÍTULO 5. LIBERACIONES INUNDATIVAS EN JAULAS DE INCLUSIÓN

5.1 INTRODUCCIÓN	104
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	107
5.2.1 MATERIAL EMPLEADO	107
5.2.2 ÁREA DE ESTUDIO	107
5.2.3 EXPERIMENTO DE LIBERACIÓN CONFINADA DE <i>G. LEGNERI</i>	108
5.3 RESULTADOS	111
5.4 DISCUSIÓN	114

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

6.1 DISCUSIÓN GENERAL	119
6.2 CONCLUSIONES GENERALES	120
6.3 INVESTIGACIONES FUTURAS	122

BIBLIOGRAFÍA

Resumen

Estamos transitando una crisis de la agricultura y es necesario hacer una agricultura sustentable, en busca de disminuir el uso de insumos, entre estos los insecticidas para el control de plagas. Es por ello que el manejo de plagas requiere una mayor investigación hacia alternativas que permitan una transición desde la agricultura convencional a formas de agricultura sustentables. El control biológico aumentativo es una opción para aquellas plagas clave en dónde un manejo ambiental no es suficiente. Por este motivo en la presente Tesis se evaluó al parasitoide nativo *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethyridae) para un control biológico aumentativo de la polilla de la vid en Mendoza.

En el año 2010 ingresa a la Argentina la polilla de la vid (*Lobesia botrana* (Den. et Schiff.)), plaga cuarentenaria que provoca pérdidas directas por el consumo de inflorescencias y bayas en los viñedos e indirectas por el ingreso de podredumbres y generación de toxinas que se encuentra en uvas y vino. Los insecticidas junto con la técnica de confusión sexual son las principales herramientas que disponen los productores para su control. En cuanto al control biológico y de acuerdo a la información disponible, *G. legneri* muestra cualidades promisorias por lograr reducir las poblaciones de plagas de hábitos similar en otros cultivos y alrededor del mundo. Es por ello que se propuso a esta especie como un posible agente de control biológico aumentativo de la polilla de la vid.

Un primer paso fue averiguar si *G. legneri*, por tratarse de un parasitoide nativo, se encontraba presente atacando a la plaga de interés. Mediante un extensivo monitoreo entre los años 2019-2022, se encontró a este parasitoide en cuatro distritos del oasis Norte de la provincia de Mendoza parasitando a tres lepidópteros plaga: *L. botrana* en vid, a *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) en nogal y “espinillo” (*Vachellia caven*) y a *Cydia pomonella* (L.) en nogal. Para corroborar la identificación de la especie del parasitoide y la interfertilidad entre poblaciones, se realizaron estudios de la genitalia de machos y cruzamientos entre poblaciones silvestres y en cautiverio que resultaron en una F2 viable. Se reportó por primera vez la presencia de *G. legneri* como parasitoide de *L. botrana* en viñedos de Argentina en condiciones naturales de cultivo, y de esta forma se constata una nueva asociación parasitoide-hospedador en la provincia.

Las tablas de vida pueden aportar información sobre la biología y parámetros demográficos que hacen al desempeño de un parasitoide al controlar su hospedador. Por ello, se buscó estudiar la biología y atributos reproductivos de *G. legneri* al parasitar *L. botrana* teniendo

en cuenta dos condiciones de cría: con cuidado parental, un comportamiento reproductivo característico de esta especie, o no permitiéndolo. Se hizo un seguimiento de 50 larvas de quinto estadio de *L. botrana* parasitadas para determinar tiempos de desarrollo y supervivencia preimaginal. Para determinar parámetros reproductivos y poblacionales a partir de tablas de vida horizontales, hembras copuladas se colocaron junto a larvas del quinto estadio en las dos condiciones mencionadas: reemplazando nuevas larvas una vez realizada la oviposición o bien cambiándolas cuando la progenie comenzaba a tejer el cocón, permitiendo el comportamiento de cuidado parental. El tiempo de desarrollo de huevo a adulto de *G. legneri* fue de 15 días a 25 °C con un porcentaje de supervivencia de 25%. La primera postura de hembras sin experiencia previa fue de 9,1 huevos por larva, mientras que al otorgarse continuamente larvas para oviponer descendió a 3,76 huevos por larva y cuando hubo un periodo de cuidado parental depositaron 7,30 huevos por larva. Cuando se le permitió oviponer de forma continua, el parasitoide tuvo una tasa intrínseca de crecimiento (r_m) de 0,09 significativamente mayor que cuando el tiempo de cuidado parental fue permitido, mostrando un menor potencial reproductivo con un r_m de 0,05. Ambas r_m fueron mayores a cero, lo que indica que el parasitoide puede crecer sobre *L. botrana*. Sin embargo, la supervivencia de los individuos inmaduros y la proporción sexual secundaria son bajas en relación con las obtenidas sobre otros lepidópteros lo que podría indicar que *L. botrana* es un hospedero de baja calidad para el parasitoide.

Los betílidos pueden encontrar hospederos ocultos orientados por señales olfativas como las contenidas en las heces y la seda producida por larvas fitófagas al alimentarse. Se indagó sobre aspectos en el forrajeo de hospederos por parte de *G. legneri*. Se evaluó preferencia por distintas especies y se comenzaron a dilucidar las posibles fuentes de señales volátiles utilizadas por *G. legneri* para ubicar a las larvas hospederas dentro de las galerías que forman para alimentarse. En una prueba de doble elección se analizó la preferencia del parasitoide por distintos hospederos: *L. botrana*, *C. pomonella* y *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). Se encontró que *G. legneri* prefiere *P. interpunctella* por sobre *C. pomonella* y *L. botrana*, y entre estas últimas dos fue indiferente. En cuanto a la capacidad innata de explotar posibles volátiles provenientes de racimos atacados por *L. botrana*, se probaron diferentes fuentes de olores en un olfatómetro de tubo en Y: 1) racimo entero: un racimo de vid en los estados de inflorescencia/bayas verdes/bayas en envero con la presencia de daño de *L. botrana*, seis larvas en el quinto estadio y sus heces; 2) larvas: seis larvas de *L. botrana* de quinto estadio solas, alimentadas en racimos de cada estado fenológico considerado anteriormente; 3) heces: de larvas

alimentadas en cada estado fenológico de la planta; 4) racimo dañado: por *L. botrana* pero solo con presencia de seda tejida por las larvas hospederas en cada estado fenológico. Se expuso individualmente a hembras sin experiencia del parasitoide a un estímulo a la vez en uno de los brazos del olfatómetro mientras que en el otro brazo circulaba aire limpio como control. El tiempo de residencia arrojó diferencias significativas para aquellos tratamientos en la etapa de baya verde que incluyeron racimos enteros (1) 75" vs 46" para aire limpio, y racimos con daño solamente (4) 84" vs 35" en aire limpio. En conclusión, *G. legneri* puede encontrar a *L. botrana* principalmente en racimos en el estado fenológico de baya verde mediante señales olfativas provocadas por la alimentación de la larva. Estas características indican que este agente de control biológico es capaz de localizar a *L. botrana* aun cuando provenga de la cría artificial sobre otro hospedante y en el estado fenológico de baya verde.

Para evaluar el impacto de *G. legneri* sobre la densidad de *L. botrana* se realizaron liberaciones en jaulas de inclusión. El diseño de jaulas de inclusión permite manipular las poblaciones de la plaga y el enemigo natural dentro de las mismas encerrando partes de una planta o de un sector que ocupa un cultivo. Para determinar experimentalmente el grado de control de *G. legneri* sobre *L. botrana* en condiciones de semicampo se emplearon jaulas (1x 0,5m) que encerraron brotes de vid enteros, cada uno con dos racimos, luego se infestaron artificialmente con la plaga y se liberaron hembras de *G. legneri*, a una densidad relativa de 1:1 (hospedador:parasitoide). Las liberaciones se repitieron en las tres generaciones de la plaga en el cultivo por temporada y durante tres temporadas consecutivas (2018-2021). Se registró una reducción de alrededor del 50% de su densidad en la segunda generación de la plaga, en la temporada 2019-20, aunque se constató que los niveles de daño de *L. botrana* no disminuyeron. Los resultados obtenidos se corresponden con lo observado en los ensayos en olfatómetro en donde solamente en el estado de baya verde (segunda generación) el parasitoide pudo orientarse hacia el hospedero.

En base a los resultados obtenidos, se concluye que *G. legneri* no es capaz de controlar naturalmente a la polilla de la vid. También se ha comprobado que *L. botrana* es un hospedador de baja calidad. Por otro lado, en condiciones de semicampo se alcanzó en la segunda generación ca. 50% del nivel de control, un resultado prometedor. Se proponen futuras investigaciones sobre la acción depredadora sobre *L. botrana*, estudiar estrategias que promuevan el control biológico mediante la conservación del parasitoide y continuar con la evaluación en campo ensayando diferentes dosis de liberación.

Abstract

We are going through a crisis in agriculture and sustainable agriculture is necessary, which seeks to reduce the use of inputs, including insecticides for pest control. This is why pest management requires further research towards alternatives that allow a transition from a conventional model to a sustainable agriculture. Augmentative biological control is an option for those key pests where environmental management is not sufficient. For this reason, in the present Thesis the native parasitoid *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethyridae) was evaluated for an augmentative biological control of the European grapevine moth in Mendoza.

In 2010, the European grapevine moth (*Lobesia botrana* (Den. et Schiff.)) entered Argentina, a quarantine pest that causes direct losses through the consumption of inflorescences and berries in vineyards and indirect losses through the entry of rot and generation of toxins presents in grapes and wine. Insecticides together with mate disruption are the main tools available to growers for its control. As for biological control and according to available information, *G. legneri* shows promising qualities for reducing populations of similar pests in other crops and around the world. For this reason, this species was proposed as a possible agent for augmentative biological control of the grapevine moth.

A first step was to find out if *G. legneri*, being a native parasitoid, was present attacking the pest of interest. Through extensive monitoring between 2019-2022, this parasitoid was found in four districts of the northern oasis of Mendoza province parasitizing three lepidopteran pests: *L. botrana* on grapevine, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) on walnut and "espinillo" (*Vachellia caven*) and *Cydia pomonella* (L.) on walnut. To corroborate the identification of the parasitoid species and interfertility between populations, genitalia studies of males and crosses between wild and captive populations that resulted in a viable F2. This is the first report of the presence of *G. legneri* as a parasitoid of *L. botrana* in vineyards in Argentina under natural growing conditions, thus confirming a new parasitoid-host association in the province.

Life tables can provide information on the biology and demographic parameters that affect the parasitoid's performance in controlling its host. Therefore, we sought to study the biology and reproductive attributes of *G. legneri* when parasitizing *L. botrana* taking into account two rearing conditions, with parental care, a reproductive behavior characteristic of this species, or not allowing it. Fifty parasitized fifth instar larvae of *L. botrana* were monitored to

determine preimaginal development times and survival. To determine reproductive and population parameters from horizontal life tables, copulated females were placed next to fifth instar larvae in two conditions: placing new larvae after oviposition or when the progeny began to spin the cocoon, allowing parental care behavior. The egg-to-adult development time of *G. legneri* was 15 days at 25 °C with a survival rate of 25%. Inexperience female oviposition per larva was 9.1 eggs, while when larvae were continuously allowed to oviposit it decreased to 3.76 eggs and when there was a period of parental care they laid 7.30 eggs per larva. When *G. legneri* were allowed to oviposit continuously they had an intrinsic growth rate (r_m) of 0.09 significantly higher than when parental care time was allowed, showing a lower reproductive potential with an r_m of 0.05. Both r_m were greater than zero, indicating that the parasitoid can grow on *L. botrana*. Nevertheless, the survival of immature individuals and the secondary sex ratio are low in relation to those obtained in other Lepidoptera, which could indicate that *L. botrana* is a low quality host for the parasitoid.

Bethylids can find hidden hosts oriented by olfactory signals such as those contained in feces and silk produced by feeding phytophagous larvae. Aspects of host foraging by *G. legneri* were investigated. Preference for different species was evaluated and the possible sources of volatile signals used by *G. legneri* to locate host within galleries formed by feeding larvae were investigated. In a bi choice test, parasitoid preference for different hosts was evaluated among *L. botrana*, *C. pomonella* and *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). A preference for *P. interpunctella* over *C. pomonella* and *L. botrana* was found, and between the latter two it was indifferent. Regarding the innate ability to exploit volatiles from *L. botrana* attacked clusters, different odor sources were tested in a Y-tube olfactometer: 1) complete cluster: a vine cluster in the inflorescence/green berry/veraison berry stages with the presence of *L. botrana* damage, six fifth instar larvae and their feces; 2) larvae: six fifth instar *L. botrana* larvae alone fed on clusters of each phenological stage considered above; 3) feces: from larva fed at each phenological stage of the plant; 4) injured clusters: by *L. botrana* but only with the presence of silk woven by host larvae at each phenological stage. Inexperience females of the parasitoid were exposed individually to one stimulus at a time in one of the olfactometer arms while clean air was circulated in the other arm as a control. The time spent in each arm was recorded for five minutes. Residence time showed significant differences for those treatments at the green berry stage that included complete cluster (1) 75" vs. 46" for clean air, and injured clusters (4) 84" vs. 35" for clean air. Ultimately, *G. legneri* can encounter *L. botrana* mainly in clusters at the green berry phenological stage through olfactory signals elicited by larval feeding. These characteristics

indicate that this biological control agent can locate *L. botrana*, even when it comes from artificial rearing on another host and at the green berry phenological stage.

To evaluate the impact of *G. legneri* on the density of *L. botrana*, releases were made in inclusion cages. The design of inclusion cages allows manipulation of pest and natural enemy populations within the cages by enclosing parts of a plant or a sector of a crop. To experimentally evaluate the degree of control of *G. legneri* on *L. botrana* under semi-field conditions, cages (1m by 0.5m) were used that enclosed whole vine shoots, each with two clusters, which were artificially infested with the pest and *G. legneri* females were released at a relative density of 1:1 (host:parasitoid). The releases were repeated for all three generations of the pest in the crop per season and for three consecutive seasons (2018-2021). There was no decrease in the damage levels of *L. botrana*, but a reduction of about 50% of its density was observed in the second generation of the pest, in the 2019-20 season. The results obtained correspond to those observed in olfactometer trials, where only in the green berry stage (second generation) the parasitoid was able to orient itself towards the host.

Based on the results obtained, *G. legneri* alone is not capable of naturally controlling the grapevine moth. *Lobesia botrana* has been found to be a lower quality host also. On the other hand, for the parasitoid:host density tested in semi-field conditions, reach in the second generation ca. 50% of control level one of the years, a promising result. Nevertheless, with the information obtained so far, future research on the host-feeding predatory action of *L. botrana* is proposed, to study strategies that promote biological control by conservation of the parasitoid and to continue with the field evaluation of augmentative releases by testing different release doses.



Capítulo 1. Introducción general

1.1 Paradigmas en el manejo de plagas

El concepto del Manejo Integrado de Plagas (MIP) involucra la incorporación de múltiples métodos y estrategias de control de plagas, definidas como cualquier organismo perjudicial para los humanos. El MIP es una labor multidisciplinaria que establece el manejo según reglas de decisión basado en principios ecológicos y consideraciones económicas y sociales. Entre las tácticas para un MIP se pueden mencionar herramientas como el control biológico, químico, etológico, uso de variedades resistentes o tolerantes, entre otros. (Gray et al., 2009).

Para aplicar un programa de MIP, es necesario primero tener herramientas que permitan la decisión de tomar una o varias medidas de control. Estas herramientas son el *nivel de daño económico* (NDE), *umbral económico* (UE) y *posición general de equilibrio* (Gray et al., 2009). El NDE es la mínima densidad poblacional de la plaga a la cual causa pérdidas económicas iguales al costo de control. El UE es la densidad poblacional en la que medidas de control deben ser tomadas para evitar alcanzar el nivel de daño económico. La posición general de equilibrio es la densidad promedio de una plaga en un periodo de tiempo considerable en ausencia de disturbios permanentes. Para fijar los umbrales de decisión es fundamental la identificación de los organismos dañinos y su correcto monitoreo.

Por otra parte, el MIP es considerado como un enfoque valioso para una transición hacia una agricultura sustentable (Cucchi, 2020). En este sentido la *Agroecología* propone una agricultura sustentable, es decir "... que mantiene en el tiempo un flujo de bienes y servicios que satisfagan las necesidades alimenticias, socioeconómicas y culturales de la población, dentro de los límites biofísicos que establece el correcto funcionamiento de los sistemas naturales (agroecosistemas) que lo soportan" (Sarandón et al., 2006). Para alcanzar el objetivo de una agricultura sustentable utilizando un enfoque agroecológico es necesario una mirada holística que integre varias disciplinas (agronomía, sociología, economía, ecología, entre otras). La agroecología pretende reducir al máximo el uso de insumos externos al agroecosistema considerado propiciando y potenciando los ciclos beneficiosos que se dan en una biodiversidad planificada o no en todos los estratos (Altieri, 1999; Sarandón et al., 2014). El control biológico, es decir la reducción en la densidad poblacional de un organismo perjudicial (plaga) mediante un organismo benéfico, es potenciado como un servicio ecosistémico de control de plagas o regulación biótica con el aprovechamiento de la biodiversidad funcional (Nicholls Estrada, 2008).

La agricultura orgánica, otra propuesta de sistema productivo, se basa en prescindir totalmente de fertilizantes y pesticidas sintéticos de la producción agrícola. En lo posible, reemplaza las fuentes externas tales como sustancias químicas y combustibles adquiridos comercialmente por recursos que se obtienen dentro del mismo predio o en sus alrededores (Altieri, 1999). Estos enfoques y sistemas de producción son de interés para este trabajo de tesis.

1.2 El cultivo de vid en Mendoza: estatus sanitario

En la Argentina se cultivan 211.099 ha de vid, de las cuales el 85% corresponden a las provincias de Mendoza y San Juan (INV, 2022). El principal destino de este cultivo es la elaboración de vinos (INV, 2022; Miranda & Novello, 2013). El sector genera unos 385.000 puestos de trabajo directos e indirectos en todo el país y posee un valor bruto de la producción de 72 mil millones de pesos argentinos (COVIAR, 2018). En particular para la provincia de Mendoza es la principal actividad agrícola en cuanto superficie cultivada con unas 148.000 ha en el año 2021 (INV, 2022), y más del 90 % de la producción es destinada a la elaboración de vinos, siendo un sector agroindustrial con una importante presencia en los mercados nacionales e internacionales.

En Mendoza la agricultura está determinada por la presencia de agua para riego y por lo tanto de obras como diques, acequias, canales o perforaciones que permitan su traslado a zonas que se definen como oasis. Estos se ubican en antiguas planicies aluviales y conos de transición entre piedemontes, valles y llanuras. Se utiliza el riego sistematizado donde el agua proviene principalmente de ríos. La provincia posee tres oasis irrigados principales donde se concentra la producción agrícola: oasis Norte, oasis Centro o Valle de Uco, y oasis Sur. Cada uno posee características climáticas y ambientales diferentes.

Históricamente, la vid en Mendoza no ha presentado problemas de insectos plaga, por lo cual el uso de insecticidas ha sido escaso o nulo. Esta situación resultó privilegiada, ya que además de sus óptimas cualidades, los vinos carecían prácticamente de residuos de plaguicidas, presentando el país una imagen de excelencia a nivel mundial en referencia a inocuidad y calidad de los productos obtenidos (Strafile & Becerra, 2001). Sin embargo, la situación cambió en forma abrupta cuando en el año 2010 se reporta la presencia de una nueva plaga, la polilla de la vid *Lobesia botrana* (Den. et Shiff.) (Lepidoptera: Tortricidae) en la Argentina (SENASA Resolución-122, 2010).

La llegada de la polilla de la vid a Mendoza modificó profundamente los planes sanitarios que se aplicaban en los viñedos para lo cual se inició el “Programa de Prevención y Erradicación de *Lobesia botrana*” a cargo del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) y articulado por el Instituto de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Mendoza (ISCAMEN). Para reducir las poblaciones de la polilla de la vid y eventualmente suprimirlas, las instituciones a cargo del programa establecieron una estrategia de control mediante “manejo integrado de plagas de grandes áreas” en unas 160.000 ha (Taret et al., 2020). Este enfoque de manejo consiste en realizar acciones en escalas mucho mayores a las de escala de finca, abarcando en la provincia la superficie total donde se encontraba la plaga, ya que esta posee una gran movilidad y controlarla en lugares puntuales no sería eficiente. Junto a las aplicaciones terrestres de insecticidas se utilizó la Técnica de Confusión Sexual (TCS) o disrupción sexual por medio de la aplicación y colocación de feromonas específicas (ver más adelante 1.3.4 - Control etológico y técnica de la confusión sexual(TCS)) (Taret et al., 2020). Esta técnica reduce la posibilidad de que los machos localicen a las hembras para la cópula, y por lo tanto evita que estas ovipongan. El área cubierta con la TCS alcanzó superficies de hasta ca. 70.000 ha. Los esfuerzos para controlar a las poblaciones de la plaga, ya extendidas en los principales oasis productivos de Mendoza y parte de San Juan, llevaron a combatirla mediante aplicaciones áreas de insecticidas a partir del 2017 financiadas por los estados provinciales y nacional. En la actualidad, el productor se encuentra obligado legalmente a realizar aplicaciones de insecticidas para restringir la plaga exceptuando, a partir del año 2022, aquellos productores del oasis Sur de Mendoza que realicen la TCS (SENASA, 2023).

El uso de plaguicidas genera desequilibrios ecológicos (Sánchez-Bayo & Wyckhuys, 2019; Wagner, 2020), afecta enemigos naturales (Biondi et al., 2012; Pisa et al., 2015), polinizadores (Gilburn et al., 2005; Krupke et al., 2017; Wood & Goulson, 2017), aves (Wood & Goulson, 2017), entre otros organismos (Dudley et al., 2017). Los insecticidas ocasionan la aparición de poblaciones de la plaga resistentes a los productos (Civolani et al., 2014) y el surgimiento de plagas secundarias en viñedos (Gallardo et al., 2016). Además, el empleo de plaguicidas puede afectar la salud del productor, su familia y la de los consumidores si no se toman los recaudos necesarios. A nivel comercial, las exigencias de residuos de plaguicidas en alimentos a escala nacional e internacional son muy estrictas y pueden provocar rechazos en el ingreso a un mercado comprador, con las consecuentes pérdidas económicas. Complica esta problemática la falta de maquinaria adecuada para las

aplicaciones y la presencia en la zona cuyana de parrales domésticos o de traspatio, donde no es aconsejable el uso de productos de síntesis química.

1.3 Polilla de la vid, *Lobesia botrana*

La polilla de la vid, *L. botrana*, fue descrita por primera vez en el año 1776, en Austria por (Denis y Shiffermüller). Es un microlepidóptero de la familia Tortricidae, subfamilia Olethreutinae, tribu Olethreutini. Otro tortricido que se encuentra junto a *L. botrana* en los viñedos europeos es *Eupoecilia ambiguella* (Hübner), pero que en Argentina se encuentra ausente, aunque se registra su presencia en Brasil (Dueñas-López, 2022). En viñedos de Mendoza existen otras dos especies emparentadas pero que no ocasionan daños a la producción, *Argyrotaenia* sp. y *Crociosema orfilai* Pastrana.

La polilla de la vid es polífaga y se alimenta de más de 30 especies de plantas. Sin embargo su principal hospedante es la vid, a la cual se piensa que llegó en Europa a través de su hospedante nativo, el arbusto mediterráneo llamado torvisco, *Daphne gnidium* L. (Malvales: Thymelaeaceae) y de dónde se esparció a todo el continente, aunque esta teoría aún es tema de debate (Lucchi & Scaramozzino, 2022)

Este lepidóptero provoca daños directos por consumo de las diferentes partes de las inflorescencias, perforaciones en bayas verdes y maduras. Además genera daños indirectos como la pérdida de calidad y productividad por podredumbres que ingresan por heridas provocadas en el fruto (Ferraud, 1989; Pavan et al., 2014), y perjuicios en el intercambio comercial debido a su estatus cuarentenario (Becerra & Portillo, 2014; SENASA, 2023). Las podredumbres ocasionan problemas en la fermentación, transmiten mal sabor y aromas al vino y puede generar ocratoxinas. Estudios toxicológicos en animales de laboratorio mostraron que la ocratoxina A (OTA) puede tener varios efectos perjudiciales, principalmente como nefrotóxica pero también genotóxica, inmunosupresora, teratogénica, neurotóxica y cancerígena (Shephard, 2008).

1.3.1 Distribución

Se encuentra en casi toda Europa (Fig. 1.1) y su lugar de origen, aun discutido, es posiblemente en la región mediterránea donde la polilla habita en zonas donde no hay cultivos. En esta región se la ha hallado alimentándose de *D. gnidium* que sería la posible planta hospedadora original de *L. botrana* (Maher & Thiéry, 2006). Asimismo, se encuentra en el norte de África, parte de África central, Asia y en América únicamente en Chile

(detección en año 2008) y Argentina (detección en año 2010). Aunque fue registrada en el año 2009 en California, Estados Unidos (Gilligan et al., 2011), el pronto accionar y coordinación entre los distintos actores involucrados, tanto instituciones públicas y privadas, productores de uva y vino y el estado, logró que se declare erradicada en todas las áreas cuarentenadas en el año 2016 (NAPPO, 2016).

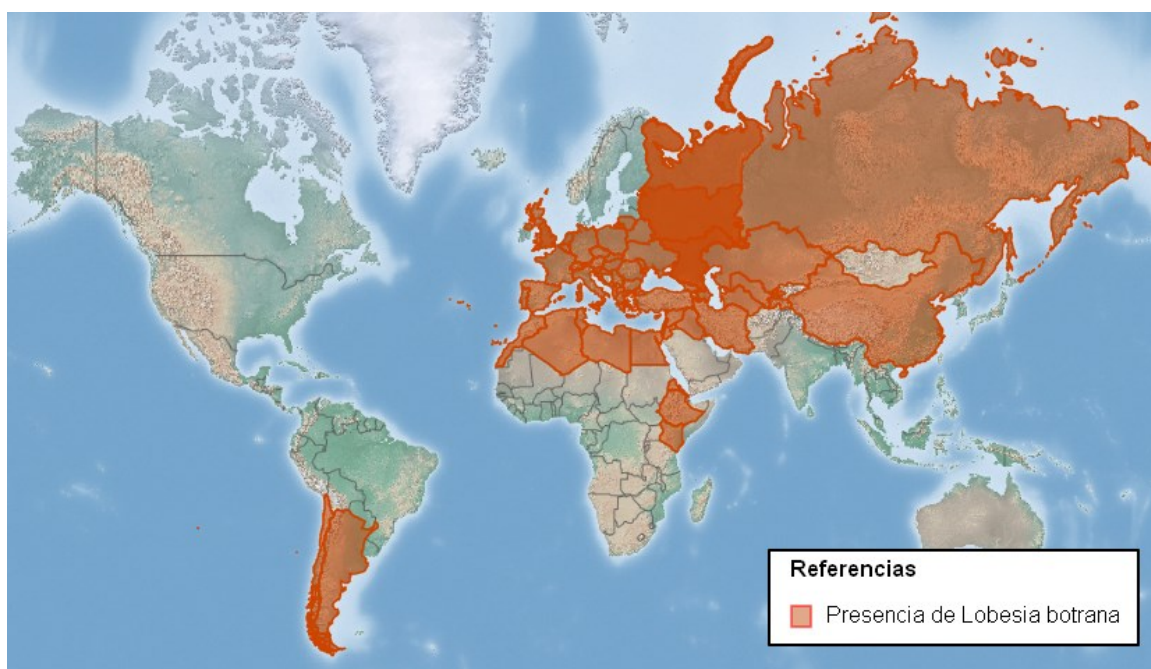


Figura 1.1 Mapa de distribución mundial de *Lobesia botrana*. Fuente: CABI, 2023. *Lobesia botrana*

1.3.2 Descripción morfológica

Tiene un desarrollo holometábolo y pasa por cuatro estados bien definidos que a continuación se detallan:

Huevo: Sus dimensiones son 0,65 - 0,90 mm de longitud por 0,45 - 0,75 mm de ancho tendiendo a una forma elíptica (Fig. 1.3.a). Es aplanado, posee forma lenticular y el corión es translúcido lo que deja ver el desarrollo del embrión pudiéndose observar distintas tonalidades a medida que desarrolla (Becerra et al., 2015). Al principio es blanquecino, para luego tornarse amarillento hasta el estado “cabeza negra” dónde se distingue la capsula cefálica.

Larva: Pasa por cinco estadios larvales. Las larvas del primer estadio (L1) son amarillo claro con la cabeza oscura y más ancha que el resto del cuerpo, miden alrededor de 1 mm.

En el segundo estadio ya es distinguible el escudo protorácico de color castaño claro al igual que la cabeza. Los estadios tres y cuatro son similares, variando principalmente el tamaño con tonalidades que van del amarillo al verde. El quinto y último estadio alcanza un tamaño de 10 a 15 mm (Fig. 1.3.b). Son notorias las setas y pináculos claros. Es en este estado en donde se observa la mayor variedad de coloraciones que van desde el amarillo claro, verde, turquesa, azul y violeta. La tonalidad puede verse oscurecida por la dieta, siendo de un color verde intenso cuando se alimentan de partes verdes de la planta y más violáceo cuando se alimentan de bayas tintas maduras. Se distinguen de otras larvas presentes en los viñedos por poseer una mancha en la zona ocelar, una mancha genal corta y una placa protorácica con los bordes oscuros (Fig. 1.2)

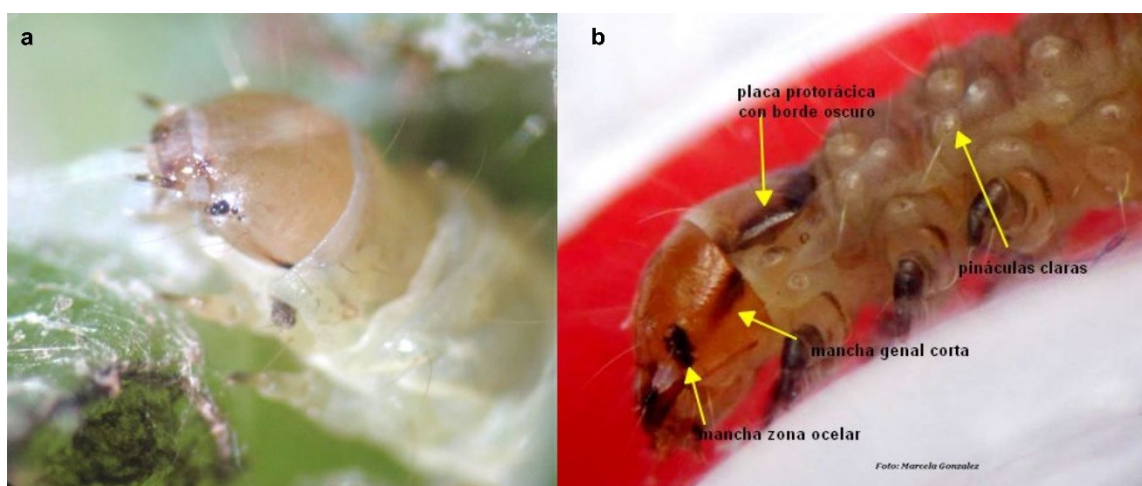


Figura 1.2 Larvas de Tortricidae presentes en viñedos de Mendoza. **a.** Larva de *Argyrotaenia* sp. **b.** larva de quinto estadio de *Lobesia botrana*

Pupa: en campo se suele encontrar envuelta por un capullo con forma de huso. Cuando recién formada posee la tonalidad de la larva del último estadio, tornándose castaña a medida que envejece (Fig 1.3.c). Al final del estado de pupa ya son distinguibles los ojos oscuros y las alas. Miden entre 4-9 mm pudiéndose distinguir entre machos y hembras por la forma de la hendidura genital y anal (Herrera, 2019)

Adulto: Posee 10-13 mm de envergadura alar y 6-8 mm desde el final de abdomen hasta la cabeza. Las alas anteriores poseen un dibujo con manchas marrones de distintas tonalidades y manchas gris claro (Fig. 1.3.d). Cuando el adulto está en reposo las manchas grises forman una banda media y dos “Y” en la base que se unen en el centro. Posee un penacho de escamas detrás de la cabeza en el tórax. No posee dimorfismo sexual, aun así, los machos suelen ser de menor tamaño y con el abdomen más delgado y un penacho de escamas modificadas en el extremo.

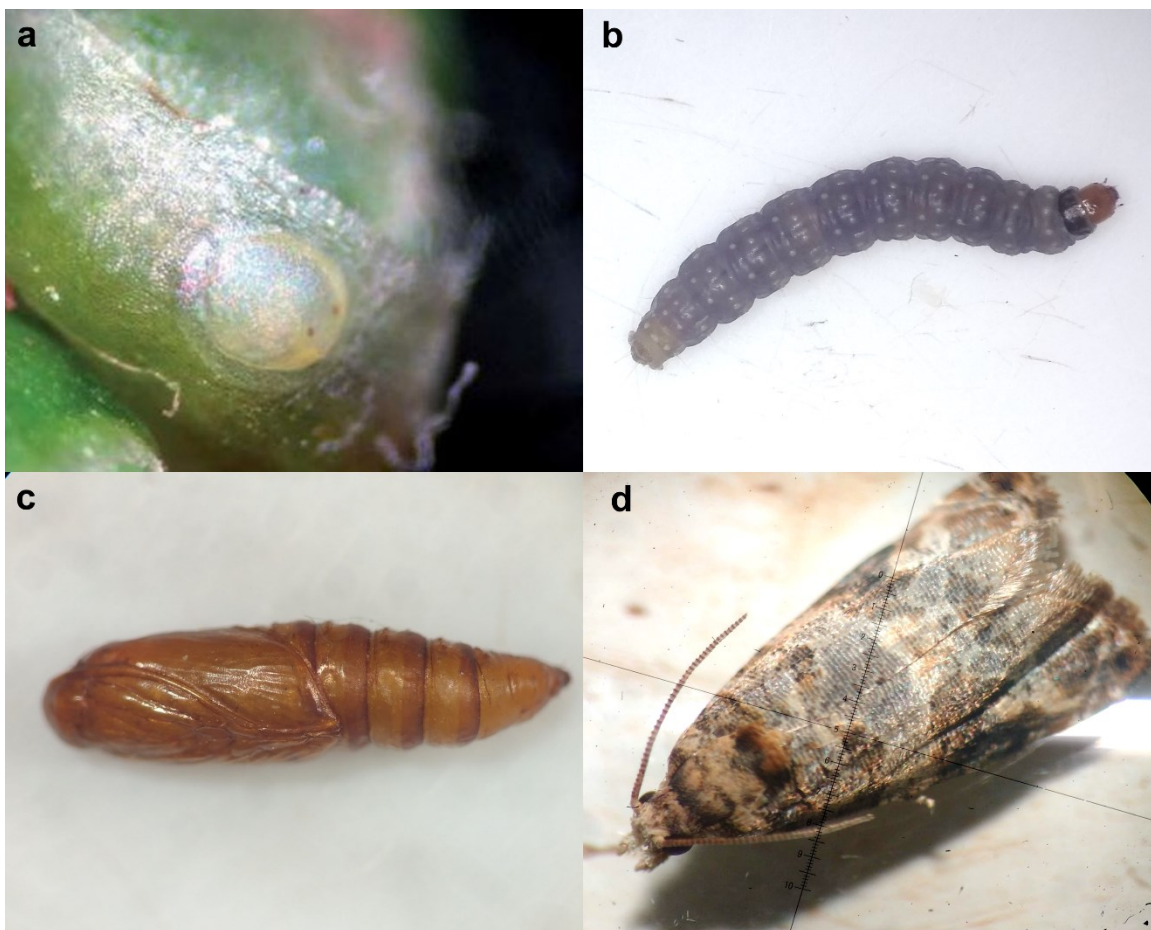


Figura 1.3 Distintos estados de *Lobesia botrana*. **a.** huevo sobre bráctea floral de vid. **b.** larva de 5^{to} estadio. **c.** pupa. **d.** adulto.

1.3.3 Biología y daños

En la región de Cuyo *L. botrana* puede llegar a cumplir tres a cuatro generaciones, inclusive es considerada hasta una quinta de acuerdo a los vuelos observados (Fig. 1.4) (Becerra et al., 2015; Dagatti & Becerra, 2015; Heit et al., 2015; Taret et al., 2020).

La especie hiberna como pupa diapausante encapullada debajo de la ritidomis (corteza) de la vid. Los machos adultos emergen primero a fines del invierno (septiembre), de acuerdo a las primeras capturas en trampas cebadas con feromona específica ((E,Z)-7,9-Dodecadienil acetato principalmente), y luego las hembras, que una vez copuladas, colocan sus huevos en los primordios florales cuando los racimos poseen entre 5-7 cm. Las L1 ingresan a las flores y se alimentan de estas.

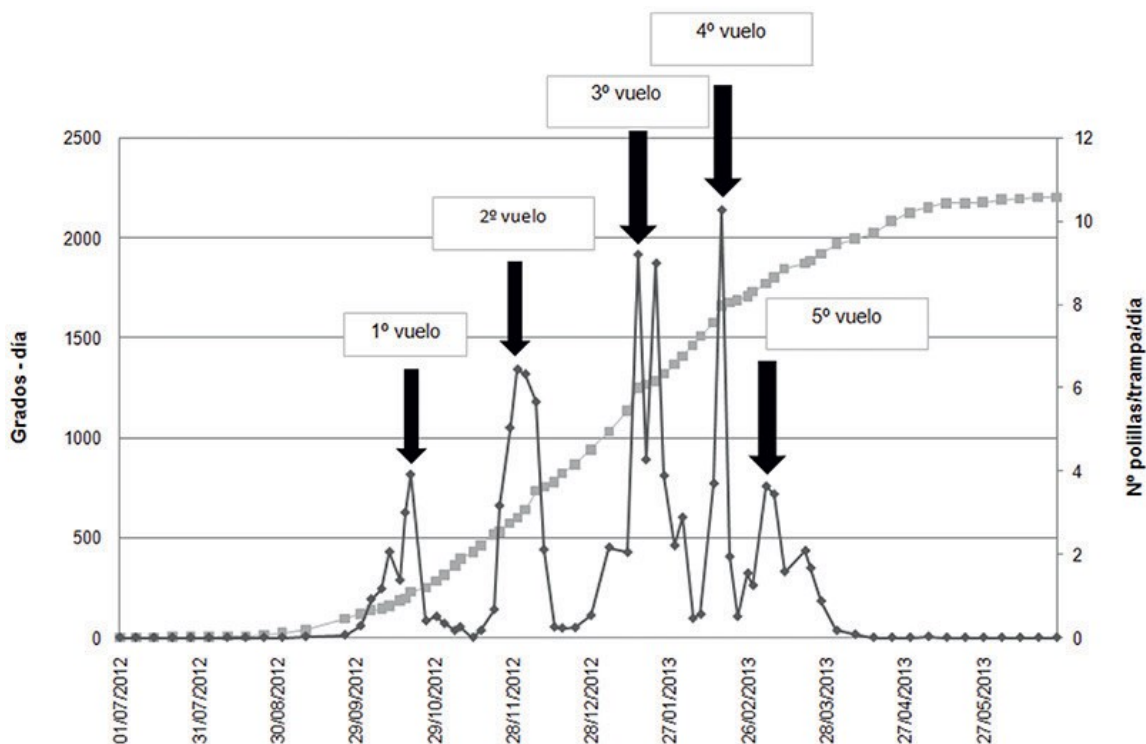


Figura 1.4 Vuelos de *Lobesia botrana* reflejados en la curva de capturas y acumulación de grados día (GD) para la temporada 2012-2013 en una parcela de vid en Maipú, Mendoza. Tomado de Dagatti et al. 2015

A medida que van desarrollando las larvas unen varias flores mediante seda que tejen y forman glomérulos. Una larva puede realizar más de un glomérulo, en promedio dos (Delbac & Thiéry, 2017; Moschos, 2005) (Fig. 1.5.a). La larva empupa dentro del mismo glomérulo o en las hojas. El segundo vuelo que da origen a la segunda generación se produce a fines de noviembre-principios de diciembre, cuando las bayas se encuentran verdes. En la segunda generación las larvas ingresan y excavan galerías dentro de las bayas verdes, pudiendo una misma larva consumir varias bayas que se tornan de una coloración marrón (Fig. 1.5.b). Las pupas se encuentran dentro de las bayas o en el racimo principalmente. Luego emergen los adultos del tercer vuelo que se produce a principios y mediados de enero. Las larvas de esta tercera generación consumen bayas en inicio de maduración (envero) a maduras. Es en este momento donde producen mayor daño, ya que en los racimos maduros las heridas causadas por *L. botrana* generan podredumbres de la uva (Fig. 1.5.c). Asimismo, es el momento en donde menos herramientas de control químico se disponen debido a la cercanía a cosecha. Se ha visto que se puede producir una cuarta generación ocasionando daños en bayas maduras. Las pupas de estas dos últimas generaciones son las que principalmente pasarán el invierno en diapausa desencadenada

por condiciones de fotoperiodo y temperatura específicas a la que son sometidas las L1 (Roditakis & Karandinos, 2001).



Figura 1.5 Daño de producido por *Lobesia botrana* en las tres generaciones: **a.** Primera generación formación de glomérulos (flechas) con frutos recién cuajados. **b.** Segunda generación en bayas verdes. **c.** Tercera generación en baya maduras y aparición de podredumbre gris.

La polilla de la vid puede ocasionar pérdidas de producción en viñedos que alcanzan valores de ca. 40 % (Mendoza et al., 2018; Moschos, 2006), dependiendo de los niveles de ataque y el momento fenológico del cultivo. Viticultores locales han reportado niveles de daño en viñedos mendocinos de entre el 10-70% (Taret et al., 2020). El daño es provocado por larvas que se alimentan exclusivamente en los órganos reproductivos de la vid desde flores hasta bayas maduras (Roerich, 1978).

Es interesante destacar que el daño ocasionado por *L. botrana* en el momento de floración suele ser compensado por la abundante presencia de flores y un aumento de tamaño de las bayas (Dry et al., 2010; Roehrich & Boller, 1991), no afectando el rendimiento excepto con elevados niveles de ataque o variedades con pocas flores. Los racimos muy afectados tienen aspecto de “corrido”, es decir sin bayas en algunas regiones del mismo. De igual manera es importante realizar medidas de control para reducir las poblaciones en las generaciones siguientes.

En la segunda generación, el consumo de bayas (Fig. 1.5.b) y posible ingreso de microorganismos que ocasionan podredumbre ocasiona mayores perjuicios a la producción que en primera generación. En tercera y posteriores generaciones la larva ataca a las bayas maduras y es cuando más daño puede ocasionar debido a que ataca un mayor número de bayas y permite el desarrollo de podredumbres (Fig. 1.5.c), ya que puede perderse el racimo completo, i. e. en un viñedo var. Tocai Friulano se midió la pérdida de un 18 % de la producción en forma directa y un 36% cuando se consideraba las podredumbres ocasionadas por el daño de la plaga (Mendoza et al., 2018). Como se mencionó al inicio

del capítulo, las podredumbres, en particular cuando se desarrollan hongos negros del género *Aspergillus*, producen niveles elevados de OTA dañina para mamíferos (Gonçalves et al., 2020). *Lobesia botrana*, si no es controlada, es un importante factor de riesgo en la acumulación de OTA, habiéndose registrado hasta un 66% más de OTA en viñedos sin tratar (Cozzi et al., 2009). Es por ello que mantener niveles bajos poblacionales de *L. botrana* puede resultar en la obtención de alimentos inocuos con menores niveles de toxinas.

1.3.4 Métodos de control

La polilla de la vid es una plaga de difícil control debido a varias causas coyunturales, a saber: 1) es desconocida por parte del sector productivo; 2) el parque de maquinaria para aplicaciones fitosanitarias se encuentra en malas condiciones; y 3) la complicada situación socioeconómica del mediano y pequeño productor vitivinícola hace que muchas veces no pueda afrontar el costo de control.

Además de la situación coyuntural del sector productivo hay razones técnicas que dificultan la regulación de la población de *L. botrana* como por ejemplo: 1) es una especie invasora de reciente introducción en la región donde las poblaciones son escasamente reguladas de forma natural; 2) los periodos o “ventanas” de aplicación de insecticidas son acotados debido a hábitos crípticos de la larva, 3) su polivoltinismo, entre otras razones. Debido a ello es necesario utilizar diversas tácticas para un adecuado manejo de la polilla de la vid.

Control químico

Popularizado desde el descubrimiento y aplicación del DDT (diclorodifeniltricloroetano) producto de una industria química dominante y de la Revolución Verde durante y después de la Segunda Guerra Mundial. Consiste en el uso de moléculas sintéticas y de diversa índole, que actúan por diversos mecanismos como pueden ser la afectación del sistema nervioso, las hormonas de la muda y crecimiento, la respiración celular, entre otros. Por su gran efectividad y rápido accionar el control químico es el método más empleado en la actualidad para reducir las poblaciones de la polilla de la vid.

En regiones donde *L. botrana* no está bajo control oficial (es decir, no existe un control legal o cuarentena) los insecticidas son aplicados de acuerdo a un UE, que varía dependiendo de la variedad cultivada (susceptibilidad a *L. botrana* y a podredumbres), generación de la plaga, destino de la producción y precio del producto (Ioriatti et al., 2011). En estas condiciones la primera generación puede no requerir control debido a la abundante

producción de flores en algunas variedades y la compensación en peso y tamaño de las bayas sanas (Dry et al., 2010; Moschos, 2005; Roehrich & Boller, 1991). Los insecticidas utilizados en el control de *L. botrana* en el mundo se han ido reemplazando por aquellos menos peligrosos para las personas y el ambiente y más específicos en su espectro de acción. Estos insecticidas se agrupan según su mecanismo de acción y origen en: inhibidores de la síntesis de quitina, disruptores del mecanismo de muda, insecticidas microbianos, avermectinas y diamidas antranilicas (Ioriatti et al., 2011). Para que las aplicaciones sean efectivas deben ser realizadas en el momento oportuno de control, para lo cual es indispensable el monitoreo mediante trampas de feromonas y obtener así las curvas de vuelo (Fig. 1.4). El momento oportuno es en los primeros estados de la plaga, principalmente el de huevo y de L1, momentos posteriores pueden dificultar la llegada del producto a la larva.

En el agroecosistema vitícola mendocino la toma de decisión de control difiere de otras regiones vitícolas porque como se mencionó arriba, por ser *L. botrana* una plaga cuarentenaria bajo control oficial, los viñateros se encuentran obligados a realizar aplicaciones de insecticidas en las primeras dos generaciones del insecto. En el año 2010 se estableció por la resolución 504/10 del SENASA un registro de insecticidas en forma emergencial para el control de *L. botrana* (Fig. 1.6). Los productos reunidos en la misma comprendían plaguicidas convencionales (organofosforados, carbamatos y piretroides), neonicotinoides, reguladores de crecimiento, productos naturales o biológicos y feromonas de confusión sexual (Becerra et al., 2015); totalizando unos 16 principios activos. Luego de algunos años solamente se podían utilizar plaguicidas registrados y al año 2023 el número de principios activos se redujo a seis, incluyendo en su mayoría insecticidas de mayor especificidad y menor toxicidad aguda para mamíferos (banda verde o azul).

A pesar del uso de estas nuevas moléculas menos peligrosas para mamíferos en su toxicidad aguda por ser en su mayoría de la categoría toxicológica IV (banda verde) (SENASA, 2012), hay numerosas bajo estudio por la posibilidad de efectos a más largo plazo en seres humanos como es el de ser disruptores endócrinos, carcinogénicos, genotóxicos, entre otros efectos. Un disruptor endócrino desbalancea este sistema endócrino, lo que incide en funciones vitales como la reproducción, el metabolismo, el crecimiento, la función cardíaca y el balance de minerales. Entre los productos registrados para *L. botrana* se encuentra que metoxifenocida es posible carcinógeno y disruptor endócrino; spinetoram causa problemas en la reproducción; e indoxacarb es posible

disruptor endócrino (AERU University of Hertfordshire, 2023). Algunos de los productos registrados para controlar a *L. botrana* son altamente tóxicos para aves, abejas, peces y organismos acuáticos. Es por ello que estos insecticidas se deben usar con suma responsabilidad evitando derivas excesivas, usando equipos adecuados y disponiendo los residuos generados adecuadamente.

**PRODUCTOS FITOSANITARIOS REGISTRADOS
PARA EL CONTROL DE LOBESIA BOTRANA
Res. 504/2010 SENASA**

EMPRESA	MARCA COMERCIAL	ACTIVO-CONCENTRACIÓN
INSECTICIDAS		
BASF ARGENTINA SA	CASCADE	Fufenoturon 10%
SUMMIT AGRO ARGENTINA SA	DIPEL L PLUS	Bacillus Thuringiensis var. Kurstaki 3,5%
SYNGENTA AGRO SA	KARATE ZEON 5 CS	Lambdacialotrina 5%
SYNGENTA AGRO SA	MATCH	Lufenuron 5%
SYNGENTA AGRO SA	PROCLAIM 5 SG	Benzoato de Emamectina 5%
SYNGENTA AGRO SA	VOUAM TARGO	Clorantniliprole 4,5% + Abamectina 1,8%
SYNGENTA AGRO SA	VOUAM FLEXI	Clorantniliprole 10% + Tiametoxam 20%
DOW AGROSCIENCES ARG. SA	INTREPID SC	Metoxifenocida 40%
DOW AGROSCIENCES ARG. SA	LORSBAN 75 WG	Clorpirifos 75%
DOW AGROSCIENCES ARG. SA	TRACER	Spinosad 48%
DOW AGROSCIENCES ARG. SA	ENTRUST	Spinosad 80%
MAGAN ARGENTINA SA	RIMON SUPRA	Novaluron 10%
MAGAN ARGENTINA SA	COTNION 20 SC	Metilazinfos 20%
MAGAN ARGENTINA SA	LAMBDEX	Lambdacialotrina 5%
MAGAN ARGENTINA SA	SEIZER	Bifentrin 10%
MAGAN ARGENTINA SA	PRIMEX 25 ME	Clorpirifos 25%
FMC LATINOAMERICA SA	TALSTAR	Bifentrin 10%
S. ANDO Y CIA SA	BACTHUR LIQUIDO	Bacillus Thuringiensis var. Kurstaki 4%
S. ANDO Y CIA SA	BACTHUR	Bacillus Thuringiensis var. Kurstaki 15%
CERGEN SRL	NITRUR FRUTAGEN	Bacillus Thuringiensis var. Kurstaki 3%
CERGEN SRL	NITRUR BTKL ULTRAMAX	Bacillus Thuringiensis var. Kurstaki 4%
DUPONT ARGENTINA SA	LANNATE	Metomil 40%
DUPONT ARGENTINA SA	CORAGEN	Clorantniliprole 18,4%
WAYNE CHEMICAL SRL	NEMAZAL	Azadirachtina 1,2%
FEROMONAS		
BASF ARGENTINA SA	RAK 2 PLUS	E/Z-7,9 Dodecadienil acetato 8,5%
SIR CONSULTORA AGROPECUARIA SRL	PUFFER LB	E/Z-7,9 Dodecadienil acetato 9,11%
SIR CONSULTORA AGROPECUARIA SRL	CHECK MATE LB-F	E/Z-7,9 Dodecadienil acetato 18,9%
BROMETAN SRL	EXOSEX	E/Z-7,9 Dodecadienil acetato 2%
AGROROCA SACIA	ISONET L	E/Z-7,9 Dodecadienil acetato 1,72%

3

Control y Erradicación de Polilla de la Vid

CONFUSIÓN SEXUAL

El uso de técnicas específicas y no contaminantes como la **Confusión Sexual**, permite disminuir los riesgos a la hora de combatir plagas agrícolas.



de 180 a 200 días
es el período efectivo de la nube de feromonas que crea el difusor. La **protección del cultivo**, se extiende durante toda la temporada

La **Confusión Sexual** es la perturbación de la atracción sexual de los machos hacia las hembras, provocada por la impregnación en el aire de una feromona que emiten los difusores.

Los difusores liberan feromona, generando una nube que produce en los machos confusión ya que no pueden percibir el olor - **la feromona** - que liberan las hembras vírgenes, por lo que no las encuentran para producir la cópula. Evitando la incubación por parte de la hembra.

Ministerio de Agroindustria
Presidencia de la Nación

SECRETARÍA de
AGRICULTURA FAMILIAR
"El Estado Agrega Valor" en la Ruralidad
M E N D O Z A

senasa
Servicio Nacional de Sanidad
Alimentaria y Agraria

IDR
Instituto de Desarrollo Rural

ISCAMEN
Instituto de Sanidad y Control de Alimentos

MENDOZA GOBIERNO
GOBIERNO DE LA PROVINCIA DE MENDOZA

Figura 1.6 Material de divulgación elaborado por las instituciones públicas. Izq. Listado de productos autorizados en el año 2010. Der. Información sobre la técnica de confusión sexual. Fuente: <http://www.iscamen.com.ar>. Cuadernillo de capacitación. Operativo 20/21. http://www.iscamen.com.ar/docs/difusion/LIBRITO_LOBESIA_2020_21.pdf

Para poder acceder a fincas abandonadas y con alta presión de la plaga en los momentos oportunos de control y facilitar un manejo en grandes áreas se comenzaron a realizar aplicaciones aéreas con plaguicidas a partir de la temporada 2017-2018. Esta técnica escasamente evaluada en la zona (ISCAMEN, 2018; Taret et al., 2020) y con fuertes cuestionamientos por parte de la sociedad y la academia (Barrientos et al., 2018; Carrasco et al., 2012; Hang, 2010; Tomasoni, 2013) se ha utilizado hasta la actual campaña (2022-2023). Las aplicaciones aéreas se realizan sin tener en cuenta un entramado productivo que no está preparado para este tipo de técnica ya que un 76 % son explotaciones familiares con menos de 10 ha (INV, 2022) y escuelas rurales cercanas a los cultivos, lo que hace

muy difícil respetar las zonas de amortiguamiento. El viñedo al ser un cultivo intensivo posee una gran cantidad de personal trabajando en los momentos donde los aviones pasan aplicando, rociando de agroquímicos a los propios obreros que realizan trabajos de deschuponado, despampanado y otras labores propias del cultivo y la época, que requieren mano de obra intensiva. Además las condiciones de baja humedad relativa características de Mendoza y San Juan, la presencia de cortinas forestales, fenómenos de inversión térmica por la baja velocidad del viento, cultivos en parral con canopias que dificultan la llegada del producto al racimo, se hace muy difícil y costoso de implementar el control químico mediante aplicaciones aéreas (Barrientos et al., 2018). En estas se utilizaron insecticidas como metoxifenocide, clorantraniliprole y combinadas con otras técnicas de control que se verán más adelante: bioinsecticidas como *Bacillus thuringiensis* y Técnica de la Confusión sexual por medio de feromonas floables de 30-60 días de duración en grandes superficies (Taret et al., 2020). En la campaña del año 2017 se alcanzaron a aplicar por este método en las provincias de Mendoza y San Juan más de 100 mil hectáreas.

La utilización exclusiva de plaguicidas puede llevar a un círculo vicioso donde su uso se ve incrementado con el tiempo. Esto se debe a que producen resurgencias de la plaga objetivo a controlar y explosiones poblacionales de plagas secundarias; además de una rápida aparición de poblaciones resistentes a los plaguicidas (Hajek, 2004). La resurgencia de plagas se debe a que al aplicar un insecticida de amplio espectro o dañino para la fauna benéfica, junto con la plaga, todos los enemigos naturales son removidos. La plaga rápidamente recupera sus niveles poblacionales y en mayores números debido a la ausencia de controladores naturales. Esto lleva a realizar nuevas aplicaciones en mayores cantidades. Las repetidas aplicaciones de insecticidas de un mismo grupo de resistencia (grupo IRAC) y a dosis cada vez mayores llevan a la selección de poblaciones resistentes, que luego son difíciles de controlar.

Control etológico y técnica de la confusión sexual (TCS)

Las sustancias químicas que utilizan los insectos para comunicarse son conocidas como *semioquímicos* (del griego semeion = señal). En el caso de que sean liberados para comunicarse los individuos de una misma especie, se denominan *feromonas*. Entre las más importantes para la reproducción y supervivencia encontramos las feromonas sexuales, que son emanadas principalmente por las hembras y detectadas por los machos para hallarlas y poder copular.

Este método de control implica saturar el ambiente con feromonas sexuales sintéticas para dificultar la orientación de los machos hacia las hembras, de allí su denominación *Técnica de Confusión Sexual* (TCS). Se aplica mediante difusores colocados en los viñedos. La TCS actúa de tres formas (Cardé, 2007):

Confusión o adaptación sensorial: es causado por la exposición constante de los machos a la nube saturada de feromona, lo que ocasiona una adaptación de los receptores antenales y una habituación en el sistema nervioso central. Esto evita que los machos respondan a los niveles normales de feromonas liberados por las hembras. Luego de que el individuo está habituado, por más que los niveles de feromonas en el aire disminuyan, hay un periodo de demora para que sea capaz de seguir nuevamente el rastro de feromona.

Enmascaramiento del rastro o camuflaje: el rastro de la feromona natural emitida por las hembras es desarmado por la presencia de feromona en todo el espacio.

Falso camino o competencia: los difusores compiten con los rastros de las hembras y los machos siguen pistas falsas, por lo que la probabilidad de dar con una hembra se reduce.

De acuerdo a lo visto anteriormente un término más adecuado para esta técnica sería la de disrupción sexual debido a que confusión es solo uno de los tres mecanismos actuantes, sin embargo; el término más utilizado actualmente es el de TCS. Cuál es el principal mecanismo actuante es aún debatido por la comunidad científica (Cardé, 2007; Ioriatti et al., 2011).

La feromona de *L. botrana* es de tipo multicomponente con al menos 15 compuestos identificados (Arn et al., 1988). El principal componente es el (E,Z)-7,9-Dodecadienil acetato que es utilizado en forma comercial, aunque se ha comprobado que las mezclas son más atractivas que este componente solo por lo que ya se ha ido incorporando otras sustancias a las formulaciones. Los *dispensers* o difusores utilizados para la TCS en *L. botrana* poseen variados modelos comerciales (Fig. 1.7), cuya duración de emisión es superior a los 180 días en las condiciones agroecológicas de Mendoza (Fig. 1.6). En Argentina se emplea una dosis de 350 difusores/ha, a diferencia de Europa donde se emplean hasta 500 difusores/ha, ya que diversos ensayos probaron que esta cantidad es efectiva en las condiciones de los agroecosistemas mendocinos (Becerra et al., 2015). Existen otras formas de aplicación, ya sea vía terrestre o aérea, también utilizadas en menor medida en Mendoza, como son las feromonas floables de un mes de duración y los sistemas tipo Splat® en donde la feromona es contenida en una especie de espuma biodegradable que se seca en contacto con el aire, pero cuya duración es de 45 días. Asimismo se han

desarrollado difusores biodegradables con prestaciones similares a los convencionales, lo que eliminaría el problema de residuos plásticos en el cultivo provenientes de la TCS (Lucchi et al., 2018).

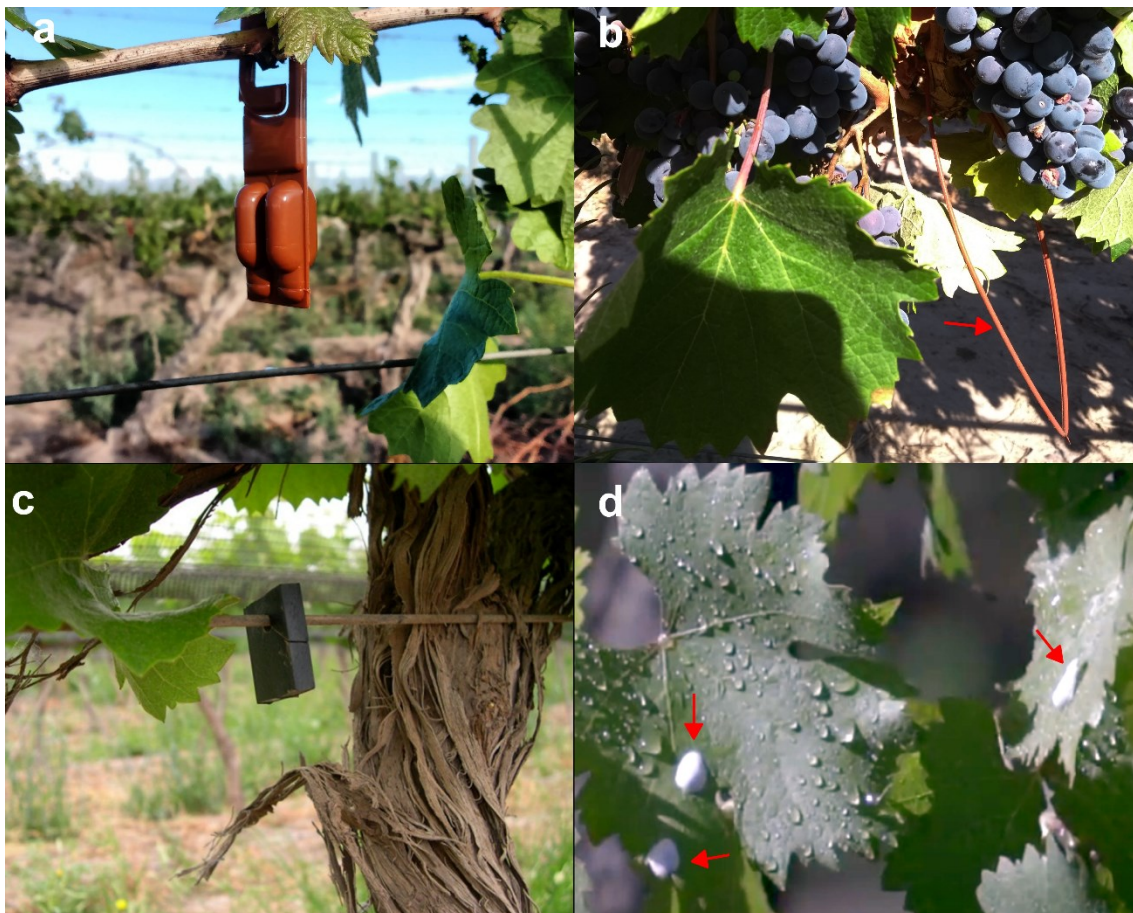


Figura 1.7 Diferentes modelos de emisores/difusores utilizados en la técnica de confusión sexual para el control de *Lobesia botrana*. **a.** Rak®2 Ultra con dos cápsulas que contienen la feromona líquida. **b.** Isonet® LTT la feromona está contenida en el centro de un tubo, se coloca la mitad de la dosis. **c.** Cidetrak® de polímero sólido son colocados sobre el alambre. **d.** Splat® asperjados mediante avionetas, las gotas blancas secas actúan como dispenser de la feromona.

Fuente fig. d.: https://www.iscotech.com/press_releases/feromonas-sexuales-de-insectos-protegen-la-industria-vitivinicola-argentina/

Para conformar una nube homogénea deben tenerse en cuenta una serie de factores: la forma de la parcela, evitando parcelas angostas en el sentido predominante de los vientos; la presencia de fuertes pendientes; y no se recomienda en superficies pequeñas menores a 4 ha. Además, se deben reforzar los bordes colocando dos veces más cantidad de feromonas, ya que es en esta zona donde se producen la mayor cantidad de ataques debido a la mayor dilución por mayor gradiente de concentración. Los difusores deben ser

colocados a la altura de los racimos y en zonas donde pueda ser cubierto por la canopia para evitar temperaturas excesivas.

El empleo de la TCS puede tener efectos positivos a largo plazo. Se ha encontrado que la diversidad y abundancia de depredadores bajo la corteza se incrementa, principalmente de araneidos (Louis et al., 1997). El empleo de la TCS, asimismo, puede incrementar los niveles de parasitismo principalmente en pupas hibernantes (Louis et al., 1997). Esto es debido principalmente a la disminución en el uso de plaguicidas.

La TCS puede dar mejores resultados cuando es utilizada en el manejo de grandes áreas, eliminado el efecto borde antes mencionado, entre otras ventajas (Ioriatti et al., 2008, 2011). Un caso documentado del éxito fue en la provincia de Trento, Italia, donde se logró implementar la TCS en cerca de 9000 ha, 90% del área cultivada en la provincia, gracias al trabajo conjunto de asociaciones de productores, el estado, institutos de investigación y empresas proveedoras de emisores de feromonas. En Argentina se tomó el mismo concepto para implementar la TCS en grandes áreas conformando “bloques de confusión sexual” que llegaron a abarcar hasta unas 70.000 ha (SENASA, 2018). Esto trajo aparejado una gran caída en el número de capturas registradas, con una reducción del 95% respecto al mismo periodo del año anterior (MAGyP, 2018). No se pudo corroborar si hubo una disminución del daño en racimos por falta de estudios que midan esta variable. El 100% de los difusores para armar estos bloques fueron entregados por el estado en un gran operativo desplegado por las Instituto de Sanidad y Calidad Agropecuaria de Mendoza (ISCAMEN) y SENASA para llegar a reducir las poblaciones de *L. botrana*.

Hasta la temporada 2014-2015 el uso de la TCS combinada con plaguicidas principalmente en primera generación de la plaga resultaron eficaces en estudios realizados en la provincia de Mendoza (Becerra et al., 2015). Sin embargo, durante la campaña 2015-2016 se observó una disminución en la eficacia de esta técnica, desconociéndose los motivos de la misma. Las hipótesis de este hecho pueden deberse a niveles poblacionales altos de la plaga o a cuestiones climáticas que hayan afectado la difusión homogénea de la feromona en los lotes tratados. Por otra parte, se ha demostrado experimentalmente en condiciones de laboratorio que existe una variación heredable en la capacidad de los machos para localizar a las hembras y acoplarse en un ambiente saturado con feromona sexual de síntesis (Torres-Vila et al., 1997). Asimismo, se ha observado un resurgimiento de plagas secundarias en viñedos de España con el uso de esta técnica (Gallardo et al., 2016), aunque estudios realizados en Alemania mostraron que las poblaciones de otros fitófagos

no aumentaron más que en parcelas control sin tratamientos químicos y en cambio se incrementó el control de otras plagas, como son ácaros, debido a que la ausencia de insecticidas permitió el desarrollo de acarófagos (Louis et al., 1997).

Las feromonas son también utilizadas en actividades de monitoreo de la plaga. Se realiza un seguimiento en trampas delta cebadas con un difusor ("lure"). Estas son ampliamente utilizadas por los organismos oficiales de control para el registro de las dinámicas poblacionales en Mendoza y San Juan. La red de monitoreo en la provincia abarca unas 4000 trampas que son revisadas semanalmente, lo que ha permitido hacer un seguimiento de la dinámica de la plaga en las zonas donde no se establecieron bloques de confusión sexual (Taret et al., 2020). El inconveniente es que cuando un área está bajo el método de TCS las trampas no registran capturas. Asimismo, este requisito es necesario, no suficiente, para corroborar que la TCS funciona adecuadamente.

Control cultural

A lo largo de la historia se han empleado diversas técnicas de control que resultan impracticables hoy en día, por ejemplo, el descortezado de cepas para eliminar pupas diapausantes, la eliminación manual de las orugas, el escaldado con vapor caliente de las cepas, el trampeo masivo con trampas de luz y alimenticias, entre otras prácticas (Torres-Vila, 2001).

Las prácticas culturales afectan principalmente de modo indirecto las poblaciones de la polilla, algunas coincidentes con el manejo cultural para evitar podredumbre de los racimos. Estas prácticas son (Torres-Vila, 2001):

- adopción de sistemas de conducción y poda que mejoren la aireación de los racimos;
- deshojado lo que contribuiría al desecamiento de los huevos y mejoraría la cobertura de las aplicaciones;
- no realizar podas en verde que favorezcan brotes que cubran los racimos;
- sistemas de riego que disminuyan la humedad excesiva en el viñedo;
- cubrir con tierra la base de las cepas que favorecería el desarrollo de hongos entomopatógenos en pupas hibernantes
- uso de variedades menos compactas con mejor aireación
- cosecha completa para eliminar larvas de la tercera/cuarta generación que aún no han salido del racimo para empupar

Estás prácticas si bien contribuyen a reducir las poblaciones de la plaga, no son por si solas efectivas en el control, es por ello que se combinan con otras herramientas. Además, para evitar la propagación del insecto se deben limpiar y desinsectar herramientas de cosecha como son máquinas cosechadoras y tachos cosecheros, especialmente cuando estas se mueven de un oasis productivo a otro.

Control autocida o técnica del insecto estéril (TIE)

Consiste en la liberación en grandes cantidades de individuos, generalmente machos, estériles o que son portadores de genes letales. La producción de los insectos se hace en crías artificiales a gran escala y se esterilizan mediante rayos gamma o agentes químicos y luego son liberados. Los insectos irradiados disminuyen la capacidad reproductora de la población salvaje por estar presentes en mayores proporciones, evitando la cópula entre insectos fértiles, dando las hembras descendencia no viable. La TIE ha sido aplicada con cierto grado de éxito en el manejo de carpocapsa, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) y en Mendoza con mayor éxito en el control de las poblaciones de la mosca de la fruta, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). En la provincia son liberadas semanalmente unos 220 millones de machos estériles de *C. capitata*, consiguiendo para este caso el estatus de zona libre de la mosca de la fruta y en el oasis Norte zona de baja prevalencia de esa plaga. Para el caso de *L. botrana* se están desarrollando metodologías para crías a gran escala y posterior esterilización. Aprovechando este “saber cómo” desarrollado para *C. capitata* se comenzaron en el año 2020 algunas liberaciones piloto de ejemplares estériles de la polilla de la vid (ISCAMEN, 2020). En Chile se viene ensayando desde el año 2015 produciendo actualmente *L. botrana* estériles en Centro de Producción de Insectos Estériles (CPIE) del Servicio Agrícola Ganadero de Arica. Se ha reportado que el nivel de radiación óptimo es de 150 Gy (Saour, 2014), lo que resulta en hembras irradiadas con un 99% de esterilidad y machos irradiados con un 66%, pero transmitiendo a su descendencia (F1) el gen de esterilidad que posee un 99,6% de inviabilidad (Fundación para el Desarrollo Frutícola, 2018). Hasta el momento no se ha reportado el empleo con éxito de la TIE en polilla de la vid, probablemente debido a problemas en el escalonamiento de la cría a costos más bajos.

1.3.5 Control biológico

Este método de control merece un apartado especial, ya que es objeto de estudio de esta Tesis. Existe la necesidad de buscar y evaluar otros factores de mortandad de *L. botrana*

que, de incorporarse a los planes sanitarios actuales, permitirían un control efectivo, a la vez que evite problemas de resistencia y de contaminación, en un contexto de MIP.

En este sentido se cuenta con la técnica del control biológico, que se define según DeBach (1964): “la acción de los parasitoides, depredadores o patógenos para mantener la densidad de la población de un organismo plaga a un promedio más bajo del que ocurriría en su ausencia” o más sencillamente definido como “... el uso de organismos benéficos (enemigos naturales) contra aquellos que causan daño (plagas)” (Nicholls, 2008).

El uso del control biológico puede resultar en un control eficiente a un costo mucho menor que el control químico, las relaciones costo-beneficio (unidad invertida por unidad retornada) van de 1: 2,5-5 y 1: 30 respectivamente (Bale et al., 2008; van Lenteren et al., 2018, 2020).

A pesar del éxito que ha tenido el CB en el mundo, la implementación se ve dificultada en parte debido a la fuerte presión ejercida por los intereses económicos de la industria de plaguicidas, además de un abordaje reduccionista por parte de funcionarios y científicos ligados sector agropecuario que promueven “soluciones mágicas” mediante un uso casi exclusivo de plaguicidas químicos (Carrasco et al., 2012).

Tipos de control biológico

Según Cock et al. (2010), se distinguen cuatro tipos de control biológico de acuerdo al enfoque utilizado para su implementación:

Control biológico clásico: Usualmente unos pocos individuos son colectados y liberados contra plagas invasivas exóticas. Los agentes de control biológico (ACB) empleados en este caso son exóticos, pero asociados a la plaga a controlar en su lugar de origen. Este tipo de control biológico posee una muy alta relación costo-beneficio 1: 20-500 (Bale et al., 2008) y resulta en un control a largo plazo una vez establecido el ACB. La tasa de éxito es de 1 de cada 10 candidatos. Sin embargo, la aplicación del control biológico clásico se ha visto disminuida debido a la implementación del protocolo de Nagoya (van Lenteren, 2020). Un caso emblemático de control biológico clásico es el de la cochinilla algodonosa en cítricos de California en el año 1880 que se controló gracias a la importación de la vaquita *Rodolia cardinalis* (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae) proveniente de Australia.

En Argentina unas 70 especies de parasitoides, ocho predadores y siete patógenos han sido introducidos con esta finalidad desde principios del siglo XX (Greco et al., 2020). Excluyendo el control de malezas, se estima que actualmente bajo control biológico clásico

en este país hay aproximadamente unas 800.000 ha principalmente en cultivos de pino para el control de *Sirex noctilio* Fabricius (Hymenoptera: Siricidae) (Greco et al., 2020).

Control biológico por conservación: Este tipo de control se orienta a tomar medidas en el cultivo o su entorno para incrementar la diversidad, cantidad y eficiencia de enemigos naturales. Se propicia aumentando la disponibilidad de alimento, refugio y presas/hospedantes alternativos o cambiando prácticas del cultivo, por ej. la eliminación de plaguicidas de amplio espectro o su utilización en determinados momentos del ciclo del cultivo que no afecten directamente a los enemigos naturales. Implica muchas veces una modificación del ambiente, cultivando plantas útiles o incrementando la cobertura vegetal en los suelos descubiertos.

En viñedos, la utilización de vegetación en el espacio interfilar (entre hileras) con plantas con flor promueve la presencia de predadores y parasitoides (López García et al., 2019), así como también corredores biológicos de vegetación con flor han demostrado disminuir poblaciones de insectos plaga (Altieri et al., 2005; Nicholls et al., 2001, 2008). Plantas nativas e implantadas en viñedos de Australia aumentaron la depredación y parasitismo de huevos de un tortricido plaga, incrementando a su vez la abundancia, longevidad y fecundidad de estos controladores (Begum et al., 2006; Danne et al., 2010). La utilización de “mulching” o acolchados orgánicos en viñedos, como rastrojos de paja por ejemplo, aumenta la diversidad y/o abundancia de parasitoides, carábidos predadores y arañas (Thomson & Hoffmann, 2007). Al contrario las labranzas tienen un efecto negativo en los insectos benéficos (Sharley et al., 2008).

El control biológico por conservación posee un gran potencial, con efectos a largo plazo y menores costos. Sin embargo, no se han obtenido resultados consistentes respecto al control de plagas e incremento de insectos benéficos en cultivos orgánicos respecto a los de manejo convencional (Hoffmann et al., 2017). De hecho en viñedos orgánicos los niveles de parasitismo sobre la polilla de la vid fueron inferiores a los encontrados en viñedos convencionales en Burdeos, Francia (Rusch et al., 2015).

Control biológico aumentativo: Para lograr un rápido control de la plaga, ACB nativos o exóticos son criados en grandes cantidades para ser liberados periódicamente en los cultivos en momentos oportunos (van Lenteren et al., 2018). El control biológico aumentativo (CBA) ha sido utilizado por 120 años y se emplea en alrededor de 30 millones de ha en todo el mundo. Alrededor de 350 especies de invertebrados y 94 especies de microorganismos son comercializados en el mundo para este fin (van Lenteren et al., 2018).

En algunos casos la liberación de enemigos naturales reemplazó por completo a las aplicaciones de plaguicidas como es el caso de invernaderos en España en el control de trips (Thysanoptera) y mosca blanca (Hemiptera: Aleyrodidae). La tendencia en Europa y en el mundo es a una utilización de especies nativas por sobre las exóticas para el CBA (Fig. 1.8).

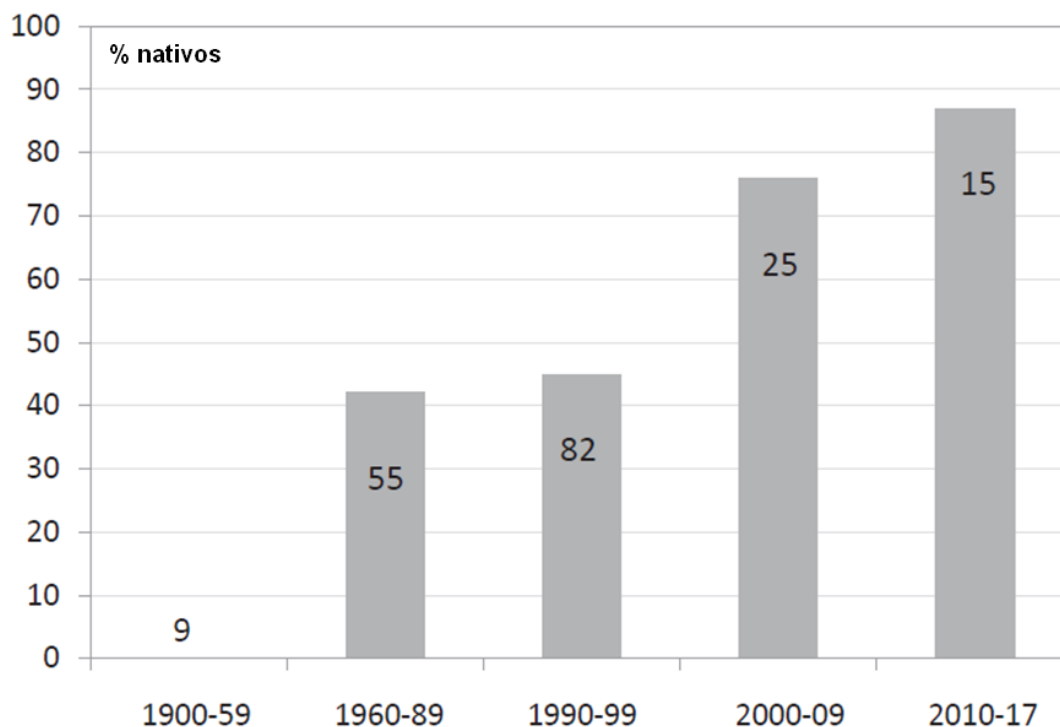


Figura 1.8 Porcentaje de nuevos enemigos naturales nativos en el mercado europeo a través del tiempo para control biológico aumentativo (en columnas; cero entre 1900-1959). Total de introducciones por periodo son dadas en números.

Tomado de van Lenteren, 2020

En Argentina la superficie bajo CBA se estima en unas 26.600 ha, de las cuales unas 25.000 ha corresponden a liberaciones del parasitoide *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) para controlar a *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) en caña de azúcar, unas 1.500 ha en el control de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) mediante el parasitoide *Tamarixia radiata* Waterston (Hymenoptera: Eulophidae) y unas 128 ha en el control de plagas hortícolas. Ambos parasitoides, *C. flavipes* y *T. radiata*, son exóticos para la región y fueron importados para controlar plagas invasivas. Sin embargo, diversos estudios se han realizado para el empleo de parasitoides nativos como es *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethyridae) y *Pseudapanteles dignus* Muesebeck

(Hymenoptera: Braconidae) para el control de lepidópteros plaga en frutales y cultivos hortícolas respectivamente (Garrido et al., 2007, 2019; Luna et al., 2007, 2015).

Algunos autores distinguen entre un control biológico inoculativo o un control biológico inundativo. La diferencia reside en que en el control biológico inoculativo se libera un pequeño número de individuos de la especie controladora y se espera que se éstos se establezcan, integrándose de esta forma al agroecosistema. En cambio, en el control biológico inundativo, son liberadas grandes cantidades de individuos de una especie de enemigo natural cada vez que se necesite reducir la población de la plaga, ya que la persistencia en el agroecosistema es baja o la respuesta no es lo suficientemente rápida como para lograr un control efectivo. La forma de empleo de los ACB en este caso es análoga a la de los plaguicidas, ya que se espera en muchos casos un efecto inmediato del enemigo natural sobre la plaga a controlar. Para esta Tesis se tomó como liberación inundativa cuando se emplea una dosis igual o superior 1:1 (parasitoide:hospedador).

Debido a dificultades para la importación de ACBs y a los posibles riesgos que conlleva la introducción de especies exóticas a una nueva región, en especial sobre organismos no blanco, el uso de enemigos naturales nativos utilizados en CBA ha ido en incremento (Fig. 1.8). En muchos casos se logró un control exitoso incluso de plagas invasivas recientemente introducidas, como la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) en invernaderos de España (Cabello et al., 2012).

Para desarrollar un programa de control biológico aumentativo se indican los siguientes pasos a seguir (Hajek, 2004):

1. Identificación de un mercado que busque una solución alternativa al uso de plaguicidas de síntesis para el manejo de una plaga.
2. Encontrar un enemigo natural para la producción masiva: que sea efectivo contra la plaga objetivo (luego de comprobarlo en ensayos de laboratorio y de campo) y económico de producir.
3. Desarrollo de un método de producción masiva
4. Desarrollo de métodos de almacenaje y transporte
5. Estudios científicos para el establecimiento de dosis de liberación en diferentes situaciones y métodos de liberación.

Además, se considera al **control biológico natural**, donde en este caso los organismos dañinos son controlados por organismos benéficos que ocurren naturalmente en los ecosistemas sin intervención humana. Se lo considera como un servicio ecosistémico de la

propia Naturaleza, cuyo valor mínimo se calcula en unos 400 billones de dólares estadounidenses por año (Costanza et al., 1997), siendo el tipo de control biológico que más contribuye en términos económicos. En viñedos, es necesario profundizar los estudios para determinar los roles de varias especies de enemigos naturales espontáneos ya que son poco conocidos y podrían estar brindando este servicio (Thiéry et al., 2018).

1.4 Control biológico en *L. botrana*

El control biológico puede ser en sí mismo una forma eficiente en el control de poblaciones de la polilla de la vid. Hoy en día el organismo más difundido y disponible comercialmente a nivel mundial para el control biológico de *L. botrana* es la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner (var. *kurstaki* y var. *aizawai*) (Pertot et al., 2017; Thiéry et al., 2018) con buena eficiencia (más del 90%) y en ensayos de laboratorio con un 100% de mortalidad de huevos (Herrera, 2019). Otro entomopatógeno probado en el país de Georgia es el virus *Baculovirus orana* con una eficiencia reportada del 60 - 100% pero su uso se ha limitado debido al efecto retardado sobre larvas (Chkhubianishili & Malaniya, 1986).

Asimismo, existen nematodos entomopatógenos que causan mortalidad en insectos debido a la infección con bacterias simbiotes que estos necesitan para poder alimentarse del insecto y luego reproducirse. Nematodos entomopatógenos, sus bacterias asociadas y las toxinas producidas por estas han sido probados en España y diversos lugares del mundo sobre *L. botrana* con resultados prometedores, especialmente para el nematodo *Steinernema carpocapsae* (Weiser) y los compuestos bioactivos de sus bacterias (Vicente-Díez et al., 2021).

Otros organismos benéficos probados en Turquía y Argentina (San Juan) han sido los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin y *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. los que producen una mortalidad superior al 90% en condiciones de laboratorio (Gholizad et al., 2017; Sammaritano et al., 2018), pero su habilidad de actuar en la canopia del viñedo puede ser limitada. En viñedos de Argentina fueron caracterizadas varias cepas de estos hongos con niveles de control de larva de *L. botrana* en el campo superiores al 90% (López Plantey et al., 2019; Sammaritano et al., 2018). Se registraron hongos de las especies *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *Metarhizium robertsii*, (Metchnikoff) Sorokin este último con capacidad de desarrollarse a temperaturas elevadas, condiciones en las que se encuentran expuestos los viñedos mendocinos. Asimismo en Chile fueron probadas cepas de *M. robertsii* y *Beauveria pseudobassiana* con

porcentajes de mortalidad en pupas hibernantes en condiciones de campo superiores al 70% (Altimira et al., 2022). Una ventaja del uso de estos hongos es que pueden ejercer además un efecto depresor sobre hongos dañinos como *B. cinerea* y *Eutypella microtheca* Trouillas, W.M. Pitt et Gubler (Aguilera-Sammaritano et al., 2021; Sammaritano et al., 2018).

Los ACB más estudiados corresponden a los parasitoides, principalmente los pertenecientes al orden Hymenoptera. Sin embargo, el éxito en el uso de estos organismos controladores de plagas requiere esfuerzos en adquirir conocimientos básicos del parasitoide y su relación con el hospedero a controlar. Otro punto clave es saber cómo beneficiar la supervivencia y elevar la fecundidad de los organismos benéficos (Thiéry et al., 2011, 2018).

Muchos estudios se han enfocado en relevar la diversidad de enemigos naturales de *L. botrana* (Tabla 1.1), pero su potencial de control no ha sido evaluado (Thiéry et al., 2018). Se han reportado más de 90 especies de parasitoides asociados a *L. botrana*, muchas de ellas halladas en lo que podría ser la región de origen de la polilla de la vid en Italia (Scaramozzino et al., 2017).

Tabla 1.1 Listado (no exhaustivo) de especies de parasitoides registrados para *Lobesia botrana* registrados a nivel mundial. - sin datos de parasitismo, * porcentaje relativo a la población total de parasitoides, ** hiperparasitoide facultativo de *C. capitator*.

Especie/Familia	Estado parasitado	Parasitismo (%)	Lugar	Referencia
Hymenoptera				
Ichneumonidae				
<i>Agrothereutes abbreviatus</i> (Fabr.)	Pupa	-	Italia	(Scaramozzino et al., 2018; Thiéry et al., 2018)
<i>Agrothereutes pumilus</i> (Kriechbaumer, 1899)	-	-	Cerdeña, Italia	(Delrio et al., 1987)
<i>Agrypon anxium</i> (Wesmael, 1849)	Larvas	-	Suiza y Francia	(Moreau et al., 2010)
<i>Bathythrix argentata</i> (Gravenhorst, 1829)	-	-	Italia	(Marchesini & Montá, 1994)
<i>Bathythrix decipiens</i> (Gravenhorst, 1829)	-	-	Italia	(Marchesini & Montá, 1994)
<i>Campoplex borealis</i> (Zetterstedt, 1838)	Larvas	-	Puglia, Italia	(Nuzzaci & Triggiani, 1982)
<i>Campoplex capitator</i> Aubert, 1960	Larvas-prepupas	1-50	Valencia, España; La Toscana, Italia; Burdeos, Francia; Suiza	(Bagnoli & Lucchi, 2006; Coscolla, 1980; Di Giovanni et al., 2022; Moreau et al., 2010; Thiéry & Xuereb, 2003)
<i>Campoplex difformis</i> (Gmelin, 1790)	Larvas-prepupas	4	Austria; Bulgaria,	(Scaramozzino et al., 2018)

			Francia; Alemania; Italia; Rusia; España	
<i>Diadegma fenestrale</i> (fenestralis) (Holmgren, 1860)	Larvas	-	Sion, Suiza	(Moreau et al., 2010)
<i>Dicaelotus inflexus</i> Thomson, 1891	Pupas, larvas	-	La Toscana, Italia; Burdeos, Francia; Tavel y Colmar, Francia	(Bagnoli & Lucchi, 2006; Moreau et al., 2010; Thiéry & Xuereb, 2003)
<i>Enytus apostata</i> (Gravenhorst, 1829)	Larvas	4.2	Orumieh, Irán	(Akbarzadeh Shoukat, 2012)
<i>Exochus lentipes</i> (notatus) Gravenhorst, 1829	Larvas-pupas	<1	La Toscana, Italia; Suiza y Francia	(Di Giovanni et al., 2022; Moreau et al., 2010)
<i>Exochus</i> sp. Gravenhorst	Pupas	-	La Toscana, Italia	(Bagnoli & Lucchi, 2006)
<i>Gelis areator</i> (Panzer, 1804)	Crisálidas invernantes	<1	Rioja, España	(Pérez Moreno et al., 2000)
<i>Gelis cinctus</i> (Linnaeus, 1758)	-	-	Italia	(Marchesini & Montá, 1994)
<i>Hyposoter</i> sp. Forster	Crisálidas invernantes	<1	La Rioja, España	(Pérez Moreno et al., 2000)
<i>Ischnus</i> (<i>Habrocryptus</i>) <i>alternator</i> (Gravenhorst, 1829)	Crisálidas invernantes	11*	Valencia, España	(Coscolla, 1980)
<i>Itopectis alternans</i> (Gravenhorst, 1829)	Pupas	<1**	La Toscana, Italia	(Di Giovanni et al., 2022; Thiéry et al., 2018)
<i>Itopectis maculator</i> (Fabricius, 1775)	Pupas Larvas	<1	La Toscana, Italia; Burdeos, Francia; Tavel y Colmar, Francia	(Bagnoli & Lucchi, 2006; Moreau et al., 2010; Thiéry & Xuereb, 2003)
<i>Itopectis tunetana</i> (Schmiedeknecht, 1914)	Pupas/Crisálidas invernantes	1.9	La Toscana, Italia La Rioja, España	(Di Giovanni et al., 2022; Pérez Moreno et al., 2000; Thiéry et al., 2018)
<i>Phytodietus</i> (<i>Phytodiaetus</i>) sp. Gravenhorst	Pupas	-	La Toscana, Italia	(Bagnoli & Lucchi, 2006)
<i>Pimpla apricaria</i> Costa, 1885	Pupas	-	Cerdeña, Italia	(Delrio et al., 1987)
<i>Pimpla contemplator</i> (Müller, 1776)	Pupas	<1	La Toscana, Italia	(Di Giovanni et al., 2022)
<i>Pimpla</i> sp. Fabricius	Crisálidas invernantes	<1*	Valencia, España	(Coscolla, 1980)
<i>Pimpla spuria</i> Gravenhorst, 1829	Pupas Larvas	-	La Toscana, Italia	(Bagnoli & Lucchi, 2006)
<i>Pimpla turionellae</i> (Linnaeus, 1758)	Pupas	-	-	(Thiéry et al., 2018)
<i>Pristomerus vulnerator</i> (Panzer, 1799)	Larvas	<1	Orumieh, Irán	(Akbarzadeh Shoukat, 2012)
<i>Scambus elegans</i> (Woldstedt, 1877)	Larvas	-	Burdeos, Francia	(Thiéry & Xuereb, 2003)
<i>Sinophorus turionum</i> (Ratzeburg, 1844)	Larva		Austria; Italia	(Scaramozzino et al., 2018)
<i>Temelucha</i> sp. Forster	Larvas	<1	Orumieh, Irán	(Akbarzadeh Shoukat, 2012)
<i>Theroscopus hemipteron</i> (<i>hemipterus</i>) (Riche, 1791)	Pupas	-	La Toscana, Italia	(Bagnoli & Lucchi, 2006)

<i>Tranosemella praerogator</i> (Linnaeus, 1758)	Larvas, pupas	-	-	(Thiéry et al., 2018)
<i>Trichomma enecator</i> (Rossi, 1790)	Larvas-pupas	<1	La Toscana, Italia	(Di Giovanni et al., 2022)
<i>Triclistus lativentris</i> Thomson, 1887	Larvas-pupas	-	Cerdeña, Italia	(Delrio et al., 1987)
<i>Triclistus meridionator</i> (<i>meridiator</i>) Aubert, 1960	Larvas	-	Colmar, Francia	(Moreau et al., 2010)
<i>Triclistus pallipes</i> Holmgren, 1873	Larvas-pupas	1,1	La Toscana, Italia	(Di Giovanni et al., 2022)
<i>Triclistus</i> sp. Forster	Pupas	-	La Toscana, Italia	(Bagnoli & Lucchi, 2006)
Braconidae				
<i>Apanteles</i> sp. Forster	Larvas	<1	Valencia, España; Suiza y Francia	(Coscolla, 1980; Moreau et al., 2010)
<i>Ascogaster quadridentata</i> Wesmael, 1835	Huevos-prepupa	-	La Toscana, Italia	(Bagnoli & Lucchi, 2006; Di Giovanni et al., 2022)
<i>Bassus linguarius</i> (Nees, 1812)	larva		Italia	(Nuzzaci & Triggiani, 1982)
<i>Bracon admotus</i> Papp, 2000	Larvas	<1	La Toscana, Italia	(Di Giovanni et al., 2022)
<i>Bracon</i> sp. Fabricius	Larvas	<1	Orumieh, Irán	(Akbarzadeh Shoukat, 2012)
<i>Habrobracon concolorans</i> (Marshall, 1900)	Larvas	<1	La Toscana, Italia	(Di Giovanni et al., 2022)
<i>Habrobracon hebetor</i> (Say, 1836)	Larvas	1,1	Orumieh, Irán	(Akbarzadeh Shoukat, 2012; Di Giovanni et al., 2022)
<i>Habrobracon pillerianae</i> Fisher, 1980	Larvas	<1	La Toscana, Italia	(Di Giovanni et al., 2022)
<i>Microplitis</i> sp. Forster	Larvas	<1	Valencia, España	(Coscolla, 1980)
Bethylidae				
<i>Goniozus gallicola</i> (Kieffer, 1905)	Larvas	-	La Toscana, Italia	(Bagnoli & Lucchi, 2006)
<i>Goniozus legneri</i> Gordh, 1982	Larvas	-	Chile; Mendoza, Argentina	(Gerding et al., 2014; Marcucci et al., 2023)
<i>Goniozus</i> sp. Förster	Larvas	-	Sion, Suiza	(Moreau et al., 2010)
Chalcididae				
<i>Antrocephalus</i> sp. Kirby	Crisálidas invernantes	<1*	Valencia, España	(Coscolla, 1980)
<i>Brachymeria panamensis</i> (Holmgren, 1868)	Crisálidas invernantes	10	Mendoza, Argentina	(Cucchi, 2020)
<i>Conura</i> sp. Spinola	Crisálidas invernantes	10	Mendoza, Argentina	(Cucchi, 2020)
<i>Hockeria</i> sp. Walker	Crisálidas invernantes	-	La Toscana, Italia	(Bagnoli & Lucchi, 2006)
Eulophidae				
<i>Baryscapus nigroviolaceus</i> Nees, 1834	Crisálidas invernantes	<1	La Rioja, España	(Pérez Moreno et al., 2000)
<i>Colpoclypeus florus</i> Walker, 1839	Larvas	<1	La Toscana, Italia	(Di Giovanni et al., 2022)
<i>Elachertus affinis</i> Massi, 1911	Larvas	1-30	Valencia, España; La Toscana, Italia	(Bagnoli & Lucchi, 2006; Coscolla, 1980)
<i>Elasmus steffani</i> Viggiani, 1967	Larvas	-	Italia	(Marchesini & Montá, 1994)

Eupelmidae				
<i>Eupelmus</i> sp. Dalman	Larvas, pupas	<1	La Toscana, Italia	(Di Giovanni et al., 2022)
<i>Eupelmus urozonus</i> Dalman, 1820	Crisálidas invernantes	2,4	La Rioja, España; Valencia, España	(Coscolla, 1980; Pérez Moreno et al., 2000)
Pteromalidae				
<i>Dibrachys affinis</i> Masi, 1907	Crisálidas invernantes y larvas	40-70 (pupas) <1 (larvas)	La Rioja, España; Valencia, España; La Toscana, Italia	(Bagnoli & Lucchi, 2006; Coscolla, 1980; Pérez Moreno et al., 2000)
<i>Dibrachys microgastri</i> Bouché, 1834	Crisálidas invernantes	19,2	La Rioja, España; Valencia, España; Chile	(Coscolla, 1980; Gerding et al., 2014; Pérez Moreno et al., 2000)
<i>Mesopolobus mediterraneus</i> Mayr, 1903	Crisálidas invernantes	5,9	La Rioja, España	(Pérez Moreno et al., 2000)
<i>Pteromalus</i> spp. (>8 especies)	Larvas, pupas	-	-	(Thiéry et al., 2018)
Trichogrammatidae				
<i>Trichogramma agrotidis</i> Voegelé & Pintureau, 1982	Huevos	-	Francia	(Ibrahim, 2004; Noyes, 2017)
<i>Trichogramma brassicae</i> Bezdenko, 1968	Huevos	-	-	(Ibrahim, 2004; Noyes, 2017)
<i>Trichogramma cacaeciae</i> Marchal, 1927	Huevos	<1	La Toscana, Italia; Alsacia, Francia	(Barnay et al., 2001; Di Giovanni et al., 2022; Lucchi et al., 2016)
<i>Trichogramma cordubense</i> Vargas & Cabello, 1985	Huevos	9,5	La Toscana, Italia	(Di Giovanni et al., 2022; Lucchi et al., 2016)
<i>Trichogramma daumalae</i> Dugast & Voegelé, 1984	Huevos	-	Francia	(Ibrahim, 2004; Noyes, 2017)
<i>Trichogramma dendrolimi</i> Matsumura, 1926	Huevos	-		(Noyes, 2017)
<i>Trichogramma evanescens</i> Westwood, 1833	Huevos	5,8-25	La Toscana, Italia	(Bagnoli & Lucchi, 2006; Barnay et al., 2001; Di Giovanni et al., 2022; Lucchi et al., 2016)
<i>Trichogramma euproctidis</i> Girault, 1911	Huevos	<1	La Toscana, Italia	(Di Giovanni et al., 2022; Lucchi et al., 2016)
<i>Trichogramma ingricum</i> Sorokina, 1984	Huevos	-	-	(Akbarzadeh Shoukat & Ebrahimi, 2008; Noyes, 2017)
<i>Trichogramma minutum</i> Riley, 1871	Huevos	-	-	(Thiéry et al., 2018)
<i>Trichogramma nerudai</i> Pintureau & Gerding, 1999	Huevos	-	Chile	(Gerding et al., 2014)
<i>Trichogramma principium</i> Sugonjaev & Sorokina, 1976	Huevos	-	Francia	(Ibrahim, 2004; Noyes, 2017)
<i>Trichogramma semblidis</i> Aurivillius, 1898	Huevos		Francia; Alemania	(Ibrahim, 2004; Noyes, 2017)
Diptera				
Tachinidae				
<i>Actia pilipennis</i> (Fallén, 1810)	Larvas	<1	La Toscana, Italia	(Di Giovanni et al., 2022)
<i>Clemelis massilia</i> Herting, 1977	Larvas	<1	La Toscana, Italia	(Di Giovanni et al., 2022)

<i>Elodia morio</i> (Fallén, 1820)	Larvas	-	Crimea	(Martinez et al., 2006; Telenga, 1934)
<i>Nemorilla floralis</i> (Fallen 1810)	Larvas	1.16	Valencia, España	(Coscolla, 1980)
<i>Nemorilla maculosa</i> (Meigen, 1824)	Larvas	1,08	Orumieh, Irán; La Toscana, Italia	(Akbarzadeh Shoukat, 2012; Di Giovanni et al., 2022)
<i>Phytomyptera nigrina</i> (<i>nitidiventris</i>) (Meigen, 1824)	Larvas	<1	Valencia, España; La Toscana, Italia; Roquemaure, Francia	(Bagnoli & Lucchi, 2006; Coscolla, 1980; Di Giovanni et al., 2022; Moreau et al., 2010)

El parasitoide más destacado, tanto en porcentaje de parasitismo como por su distribución, es *Campoplex capitator* Aubert (Hymenoptera: Ichneumonidae) (Bagnoli & Lucchi, 2006; Coscolla, 1980; Di Giovanni et al., 2022; Moreau et al., 2010; Scaramozzino et al., 2018; Thiéry & Xuereb, 2003). Por este motivo está siendo considerado para un CBA o inoculativo en viñedos y parrales caseros de Chile (Salgado, 2021).

El control biológico junto con la TCS son tácticas que pueden ser compatibles, más eficientes que los insecticidas y, al contrario que estos últimos, con una buena aceptación por parte de la sociedad (Ioriatti et al., 2011). Es importante emplear herramientas de control que no generen conflictos entre el mundo agrícola y no-agrícola, más en una provincia turística como Mendoza, donde uno de los principales atractivos son los viñedos y bodegas, algunos ubicados además en áreas peri-urbanas.

En el año 2014, cuando comienza la implementación del protocolo de Nagoya, su espíritu fue el de propiciar un acceso a los recursos genéticos y la participación justa y equitativa de las sociedades en los beneficios derivados de su utilización. Sin embargo, procedimientos que resultan muy complicados y largos, deben ser seguidos antes de que una especie exótica sea importada, lo que ha resultado en una mayor búsqueda y prospección en ACB nativos (Fig. 1.8) (van Lenteren, 2020).

Tal es el caso de Argentina donde se prospectaron parasitoides de *L. botrana* en viñedos de Mendoza. Se encontró un complejo de ocho parasitoides de diversas familias (Ichneumonidae, Chalcididae, Eulophidae, Bethylidae, Trichogrammatidae) atacando los estados de huevo, larva y pupa (Marcucci et al., 2022). Entre estos se halló a *G. legneri* un betílido que había sido ensayado con anterioridad en laboratorio con potencial para un CBA (Garrido et al., 2018).

1.5 El parasitoide, *Goniozus legneri*

1.5.1 Taxonomía y morfología

Goniozus legneri es una microhimenóptero de la familia Bethyridae (Hymenoptera). Los betílidos pertenecen a la superfamilia Chrysidoidea, serie Aculeata y es más cercana evolutivamente a las abejas y avispas en sentido estricto por poseer un aguijón en lugar de la terebra con la que ovipositan e inyectan veneno los parasitoides de la serie Parasítica. Los chrysidoideos atacan o colocan a sus hospederos/presas en sitios cerrados, lo que posibilita un modo de vida idiobionte, definido como el de aquellos parasitoides que luego de atacar a sus hospedadores no les permiten continuar con su desarrollo (van Driesche et al. 2007). Los parasitoides idiobiontes suelen atacar hospederos que se hallan protegidos a su vez, de carroñeros y predadores (Whitfield, 1998). Otra característica es que poseen venenos paralizantes que permiten que la progenie se alimente externamente de los hospedadores (ectoparasitoides).

Las “avispa planas” o betílidos son fáciles de reconocer por su pequeño tamaño (1-20 mm), cuerpo aplanado, antenas de 12-13 artejos y fémures anteriores fuertes y grandes (Azevedo et al., 2014). Hay registradas cerca de 3000 especies que por lo general parasitan un rango limitado de hospederos, de los órdenes Coleoptera y Lepidoptera, y en algunos casos Hymenoptera. Los betílidos evolucionaron como parasitoides que utilizan hospederos en situaciones crípticas como minadores, barrenadores, que se encuentran dentro de tallos, frutos, madera o semillas y por ello tienen patas fosoriales y cuerpo aplanado (Evans, 1964). Algunos betílidos manifiestan tipos únicos de comportamiento subsocial, en donde varias hembras pueden convivir junto a un mismo hospedante y realizar cuidado parental de su progenie (Casale, 1991). Se ha registrado que pueden arrastrar o cargar a su hospedero/presa con mecanismos parecidos a los de otros Aculeata y en algunos casos únicos como es el caso de *Epyris eriogoni* Kieffer que carga su presa dorsalmente (Evans, 1964; Rubink & Evans, 1979). Muchos se alimentan de la hemolinfa de sus hospederos paralizados, conocido este evento como *host-feeding*, y esta alimentación puede ser concurrente o no concurrente, es decir con y sin oviposición posterior respectivamente (Jervis & Kidd, 1986). Además, son capaces de alimentarse de néctar, rara vez de néctar floral (Evans, 1964). Por su biología y comportamiento, son relevantes evolutivamente ya que podrían ser la transición entre Aculeata y grupos de Parasítica (Vargas-Rojas & Terayama, 2006).

Algunos betílidos son importantes controladores y han sido utilizados en programas de control biológico. Por ejemplo *Prorops nasuta* Waterst y *Cephalonomia stephanoderis* Betrem (Scleroderminae) son utilizados para el control de la broca del café (*Hypotenemus hampei* Ferrari) un coleóptero que ataca las bayas del café y se alberga dentro en galerías del fruto. Estos parasitoides fueron obtenidos en África y establecido con éxito en diversos países Neotropicales: Colombia, México, Centro América, Ecuador, Brasil, etc. (Bustillo Pardey, 2005).

Goniozus es el único género de Bethylinae registrado en Argentina con dos especies *G. legneri* y *G. nigrifemur* Ashmead, probablemente el bajo número de especies conocido se deba a la falta de registros e identificaciones en esta subfamilia. Este género se diferencia del resto de los betílidos en Argentina por poseer cuatro celdas cerradas en el ala anterior o si tienen tres con la vena Rs + M parcialmente desarrollada (Fig. 1.9) (Azevedo et al., 2014).

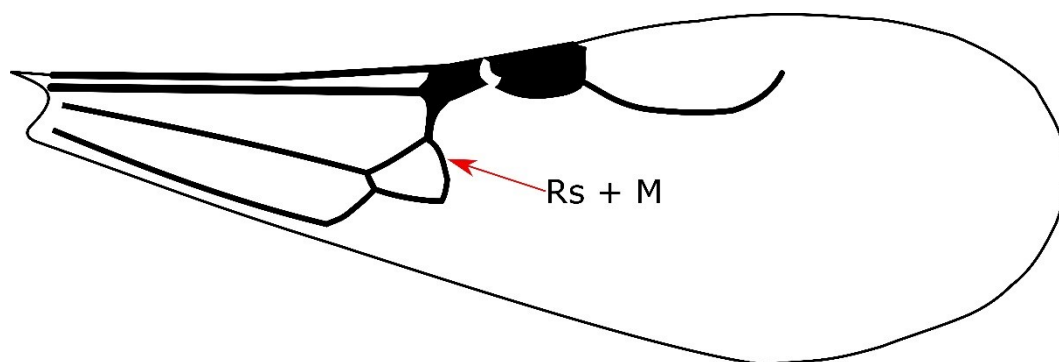


Figura 1.9 *Goniozus* spp. esquema del ala anterior. Flecha roja indica la vena sector Radial + Mediana (Rs+M)
Tomado de Marcucci et al., 2023

Las hembras y machos (Figs. 1.10.a y 1.10.b) poseen el cuerpo de color castaño oscuro a negro azabache, con las extremidades de un castaño más claro hacia los ápices y alas hialinas. La longitud corporal es de unos 3,5 mm (Garrido et al., 2005). Los machos se diferencian por su menor tamaño y por el gáster que termina en una forma obtusa debido a la presencia de los genitales masculinos.

Los huevos (Fig. 1.10.a) son cilíndricos alargados (himenopteriformes) y translúcidos blanquecinos de 0,6 a 0,8 mm de largo por unos 0,2 mm de ancho. El pasaje de huevo larva se distingue por un pequeño abultamiento en la región abdominal.

Las larvas (Fig. 1.10.b y 1.10.c) miden unos 3 mm completamente desarrolladas y poseen forma de pera adquiriendo el color del hospedero del cual se alimentan con segmentos difícilmente distinguibles y manchas blancas pequeñas. Pasan por tres estadios larvales.

Las pupas se encuentran dentro de un cocón tejido por las larvas antes de pupar. El color del cocón varía del blanco a blanco amarillento. Las pupas son blanquecinas al principio tomando un color más oscuro a medida que se desarrollan siguiendo un patrón descrito en detalle por Gordh et al. (1983).

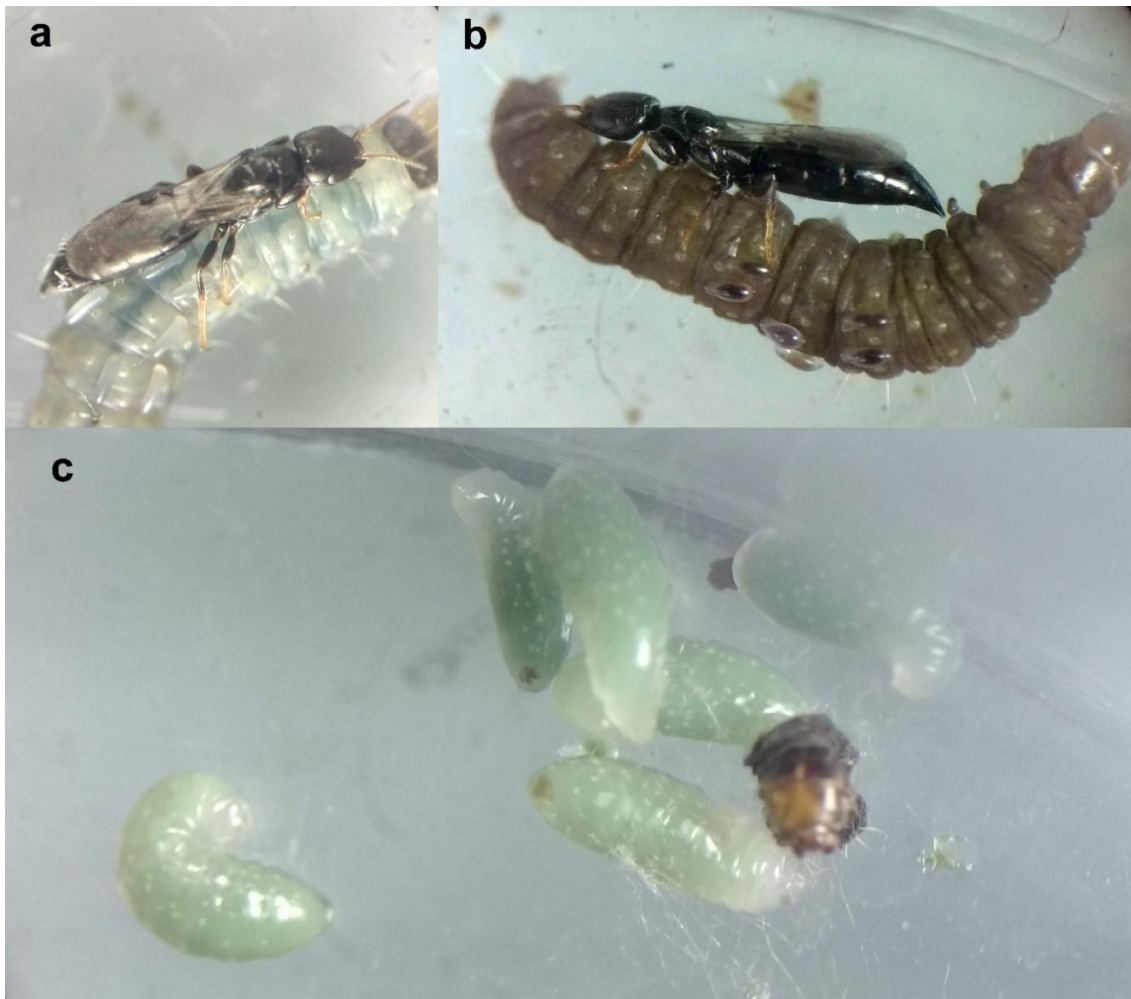


Figura 1.10 *Goniozus legneri* parasitando a *Lobesia botrana* a. Hembra adulta vista dorsal junto a huevos recientemente colocados. b. Hembra adulta vista lateral cuidando a larvas pequeñas. c. Larvas completamente desarrolladas comenzando a tejer cocones junto a restos del hospedero

1.5.2 Biología

Goniozus legneri es un ectoparasitoide idiobionte gregario, es decir que se desarrollan varios individuos por hospedador en grupos o camadas. Antes de oviponer, paraliza

mediante un veneno que inyecta por medio de su aguijón (Gordh et al., 1983). Se sujeta a su presa/hospedero mediante las patas anteriores y la mandíbula justo detrás de la cabeza penetrando con el aguijón en la región de la gula de la larva porque es donde se encuentra uno ganglio del cordón nervioso ventral lo que resulta en una rápida parálisis del hospedero. Luego de un periodo de alrededor de tres días, tiempo necesario para madurar los huevos en hembras recientemente eclosionadas, o de unos minutos en hembras más viejas, comienza a oviponer, evento que dura 1 h aproximadamente (Gordh et al., 1983; Hardy et al., 2000). Las larvas desarrollan rápidamente pasando por tres estadios, luego se desprenden y tejen sus cocones en las proximidades del hospedero. Pasan al estado de pupa dentro del capullo. Primero eclosionan los machos que ingresan a los capullos de las hermanas para copularlas dentro (Gordh et al., 1983).

La reproducción sexual, al igual que mayoría de himenópteros, es arrenotóquica, es decir los huevos fertilizados darán lugar a hembras y los no fertilizados a machos. Esto permite a *G. legneri* regular la proporción sexual, manteniendo una proporción de 8-9 hembras por cada macho.

Las hembras exhiben comportamiento de cuidado de su hospedero y cuidado parental. Las peleas entre hembras conespecíficas por la tenencia del hospedero han sido documentadas e inclusive se ha encontrado un compuesto que es emitido por la hembra perdedora que reduce la agresión hacia la misma (Goubault et al., 2006). Este comportamiento ha sido estudiado como caso modelo para ver qué factores hacen que un individuo resulte ganador en un encuentro (Bentley et al., 2009). Asimismo, es posible que *G. legneri* defienda a su prole de otras especies, resultando esto en una ventaja adaptativa que aumentaría la supervivencia en condiciones naturales.

Las hembras viven más que los machos, unos 60-90 días y unos 8-60 días respectivamente. Durante ese tiempo pueden llegar a oviponer 150-200 huevos (Gordh et al., 1983; Laumann et al., 2000b). El tamaño de las camadas colocadas por larva varía de acuerdo al tamaño del hospedero, se han reportado camadas de 2 a 16 huevos en distintos hospederos (Garrido et al., 2018; Gordh et al., 1983; Laumann et al., 2000b). La supervivencia de huevo a adulto es de alrededor del 85%.

Goniozus legneri es capaz de alimentarse de su hospedero de manera concurrente, es decir colocando sus huevos en el mismo hospedero del cual se alimentó (Gordh et al., 1983). A su vez, y dado que practica *host-feeding* no concurrente, este comportamiento es una causa de mortalidad de larvas cuando no hay hospederos adecuados para oviponer (El-Basha &

Mandour, 2006). Asimismo, es posible que obtenga nutrientes a partir de néctar presente en la vegetación, ya que muestra interés y utiliza alimentos a base de miel o azúcar en condiciones de cautiverio.

Se ha encontrado que *G. legneri* es capaz de parasitar a diversas familias de lepidópteros tendiendo a un comportamiento generalista. Se ha comprobado parasitismo en 17 especies diferentes (ver Capítulo 2 de esta tesis, tabla 2.1)

1.5.3 Antecedentes del parasitoide

Goniozus legneri fue inicialmente encontrado por Gordh y colaboradores en los años 1977-1979 en zonas de Uruguay y Argentina (Legner & Silveira-Guido, 1983). De allí fue llevado a California, Estados Unidos, para el control de *Amyelois transitella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) en cultivos de almendros. Su liberación comenzó en los años 1979 en estos cultivos, donde logró establecerse y lograr un buen control junto a *Goniozus emigratus* (Rohwer), sin necesidad del uso de feromonas de confusión sexual o insecticidas en algunos casos (Legner & Gordh, 1992). De Estados Unidos fue exportado a Israel, Egipto e Irán para controlar plagas en cultivos de almendro, algodón y granada, respectivamente (Gothilf & Mazor, 1987; Shoeb *et al.*, 2005; Ehteshami *et al.*, 2010).

En cuanto a su uso en Argentina, en el año 2004 *G. legneri* es encontrado parasitando larvas de *C. pomonella* en nogales y manzanos del Alto Valle de Río Negro (Garrido *et al.*, 2005). Allí comenzó a producirse en el Centro de Multiplicación de Biocontroladores (CEMUBIO) EEA Alto Valle, INTA. También ha sido evaluado con éxito sobre *C. pomonella* en frutales de pepita y nogales (Garrido *et al.*, 2019; Gordh *et al.*, 1983; Laumann *et al.*, 2000b). En cultivos de peral se registraron niveles de parasitismo para este lepidóptero del 40% con niveles de daño menores al 0,11% luego de cuatro campañas con liberaciones aumentativas, lo que demuestra el éxito de este parasitoide utilizado en conjunto con la TCS (Garrido *et al.*, 2019). Se ha encontrado atacando a *C. pomonella* nogales de Catamarca, motivo por el cual se comenzó a estudiar en laboratorio su desempeño sobre esta plaga (Aciar *et al.*, 2001).

En Chile, *G. legneri* es registrado en el año 2003 parasitando larvas de *E. ceratoniae* y *C. pomonella* manzanos y nogales. En el año 2014 se registró en este país la presencia de biocontroladores de *L. botrana* presentes también en Europa, como *Dibrachys microgastri* (Bouché) (Hymenoptera: Pteromalidae). Sin embargo, también se hallaron cuatro especies de nueva asociación. Entre estas nuevas asociaciones se encuentra *G. legneri*,

considerada de mucha utilidad como alternativa o complemento de las aplicaciones químicas o de las estrategias de confusión sexual, particularmente en zonas urbanas o en períodos del año en que se ha terminado con las aplicaciones de plaguicidas o en cultivos orgánicos (Gerding et al., 2014)

En base a los antecedentes expuestos, *G. legneri* es considerado como un posible agente de control biológico de *L. botrana* en Mendoza. Dado que a la fecha en Argentina ni en el mundo, existen estudios biológicos detallados sobre la plaga exótica *L. botrana* en su nueva interacción con el parasitoide nativo *G. legneri*, resulta relevante profundizar los conocimientos determinar la eficiencia de este enemigo natural para el control de la polilla de la vid en condiciones de laboratorio y de campo. Esta información es básica para el desarrollo de un programa de control biológico de la plaga en viñedos.

1.6 Objetivos e hipótesis

Objetivos

General:

Generar conocimientos para el desarrollo de una herramienta de control biológico de bajo impacto ambiental para un manejo sanitario sustentable de la plaga *L. botrana* en los viñedos de la región de Cuyo.

Específicos:

1. Establecer crías de enemigos naturales de *L. botrana* en la EEA Mendoza, INTA.
2. Determinar la presencia natural de *G. legneri* en la provincia de Mendoza
3. Evaluar el potencial de desarrollo y distintos parámetros poblacionales de *G. legneri* al parasitar a *L. botrana* en condiciones de laboratorio.
4. Evaluar la preferencia de *G. legneri* por diferentes especies hospederas.
5. Determinar si *G. legneri* es eficiente en la localización de su posible hospedero *L. botrana* explotando pistas olfatorias directas e indirectas presentes en los agroecosistemas.
6. Evaluar si en una liberación aumentativa del parasitoide puede reducir significativamente las poblaciones de la polilla de la vid.

Hipótesis de trabajo

En base a la información recabada para otras especies de hospederos, presentadas en los apartados anteriores, se plantea como hipótesis general para este trabajo de Tesis que el parasitoide *G. legneri* presenta atributos biológicos para ser considerado un ACB aumentativo de *L. botrana* en los viñedos de Mendoza.

Así, se predice que:

1. Los parámetros poblacionales (fecundidad, longevidad del adulto, tasas de reproducción, entre otros) muestran que *G. legneri* se desarrolla adecuadamente sobre *L. botrana*.
2. *Goniozus legneri* muestra preferencia y es capaz de detectar y encontrar a larvas de *L. botrana* por compuestos orgánicos volátiles emitidos por esta polilla o derivados de su actividad en los racimos de *V. vinífera*.
3. Este parasitoide reduce las poblaciones de *L. botrana* cuando la plaga se encuentra en un viñedo produciendo daño en racimos.

Es importante destacar que esta investigación es novedosa en cuanto a que es la primera vez que se evalúa a *G. legneri*, una especie parasitoide nativa, como agente de biocontrol de *L. botrana*, por lo que la información obtenida será de utilidad para el manejo integrado de la plaga en la región de Cuyo y con potencial de ser extrapolada a otras regiones vitivinícolas de la Argentina o Chile.

Capítulo 2. Presencia de *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethylidae) y su asociación con lepidópteros plagas en el Oasis Norte de la provincia de Mendoza, Argentina



2.1 Introducción

Un primer paso para la utilización de un enemigo natural como agente de control biológico es determinar si se halla presente en la región donde se planea liberar y si es capaz de afectar a la plaga objetivo en condiciones naturales, lo que indica una mayor posibilidad de éxito de esta técnica de protección vegetal. La presencia natural o espontánea de un agente de control biológico en la región implica además un menor riesgo de causar algún perjuicio en los agroecosistemas.

La avispa parasitoide *G. legneri* (Hymenoptera: Bethyridae) es un ectoparasitoide gregario que coloca varios huevos sobre un mismo hospedero, y cuya progenie teje, al culminar su desarrollo, concones a los alrededores de su hospedero. Estos pueden observarse como masas de cocones blancos de seda, siendo en ocasiones el único signo de la presencia del parasitoide.

Esta avispa es considerada un importante agente de control biológico en diversos países para el control de lepidópteros plaga (Biobichos Ltda., 2022; Garrido et al., 2019; Gothilf & Mazor, 1987; Legner & Silveira-Guido, 1983; Shoeb et al., 2005). Es producido y comercializado en Chile, y en Argentina existe una cría masiva en el Centro Multiplicador de Biocontroladores Nativos (CEMUBIO), INTA Alto Valle, Río Negro.

Goniozus legneri se ha establecido en numerosos países mostrando una gran adaptabilidad a diferentes condiciones climáticas desde climas desérticos a subtropicales. Asimismo, se ha encontrado parasitando a diversas especies de lepidópteros en distintas familias por lo que es considerado un generalista u oligófago (tabla 2.1).

Este parasitoide fue inicialmente encontrado por Legner y Silveira-Guido entre los años 1977 y 1979 en el norte y centro de Argentina y en Uruguay atacando larvas de dos lepidópteros pirálidos, gusano de la naranja navel *A. transitella* y de la polilla del algarrobo, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) en aromos *Vachellia farnesiana* (L.) Wight et Arn., ceibos *Erythrina crista-galli* L., nogales *Juglans regia* L. y níspero *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. (Legner & Silveira-Guido, 1983). De estas regiones fue introducido a Estados Unidos, criado y liberado para el control de *A. transitella* en cultivos de almendros *Prunus dulcis* (Mill.) (Legner & Gordh, 1992). De Estados Unidos fue importado a Israel en el año 1982 para el control de *E. ceratoniae* también en cultivos de almendros con tasas de parasitismo de hasta un 30% con un establecimiento del parasitoide y presencia en casi todos los sitios donde se liberó (Gothilf & Mazor, 1987). Asimismo, fue empleado en cultivos de algodón

Gossypium hirsutum L. sin poder lograr recuperaciones. Por el comportamiento de alimentación *Pectinophora gossypiella* (Saunders) sobre el algodón es posible que el parasitoide no pudiera hallarlo por ser inaccesible (Butler & Schmidt, 1985). En el año 1988 fue importado desde EE.UU. a Egipto para el manejo integrado de *P. gossypiella*. En ese mismo país ha sido encontrado atacando a dos especies de lepidópteros en cultivos de palma datilera (Shoeb et al., 2005 y citas dentro) y *Palpita vitrealis* Rossi (Lepidoptera: Crambidae) en olivares *Olea europea* L.. En esta última plaga se reporta su capacidad de realizar host-feeding sobre los hospederos de los primeros estadios por lo tanto de baja calidad para realizar posturas (El-Basha & Mandour, 2006). Más tarde probablemente debido a una dispersión del parasitoide en oriente se encontraría *G. legneri* parasitando a *E. ceratoniae* en granados *Punica granatum* L. de Irán (Ehteshami et al., 2010).

Tabla 2.1 *Goniozus legneri* es una especie oligófaga, citada de atacar y parasitar a lepidópteros de diversas familias:

Familia	Especie hospedera	Especie vegetal	Cita
Pyralidae	<i>Acrobasis nuxvorella</i>	<i>Carya illinoensis</i>	(Romero et al., 2001)
	<i>Amyelois transitella</i>	<i>Prunus dulcis</i> , <i>Erythrina crista-galli</i> , <i>Vachellia farnesiana</i> , <i>Juglans regia</i> y <i>Eriobotrya japonica</i>	(Gordh, 1982; Legner & Silveira-Guido, 1983)
	<i>Cactoblastis cactorum</i>	En laboratorio	(Faltlhauser et al., 2018)
	<i>Corcyra cephalonica</i>	En laboratorio	(Bentley et al., 2009)
	<i>Ectomyelois ceratoniae</i>	<i>Erythrina crista-galli</i> , <i>Vachellia farnesiana</i> , <i>Juglans regia</i> , <i>Eriobotrya japonica</i> y <i>Punica granatum</i>	(Ehteshami et al., 2010; Legner & Silveira-Guido, 1983; Zaviezo et al., 2007)
	<i>Ephestia kuehniella</i>	En laboratorio	(Shoeb et al., 2005)
	<i>Galleria mellonella</i>	En laboratorio	(Garrido et al., 2018)
	<i>Plodia interpunctella</i>	En laboratorio	(Garrido et al., 2018)
Tortricidae	<i>Cydia molesta</i>	En laboratorio	(Garrido et al., 2018)
	<i>Cydia pomonella</i>	<i>Malus domestica</i> y <i>Juglans regia</i>	(Garrido et al., 2005; Zaviezo et al., 2007)
	<i>Argyrotaenia pomiliana</i>	En laboratorio	(Garrido et al., 2005)
	<i>Choristoneura rosaceana</i>	En laboratorio	(Wang et al., 2014)

	<i>Lobesia botrana</i>	<i>Vitis vinifera</i> y en laboratorio	(Garrido et al., 2018; Gerding et al., 2014; Marcucci et al., 2023)
Gelechiidae	<i>Pectinophora gossypiella</i>	En laboratorio	(Gordh et al., 1983)
	<i>Tuta absoluta</i>	En laboratorio	(Garrido et al., 2018)
Noctuidae	<i>Spodoptera frugiperda</i>	En laboratorio	(Garrido et al., 2018)
Crambidae	<i>Palpita vitrealis</i>	<i>Olea europaea</i>	(El-Basha & Mandour, 2006)

La cría masiva de este parasitoide en Argentina está dirigida a realizar liberaciones en plantaciones de perales, manzanos y nogales para un manejo sanitario de bajo impacto ambiental en los valles de la Patagonia Norte contra la plaga *C. pomonella* (Garrido et al., 2019). Con respecto a otras regiones del país, se ha registrado el parasitismo natural de *G. legneri* sobre larvas de *C. pomonella* en cultivos de nogal de Catamarca, motivo por el cual se realizaron estudios de laboratorio para evaluar algunos aspectos de la interacción parasitoide-plaga como así también la toxicidad de varios plaguicidas (Aciar et al., 2001; Laumann et al., 2000b).

En la provincia de Mendoza, región donde se realizaron los estudios de esta Tesis, se han registrado pocas especies de betílidos (Azevedo et al., 2014; Fruitos & Marcucci, 2022) debido a la falta de muestreos e identificaciones. Se conoce la presencia de *Pseudisobrachium pallidipes* (Cameron) y se ha citado a *Cephalonomia hyalinipennis* Ashmead, esta última atacando probablemente al taladrillo de los frutales *Scolytus rugulosus* Ratz (Coleoptera: Scolytidae) (De Santis, 1970). Curiosamente se ha reportado *C. hyalinipennis* como hiperparasitoide facultativo de otros betílidos, entre estos *G. legneri* (Pérez-Lachaud et al., 2004). En cuanto a *G. legneri* ha sido hallado en provincias más al sur (Río Negro) o más al norte (Catamarca) (Aciar et al., 2001; Garrido et al., 2005), por lo que su presencia en Mendoza es probable. En Catamarca donde se halló al parasitoide a partir de monitoreos de *C. pomonella* en nogales en el mes de noviembre y diciembre (Aciar et al., 2001) y en el mes de febrero y marzo en coincidencia en algunos sitios con la época de cosecha (Laumann, 1998).

En base a los antecedentes antes expuestos sobre el potencial que posee este betílido como controlador de lepidópteros plaga, en especial de la polilla de la vid y a los registros de su presencia espontánea en otras regiones de la Argentina, se plantea realizar una

prospección de la especie *G. legneri* en diferentes hospederos y localidades de la provincia de Mendoza, importante región agrícola del país.

2.2 Materiales y métodos

La prospección incluyó la búsqueda de larvas de lepidópteros en tres especies vegetales, dos cultivadas, nogal *J. regia* y la vid *Vitis vinifera* L. y una silvestre, el espinillo *V. caven* (Molina) Seigler et Ebinger. Se seleccionaron siete localidades en cinco departamentos, abarcando dos oasis productivos.

2.2.1 Sitios de muestreo

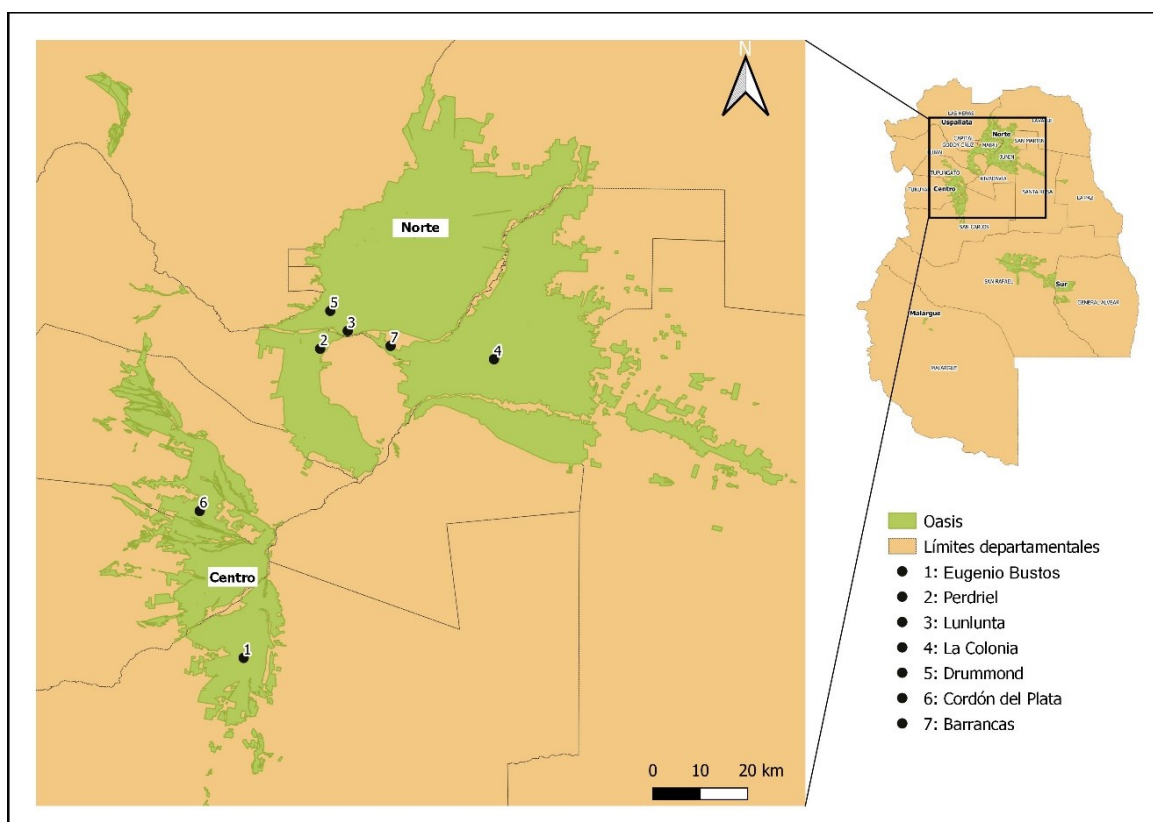


Figura 2.1 Mapa de la provincia de Mendoza indicando los oasis irrigados y sitios de muestreo.

El oasis Sur no fue muestreado en este trabajo ya que es el de menor prevalencia de *L. botrana*, e incluso, la plaga suele estar ausente.

Cada oasis posee características meteorológicas diferentes, las cuales se detallan a continuación (se indica entre paréntesis el número del sitio de muestreo) (Fig. 2.1 y Tablas 2.2 y 2.3):

Oasis Norte: comprende los cultivos irrigados por el río Mendoza y el río Tunuyán inferior. Es el oasis con mayor superficie vitícola de la provincia con unas 103.484 ha (INV, 2022). Los sitios ordenados de norte a sur son los siguientes:

- *Luján de Cuyo, Mayor Drummond* (5). Coordenadas: -33.00675, -68.85940. Altitud: 918 m. Se muestrearon plantas de vid bajo un manejo convencional, es decir laboreo de suelo tradicional dejando poca vegetación entre hileras y aplicaciones de insecticidas para el control de *L. botrana* con una frecuencia de dos a tres veces al año. El cultivo predominante del predio es vid.
- *Maipú, Lunlunta* (3). Coordenadas -33.05008, -68.82160. Altitud: 890 m. En este sitio fue muestreado un árbol de nogal de gran porte que se ubica dentro de una finca orgánica de vid y olivo. En los alrededores los principales cultivos son viñedos y olivos.
- *Maipú, Barrancas* (7). Coordenadas: -33.08443, -68.72357. Altitud: 760 m. Se muestrearon frutos de árboles de *V. caven* ubicados al costado de la ruta y rodeados de vegetación del monte con dominancia de “jarilla” (*Larrea* spp.).
- *Luján de Cuyo, Perdriel* (2). Coordenadas: -33.09064, -68.88566. Altitud: 965 m. Se muestrearon frutos de nogal en un cultivo comercial de 6,5 ha que se manejó de forma convencional con aplicación de insecticidas. La vegetación es escasa manteniendo el suelo con pocas plantas espontáneas. El cultivo predominante en la zona es la vid.
- *Junín, La Colonia* (4). Coordenadas: -33.11374, -68.48340. Altitud: 671 m. Es el sitio de menor altitud, con las temperaturas máximas más elevadas, con más de 42 °C en enero. Se muestreó una trinchera o hilera de nogales, que se haya junto a un parral de vid, donde se colocaron fajas de cartón corrugado. En el predio hay diversos cultivos como son olivos, durazneros, ciruelos entre otros. Se realizaron labores de cultivo y manejo de plagas propios de un cultivo convencional (aplicaciones de insecticidas sintéticos, laboreo intensivo de suelo, etc.)

Tabla 2.2 Datos meteorológicos Oasis Norte, promedio del último decenio disponible (2012-2021). HR= humedad relativa, Pp.= Precipitación acumulada

Estación meteorológica y sitios	Temperatura (° C)				HR (%)	Pp. (mm)
	Mes	Máx.	Media	Min.		
Rusell Sitios Mayor Drummond(5), Lunlunta(3) y Barrancas(7)	Enero	38,79	24,7	8,75	43,83	25,22
	Febrero	36,76	22,89	8,1	52,45	43,6
	Marzo	33,85	19,78	4,31	54,46	15,12
	Abril	28,94	15,83	2,86	61,36	12,22
	Mayo	23,74	11,19	-0,87	63,56	6,76
	Junio	21,68	7,61	-5,27	55,49	9,92
	Julio	21,44	6,82	-5,44	51,92	5,22
	Agosto	26,64	10,07	-3,34	40,28	2,16
	Septiembre	30,39	13,54	-1,51	39,76	17,04
	Octubre	32,97	16,73	1,8	40,31	11,34
	Noviembre	35,96	20,69	5,45	39,75	15,76
	Diciembre	38,31	23,39	7,95	39,92	20,48
Perdriel Sitio Perdriel(2)	Enero	35,82	22,29	8,02	42,79	44,83
	Febrero	33,56	20,42	6,87	53,04	48,98
	Marzo	31,24	17,29	2,74	54,82	27,7
	Abril	27,65	13,41	-0,21	60,94	16,66
	Mayo	23,64	8,97	-3,16	60,89	7,54
	Junio	31,67	5,13	-7,51	50,52	3,98
	Julio	21,85	4,43	-7,99	48,23	4,4
	Agosto	26,06	7,09	-6,51	37,05	7,4
	Septiembre	29,41	11,34	-4,03	35,75	7,04
	Octubre	30,67	14,68	-0,82	36,2	14,68
	Noviembre	33,36	18,41	2,91	36,92	34,84
	Diciembre	35,58	21,04	5,72	38,79	33
Junín Sitio La colonia(4)	Enero	42,07	23,36	7,91	53,44	40,08
	Febrero	37,19	21,36	5,35	62,19	62,26
	Marzo	41,61	17,69	2,22	63,67	28,12
	Abril	30,1	15,49	2,08	70,36	26
	Mayo	25,55	11,01	-0,42	73,43	17,14
	Junio	24,48	7,41	-4,76	65,95	5,68
	Julio	22,79	6,79	-5,08	61,98	1,94

Agosto	28,2	9,99	-3,93	51,88	2,96
Septiembre	31,74	13,65	-1,62	48,78	12,18
Octubre	33,64	16,85	0,91	49,75	10,2
Noviembre	50,91	20,26	3,35	49,13	20,58
Diciembre	38,82	21,29	5,08	50,32	24,38

Oasis Centro o Valle de Uco: irrigado por el río Tunuyán superior se ubica en una región de mayor altitud y latitud. La superficie implantada con vid alcanza unas 29.138 ha (INV, 2022)

- *Tupungato, Cordón del Plata* (6). Coordenadas: -33.46195, -69.16106. Altitud: 1037 m. Es el sitio con mayor humedad y altitud de los siete muestreados. En la zona predominan los cultivos de duraznero y nogal. El manejo del cultivo es convencional. La vegetación no cultivada es escasa manteniendo el suelo “limpio”.
- *San Carlos, Eugenio Bustos* (1). Coordenadas: -33.79846, -69.05991. Altitud: 971 m. Se trata del sitio de muestreo más meridional. En la zona son característicos los cultivos de ajo, vid y nogal.

Tabla 2.3 Datos meteorológicos Oasis Centro, promedio del último decenio disponible (2012-2021) y últimos siete años (2012-2019) para la estación meteorológica Tres esquinas. HR= humedad relativa, Pp.= Precipitación acumulada

Estación meteorológica y sitios	Mes	Temperatura (° C)			HR (%)	Pp. (mm)
		Máx.	Media	Min.		
Agua amarga Sitio Cordón del Plata(6)	Enero	37,10	23,55	8,96	53,00	39,40
	Febrero	35,40	21,34	7,68	63,38	49,02
	Marzo	32,83	18,37	4,11	66,04	18,34
	Abril	28,23	15,17	3,48	76,42	22,15
	Mayo	26,62	10,00	-5,23	74,51	11,11
	Junio	24,51	8,19	-2,63	67,53	5,99
	Julio	21,57	5,53	-5,68	70,70	101,70
	Agosto	27,26	9,36	-3,97	60,81	8,58
	Septiembre	29,28	11,96	-2,44	57,48	18,30
	Octubre	31,40	15,49	0,63	56,39	23,01
	Noviembre	34,09	19,26	4,65	52,95	37,47

	Diciembre	36,67	22,16	6,89	51,49	24,18
	Enero	41,06	26,13	9,39	40,21	42,86
	Febrero	39,30	24,17	5,41	50,43	57,83
	Marzo	36,10	20,84	5,16	49,61	11,29
	Abril	31,57	16,17	1,34	59,51	11,63
Tres esquinas	Mayo	26,29	12,04	-1,50	62,01	4,74
	Junio	24,57	7,90	-6,20	52,39	4,86
Sitio Eugenio Bustos(1)	Julio	23,43	7,09	-7,16	48,53	0,40
	Agosto	29,56	10,46	-4,31	40,56	5,69
	Septiembre	33,84	14,17	-2,03	37,69	3,26
	Octubre	35,03	18,07	1,51	36,43	8,57
	Noviembre	38,78	21,72	5,73	33,97	22,53
	Diciembre	41,43	24,90	9,02	35,65	15,23

2.2.2 Muestreos

Se delimitó una parcela de 1 ha cuando la extensión lo permitía, o algo menor, en cada sitio. El muestreo consistió en la recolección de frutos con signos de daño por lepidópteros barrenadores. Las características particulares de los relevamientos hechos en las distintas especies vegetales se detallan a continuación:

Nogales (sitios 3, 2, 4, 6 y 1): se colectaron frutos que se encontraban en el suelo y que manifestaban estar dañados (manchados o con presencia de aserrín) por *E. ceratoniae* o *C. pomonella* (Fig. 2.2.b), en los meses de marzo y abril del año 2022, momento cercano a la cosecha. También fueron revisadas fajas de cartón corrugado colocadas en troncos de estos árboles para obtener larvas diapausantes de *C. pomonella* en el mes de marzo del año 2019 en el sitio de La Colonia.

Viñedos (sitio 5): se retiraron y revisaron racimos con frutos dañados (deshidratados y/o con presencia de seda) por *L. botrana* en los meses de febrero del año 2020 y en enero y marzo del año 2022.

Espinillos (sitio 7): se colectaron vainas maduras del suelo y parte área con evidencia de daño de *E. ceratoniae* (Fig. 2.2.a) en el mes de mayo del año 2021 y en marzo del año 2022.



Figura 2.2 Frutos de espinillo *Vachellia caven* (a) y nuez (b) con abundante seda, heces y aserrín producto de la alimentación por *Ectomyelois ceratoniae*.

2.2.3 Identificación de los parasitoides

Obtención de adultos de los parasitoides y lepidópteros

Los frutos de las especies muestreadas se revisaron en búsqueda de larvas y pupas de lepidópteros y distintos estados de desarrollo de los parasitoides: huevos, larvas, pupas y adultos. Las larvas y pupas de los lepidópteros hospederos encontrados se criaron hasta la emergencia de adultos para identificar las especies presentes.

Las larvas parasitadas y los grupos de cocones (pupas) fueron colocados en recipientes cilíndricos de 2,5 cm x 2 cm (diámetro x altura) con tapa hermética y mantenidos en un bioterio a 25 °C, fotoperiodo 14:10 (L:O) y 20-40% HR hasta la obtención de los adultos. Los parasitoides obtenidos fueron mantenidos *in vivo* utilizando para su cría al hospedero alternativo *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) por su facilidad de mantenimiento ya que es alimentada exclusivamente con polen de abeja seco. La unidad de cría del hospedero consistió en envases de 500 cm³ con 50 g de dieta, donde cumplieron todo su ciclo, de huevo a adulto. La cría de *P. interpunctella* se realizó también en bioterio a 25 °C, fotoperiodo 16:8 (L:O) y 20-40% HR.

Identificación de *G. legneri* en base a caracteres morfológicos

Para la identificación de *G. legneri* se realizó un estudio sobre la morfología externa: alas, tórax, complejo metapectal-propodeal, cabeza, antenas, coloración del cuerpo y patas; y de la genitalia masculina de las avispas betílidas colectadas para compararlas con ejemplares ya identificados y descripciones del parasitoide. Se usó la clave de Azevedo et al. (2014) y

la descripción que se encuentra en Garrido et al. (2005) y Gordh (1982). Se tomó un ejemplar macho por sitio y se preparó la genitalia siguiendo la metodología descrita por Azevedo et al. (2018). Esta consistió en separar el extremo del gáster de los machos recolectados en alcohol mediante alfileres y pinzas del resto del cuerpo. Una vez disectado se colocó en una solución de hidróxido de potasio al 10% durante 24 h. Ya clarificado se separó el hipopigio de la genitalia quitaron otros restos. Se colocaron durante unos minutos en solución de ácido acético al 25% para neutralizar el hidróxido. Luego se colocaron en viales con glicerina procurando que las piezas se sumerjan en la misma para su conservación y posterior observación.

Identificación de *G. legneri* por medio de experimentos de cruzamientos

Para corroborar la identificación de la especie y la viabilidad e interfertilidad de las poblaciones halladas con la de laboratorio, los adultos de los parasitoides obtenidos en los muestreos (silvestres) fueron cruzados con individuos seleccionados de la cría de *G. legneri* que se encuentra en el Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Mendoza del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (criados). Dicha cría fue iniciada en el año 2018 con un pie de cría proveniente del CEMUBIO del INTA, EEA Alto Valle. La misma se mantiene sobre el hospedero alternativo *P. interpunctella* mediante el siguiente procedimiento: las larvas del último estadio (quinto) de *P. interpunctella* son ofrecidas a hembras de *G. legneri* en forma individual en vasos de 15 cm³ con tapa hermética para evitar el escape del parasitoide. Los parasitoides son mantenidos en bioterio a 25 °C, fotoperiodo 14:10 (L:O) y 20-40% HR.

Los ejemplares provenientes del campo se mantuvieron *in vivo* en un bioterio con las mismas condiciones ambientales controladas. Hembras copuladas de campo (provenientes de camadas con presencia de machos y hembras) se colocaron individualmente junto a una larva de quinto estadio de *P. interpunctella* para así obtener mayor número de individuos y poder realizar los ensayos de cruzamientos.

Se realizaron dos tipos de cruzamientos: 1) machos silvestres emergidos × hembras vírgenes de la cría prontas a emerger o recién emergidas, y 2) machos de la cría × hembras vírgenes obtenidas de los muestreos a campo. Las hembras vírgenes se obtuvieron eliminando los cocones de los machos distinguibles por su menor tamaño. Una vez permitida la cópula, las hembras fueron colocadas junto a una larva de *P. interpunctella*, para permitir la alimentación y oviposición. La fertilización de los huevos fue determinada por la obtención de hembras en esta primera descendencia (F1). Estas hembras, luego de

copuladas por machos del mismo grupo de cocones, se colocaron junto a larvas de *P. interpunctella* para evaluar su descendencia (F2). La presencia de individuos hembra en la descendencia de los cruzamientos fue un indicador de que los individuos fueron interfértiles. Por lo tanto, se contabilizó la cantidad de machos y de hembras obtenidas por avispa madre y se calculó la proporción sexual en la F2. En los sitios de Junín y Barrancas si bien se constató la presencia de descendientes viables, no se registró en ese momento el número ni el sexo de los individuos F2 ya que este estudio no estaba incluido en el plan original del trabajo de Tesis. A partir de este hallazgo, se decidió realizar un análisis más pormenorizado de los cruzamientos.

2.3 Resultados

Se realizaron 10 recolectas y todos los ejemplares de los parasitoides obtenidos (n=62) correspondieron a la especie *G. legneri*, excepto uno de la especie *Brachymeria* cf. *panamensis* (Holgrem) (Fig. 2.3), posible hiperparasitoide obtenido a partir de una pupa de *L. botrana*. Los mismos se encuentran depositados en la colección entomológica de la EEA Mendoza, INTA. De las siete localidades muestreadas se encontró a *G. legneri* en cuatro, todas comprendidas en el oasis Norte (Tabla 2.4).



Figura 2.3 Hembra de *Brachymeria* cf. *panamensis* obtenida de una pupa de *L. botrana* proveniente de un viñedo en Mayor Drummond.

Los parasitoides fueron encontrados atacando a las tres especies de lepidópteros registradas: *E. ceratoniae*, *C. pomonella* y *L. botrana* (Tabla 2.4). En el caso de los nogales se observaron ca. 1.500 nueces, *G. legneri* se hallaba tanto dentro de la nuez (Fig. 2.4.b) como entre el mesocarpo y el endocarpo. En Junín el hallazgo fue sobre una larva de *C. pomonella* en fajas de cartón corrugado (n=30 fajas) colocadas en nogales. En *V. caven* se revisaron cerca de 20 frutos y los parasitoides fueron encontrados dentro de los mismos. En viñedos, donde se observaron ca. 500 racimos, se encontraron cocones por fuera de las bayas (Fig. 2.4.a) y larvas parasitadas dentro y fuera de las mismas. En Eugenio Bustos (1) se encontraron cocones vacíos en nueces que probablemente pertenecieron a pupas de *G. legneri*.

Tabla 2.4 Número de larvas de lepidópteros atacadas por *Goniozus legneri* por especie vegetal, localidad, hospedero y fecha de muestreo en la provincia de Mendoza.

Especie vegetal	Localidad	Manejo ^a	Hospedero	Fecha	Nº larvas parasitadas ^b	Nº ind. obtenidos
<i>Juglans regia</i>	La Colonia (4)	Convencional	<i>Cydia pomonella</i>	marzo 2019	1 (30)	1♂-5♀
	Lunlunta (3)	Sin insecticidas	<i>Ectomyelois ceratoniae</i>	11/03/22	4 (1)	3♂-19♀
	Perdriel (2)	Convencional	<i>Ectomyelois ceratoniae</i>	15/3/22	0 (40)	-
	Cordón del Plata (6)	Convencional	<i>Ectomyelois ceratoniae</i>	21/4/22	0 (10)	-
	Eugenio Bustos (1)	Sin insecticidas	<i>Ectomyelois ceratoniae</i>	21/4/22	0 (10)	*
<i>Vitis vinifera</i>	Mayor. Drummond (5)	Convencional	<i>Lobesia botrana</i>	06/02/20	2 (100)	1♂-2♀
				18/01/22	1 (100)	1♂-3♀
				21/03/22	11 (40)	8♂-14♀
<i>Vachellia caven</i>	Barrancas (7)	--	<i>Ectomyelois ceratoniae</i>	09/05/21	2 (2)	1♂-3♀
			-	11/03/22	0 (2)	1 ♀

^aEn los manejos convencionales de nogal para *C. pomonella* se emplearon insecticidas como deltametrina, lambdacialotrina y clorantniliprole. En viñedos se emplearon insecticidas para combatir a *L. botrana*: metoxifenocida, spinetoram y clorantniliprole.

^bEntre paréntesis número de plantas muestreadas.

*Se encontraron cocones vacíos.

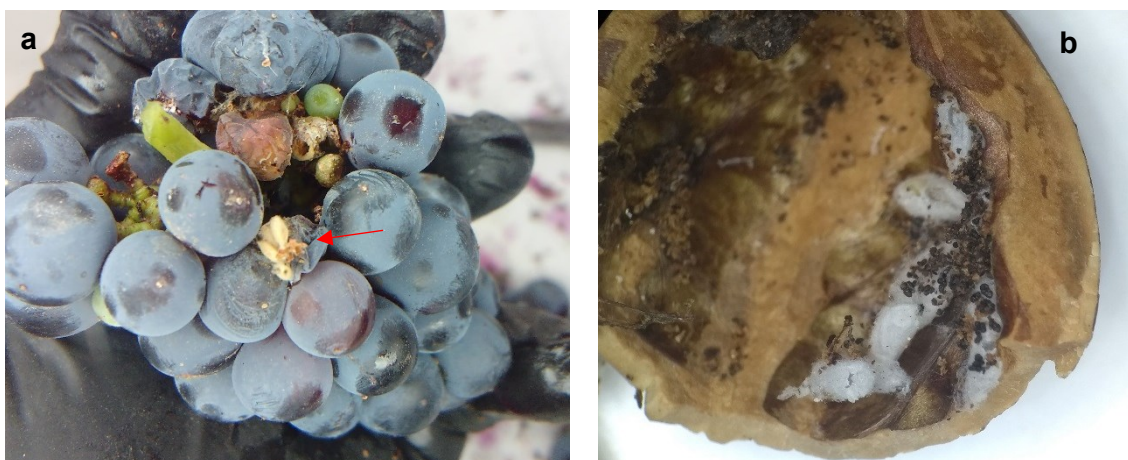


Figura 2.4 Cocones de *Goniozus legneri* hallados en cultivos. **a** Sobre racimos (flecha) con larvas y daño de *Lobesia botrana*. **b** Adheridos al endocarpio de una nuez resultado del parasitismo en *Ectomyelois ceratoniae*.

Las características morfológicas externas de los ejemplares silvestres coincidieron con las descritas para la especie, a saber: cuerpo castaño oscuro tendiendo al negro de entre 3 y 4 mm en hembras (Fig. 2.5.b). Patas con coxas, tibias y tarsos de color castaño claro a amarillento. Alas hialinas. Alas anteriores con cuatro celdas cerradas cada una (presencia de aereolet) (Fig. 2.5.d). Fémur anterior ensanchado y robusto. Cabeza más larga que ancha con quilla marcada en el clipeo, antenas de 12 flagelómeros de color pardo claro gradualmente más oscuros hacia los segmentos apicales (Fig. 2.5.c). Tórax sin notauli, signum parapsidal completo, con sutura mesoscutum-mesoscutellar marcada (Fig. 2.5.a). Complejo metapectal-propodeal con carina lateral y transversa posterior incompleta, sin carina metaposnotal media, con la banda media longitudinal más lisa que las áreas laterales (Fig. 2.5.a). Genitalia (Fig. 2.6): anillo genital incompleto, parámetros con pubescencia externa marcada, *digitus* con pubescencia en el extremo y superficie convexa con protuberancias; edeago fino, con el ápice ensanchado (lóbulos). Hipopigio con esquinas redondeadas, con pubescencia en la zona media-distal con una hendidura poco marcada, pedicelo medio presente y ensanchado en el ápice.

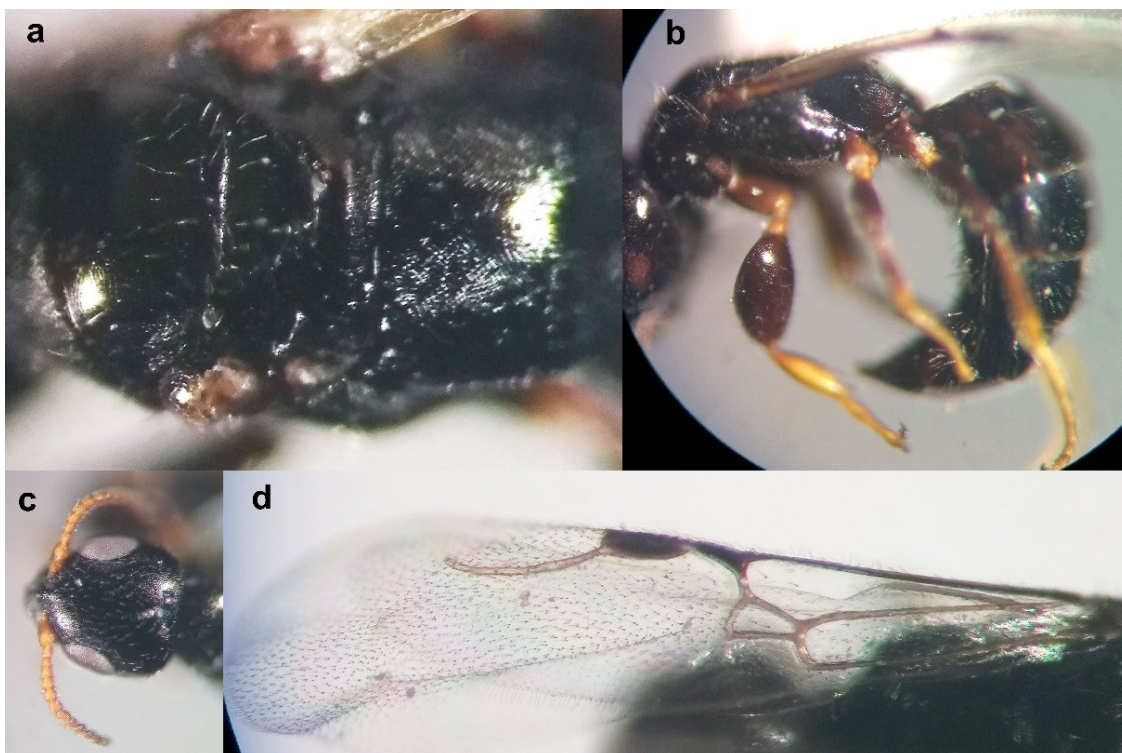


Figura 2.5 *Goniozus legneri*, hembra recolectada en la provincia de Mendoza. a. Tórax vista dorsal. b. Vista lateral. c. Cabeza vista dorsal. d. Ala anterior vista dorsal.

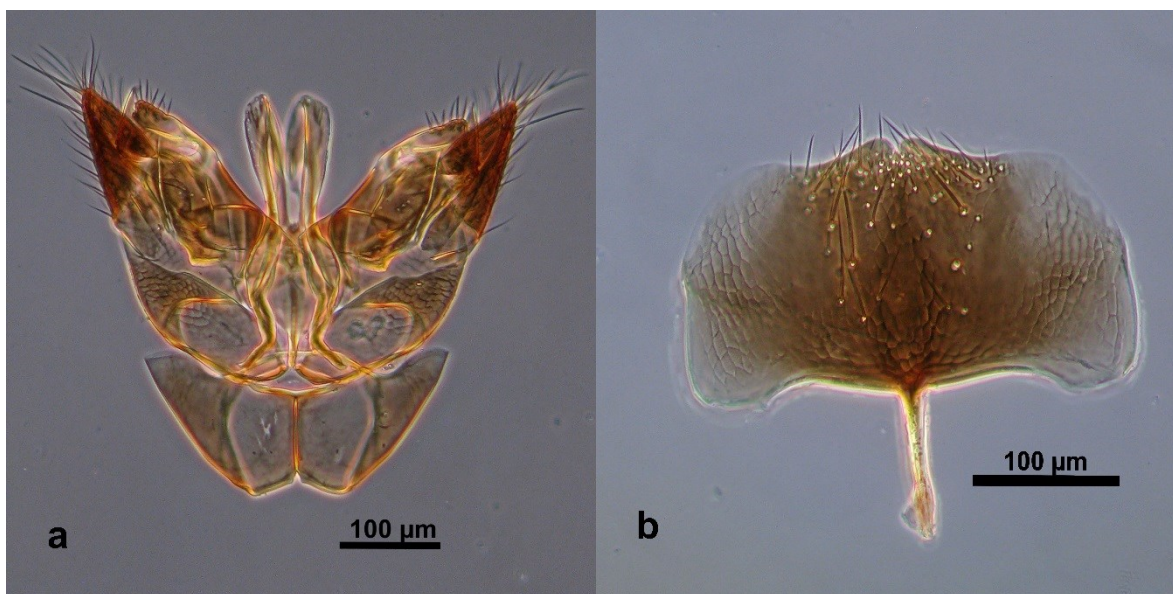


Figura 2.6 *Goniozus legneri*. Genitalia (a) e hipopigio (b) del macho.

Los cruzamientos entre los individuos provenientes de la cría en laboratorio y las poblaciones silvestres halladas en las localidades de Lunlunta, Barrancas, La Colonia y Drummond resultaron en la obtención de una F2 con progenies mixtas (hembras y machos),

con uno o dos machos por grupo. Se obtuvo una proporción sexual en favor de las hembras de la F2 en las cruzas hembras de la cría x machos silvestres de 0,86 (n=5), 0,83 (n=5) y 0,83 (n=2) para las localidades de Lunlunta, Mayor Drummond y Barrancas respectivamente. No se pudieron recuperar datos de La Colonia por realizarse este muestreo con anterioridad. Sin embargo, en estas muestras se pudo constatar en la descendencia a ambos sexos. La proporción sexual de la F2 en las cruzas hembras silvestres x machos de la cría fueron de 0,89 (n=5) y 0,84 (n=5) para Lunlunta y Mayor Drummond respectivamente. Los cruzamientos de Barrancas y La Colonia produjeron descendencia de ambos sexos, pero por el mismo problema comentado más arriba, no pudo estimarse la proporción de sexos.

2.4 Discusión

El estudio anatómico y morfológico confirmó la presencia de *G. legneri* parasitando larvas de tres especies de hospederos, en las tres especies vegetales consideradas en este estudio, en la provincia de Mendoza (Garrido et al., 2005; Gordh, 1982). Esto sumado a la obtención de una descendencia con presencia de hembras en la F2 corrobora la identificación a nivel de especie de los parasitoides muestreados y la interfertilidad entre las poblaciones silvestres y de laboratorio.

El parasitoide *G. legneri* fue hallado atacando a *E. ceratoniae* en nogales y espinillos y a *C. pomonella* en nogales. Asimismo, en Chile se reportó a *G. legneri* parasitando a *E. ceratoniae* y *C. pomonella* en nogales (Zaviezo et al., 2007), y aún con más anterioridad se halló en nogales y aromos atacando a *E. ceratoniae* (Legner & Silveira-Guido, 1983). En cultivos de nogal de Mendoza fue encontrado atacando a principalmente a *E. ceratoniae*, aunque también se encontró atacando a este pirálido en espinillo (*V. caven*) una especie muy próxima al aroma, siendo en esta última especie la primera vez que se registra. *Vachellia caven* es una especie que crece comúnmente en Mendoza y de bajo requerimiento hídrico, por lo que podría ser una especie arbórea empleada como planta refugio de este parasitoide en cultivos donde la polilla del algarrobo no sea una plaga.

En cuanto su presencia sobre *L. botrana*, *G. legneri* ha sido encontrado actuando sobre poblaciones de la plaga en Chile (Gerding et al., 2014), por lo que se considera la primera vez que se registra esta asociación en viñedos de Argentina. El parasitoide se registró entre los meses de enero y marzo, momentos que coinciden con la segunda y tercera generación de la polilla de la vid. Cuando hay presencia de bayas formadas las larvas del hospedero

se encuentran dentro de galerías, siendo el hábito natural en *Goniozus* spp. la búsqueda de hospederos en lugares cerrados o crípticos (Conlong et al., 1988; Gordh et al., 1983).

El **control biológico por nueva asociación** se define como la estrategia donde para el control de una especie plaga nativa (o no) es utilizado un agente de control biológico exótico y no asociado previamente a la plaga, que es capaz de atacar a esta especie con la que no ha co-evolucionado (Hokkanen & Pimentel, 1989). Asimismo, los parasitoides nativos en regiones invadidas por plagas exóticas pueden ser considerados en programas de control biológico y también conformar nuevas asociaciones, en un sentido distinto al del uso más común del término. Estas nuevas asociaciones pueden ser más exitosas en lograr un buen control, con una probabilidad de éxito superior respecto a viejas asociaciones, aparentemente debido a la falta de un balance interespecífico producto de la co-evolución (Hokkanen & Pimentel, 1984). Las características biológicas de ectoparasitoides gregarios pueden hacerlos muy apropiados para utilizarlos como agentes de control biológico en nuevas asociaciones (Wang et al., 2021). Este puede ser el caso de *G. legneri* que por ser un parasitoide generalista de lepidópteros se ha adaptado y se encuentra atacando a *L. botrana* en viñedos mendocinos.

Las características ecológicas son probablemente las limitantes para el rango de hospederos en parasitoides idiobiontes, aunque *G. legneri* ha sido encontrado en un amplio rango de hospedantes y regiones geográficas (Ehteshami et al., 2010; Garrido et al., 2005; Gordh, 1982; Gothilf & Mazor, 1987; Shoeb et al., 2005; Zaviezo et al., 2007). En los últimos años, y en particular en este estudio, se amplía el área de distribución geográfica de *G. legneri* en la zona oeste de la República Argentina incluyendo las provincias de Río Negro, Catamarca y Mendoza. En esta última provincia se halló atacando a los lepidópteros relevados en el oasis Norte y probablemente también se encuentre en el resto de los oasis cultivados de la provincia. Se constata la plasticidad de *G. legneri*, se encontró en diversos hospederos, cultivos y sitios del oasis Norte e indicios de su presencia en el oasis Centro por haberse encontrado cocones vacíos. Las características climáticas difieren en ambos oasis, tanto en el régimen de temperaturas, humedad y altitud.

Además, características como la habilidad de dispersión y el grado de especialización de los parasitoides son determinantes para adaptarse a los nuevos rangos de distribución de los hospederos, siendo los efectos climáticos causantes de fallas en el control por parte de parasitoides especialistas (Jefferies & Lewis, 2013). Parasitoides generalistas cuentan con una ventaja adaptativa ya que pueden seguir mejor a sus hospederos y superar los parches

donde no se encuentran porque pueden explotar hospederos alternativos en los mismos (Jeffs & Lewis, 2013) como bien ha demostrado *G. legneri* al encontrarse en ambientes donde no hay cultivos cercanos. Los parasitoides nativos pueden tener una buena respuesta de adaptación a los nuevos hospederos, con una mayor predominancia de parasitoides generalistas en el ensamble (Jeffs & Lewis, 2013; Wang et al., 2021).

Por otra parte *G. legneri* fue hallado principalmente en nogales donde no se aplican o hay baja presión de insecticidas (tabla 2.4). Asimismo, en los viñedos muestreados se utilizaron insecticidas específicos aptos para un manejo integrado de plagas, aunque no han sido ensayados en su efecto sobre el parasitoide en particular. La mayor presencia de *G. legneri* puede estar principalmente influenciada por el manejo de insecticidas, habiéndose detectado en estudios anteriores una elevada toxicidad a los mismos sean de los grupos químicos organoclorados, organofosforados, spinosinas y piretroides (Ferrero et al., 2000; Garrido, 2010). El otro factor de importancia que puede incidir en la permanencia de las poblaciones del parasitoide es la hibernación en nueces o frutos remanentes durante el invierno, ya que estos contienen larvas de la plaga que sirven como alimento y refugio para *G. legneri* y a su vez se encuentran protegidos de las condiciones climáticas adversas reinantes (Legner & Gordh, 1992). En los cultivos convencionales por lo general no se encuentran nueces remanentes, se retiran del lugar los frutos dañados a lo largo de la temporada y sobre todo durante la cosecha, lo que reduciría las poblaciones del parasitoide o su permanencia en los cultivos.

La demostración de que el parasitoide *G. legneri* se encuentra atacando de forma natural a *L. botrana* en viñedos mendocinos es un resultado alentador para desarrollar técnicas de control biológico aumentativo ya que la especie ha logrado colonizar y adaptarse a utilizar a este nuevo recurso alimenticio, la plaga exótica. A su vez, se han mostrado buenos resultados en la utilización como agente de biocontrol para otras plagas con hábitos barrenadores (Garrido et al., 2019; Gothilf & Mazor, 1987; Legner & Gordh, 1992), por lo que es considerado para su estudio como candidato en liberaciones aumentativas para el control de *L. botrana* y otros lepidópteros plaga presentes en Mendoza. Para ello, es necesario profundizar los conocimientos sobre la biología de la interacción *L. botrana*-*G. legneri* y que demuestren la efectividad del parasitoide como complemento a otras medidas de control, aspectos tratados en los Capítulos siguientes.

Capítulo 3. Biología y parámetros poblacionales de *Goniozus legneri* criado sobre *Lobesia botrana*

3.1 Introducción

Históricamente, los artrópodos agentes de control biológicos (ACB) han sido seleccionados basados en su especificidad sobre la plaga objetivo, favoreciendo especies de parasitoides por sobre depredadores (van Lenteren, 2012). Sin embargo, cuando se trata de plagas invasoras, estas pueden no tener enemigos naturales específicos en la nueva región, o sus enemigos naturales no ejercen un control suficiente. Así, Hawkins & Cornell (2004) postulan que para seleccionar ACBs exitosos para el control de plagas invasoras, se deben seleccionar aquellos que puedan cambiar de presas/hospederos más fácilmente. Los himenópteros parasitoides idiobiontes que matan o paralizan de forma permanente a los hospederos generalmente exhiben un mayor rango de especies hospedantes, lo que asegura su persistencia en el ambiente (Jeffs & Lewis, 2013; Wang et al., 2021)

El ectoparasitoide himenóptero *G. legneri* es considerado como una especie generalista ya que ataca decenas de especies de Lepidoptera. Este parasitoide es gregario siendo capaz de colocar camadas que varían de 1 a 35 huevos por larva hospedera (Marcucci B. observación personal). El tamaño de las camadas de *Goniozus* spp. y de *G. legneri* en particular, depende en gran parte del tamaño del hospedero sobre el cual se alimentan, lo que a su vez, se relaciona con la especie hospedera (Gordh et al., 1983; Hardy et al., 1992; Laumann, 1998; Lee, 1992; Mayhew & Hardy, 1998).

La mayoría de las especies de ectoparasitoides gregarios no permanecen con su progenie luego de la oviposición. Sin embargo distinto es el caso de muchos Bethyilidae que exhiben comportamientos de cuidado parental (Doutt, 1973), comportamiento reportado hace más de 100 años en la familia (Bridwell, 1920). El cuidado parental fue catalogado como un comportamiento sub-social en *Sclerodermus domesticus* Klug, describiendo que algunas larvas de la progenie eran atendidas y otras comidas por la madre cuando el hospedante comenzaba a secarse, además de no observarse interferencia entre conspecíficos que convivían sobre un mismo hospedante (Casale, 1991). Por otra parte, el cuidado parental de otras especies de betílidos se ha demostrado que contribuye a la supervivencia por disminuir la mortalidad ocasionada por conspecíficos, el multiparasitismo y el hiperparasitismo. Tal es el caso de *Goniozus nephantides* (Muesebeck), donde la presencia de la madre junto a su progenie incrementó la supervivencia de la misma cuando los conespecíficos estaban presentes (Hardy & Blackburn, 1991). *Goniozus legneri* muestra un marcado comportamiento de cuidado parental, permaneciendo con su progenie hasta que esta se desprende de la larva parasitada (Bentley et al., 2009). Este comportamiento es

una adaptación que previene que conoespecíficos e incluso otras especies ataquen los huevos y larva y dejen sus propios huevos (Bentley et al., 2009; Wang et al., 2014).

Otro aspecto de la biología de este parasitoide es su índice de ovigenia (IO). Este índice mide la distribución de la producción de huevos a lo largo de la vida de una hembra de un parasitoide (Jervis et al., 2008) y se calcula dividiendo la carga inicial de huevos (oocitos maduros al momento que la avispa hembra alcanza el estado adulto) por la fecundidad potencial de toda la vida (el número total de huevos que forma, ya sean ovipuestos o no). El IO puede variar entre 0 y 1. En el primer caso, la hembra al momento de alcanzar el estado adulto no tiene huevos maduros, es decir, no puede oviponer y estas especies se denominan extremadamente sinovigénicas. En el otro extremo, un $IO = 1$ indica que la hembra nace con el complemento de huevos maduros y está lista para oviponer; a estas especies se las denominan extremadamente pro-ovigénicas. La sinovigenia suele relacionarse a otro hábito que tienen los parasitoides, que es el “host-feeding” (Jervis & Kidd, 1986), que se define como la alimentación que realiza el parasitoide sobre los fluidos de su hospedero, pudiendo o no colocar sus huevos en este. En el caso de *G. legneri*, una especie que practica host-feeding, se ha encontrado que las hembras recientemente emergidas no son capaces de colocar huevos porque no poseen oocitos maduros cuando eclosionan ($IO=0$), siendo estrictamente sinovigénicas (Gordh et al., 1983). Esto se ve reflejado en periodos preoviposición más prolongados. Otras características a tener en cuenta cuando se analiza la biología de los parasitoides es la forma de la curva de fecundidad realizada, que se construye con el número de posturas diarias a lo largo de toda la vida del parasitoide, mostrando los parasitoides sinovigénicos un retraso en el inicio de la oviposición y un número de posturas diaria bajo a lo largo de su vida (Jervis et al., 2008).

Goniozus legneri ha sido evaluado con éxito en diferentes plagas en frutales de pepita y carozo con hábitos minadores o barrenadores protegidas en lugares cerrados (Garrido, 2010; Garrido et al., 2019; Gordh et al., 1983; Laumann et al., 2000b; Legner & Gordh, 1992). Como se vio en el apartado anterior *G. legneri* se ha encontrado atacando larvas de *L. botrana* en Chile (Gerding et al., 2014) y en Mendoza pero poco se sabe sobre su efectividad de control. Un primer paso para evaluar el desempeño de un ACB es la elaboración de tablas de vida. En el caso de los parasitoides, se estiman los principales parámetros poblacionales al atacar el fitófago de interés (Bellows et al., 1992). Este enfoque provee información útil para seleccionar ACB para suprimir plagas ya que permite conocer la mortalidad que inflige como así también las tasas reproductivas del enemigo a expensas

de un hospedador determinado. Además, los parámetros estimados son de utilidad para compararlos entre varios candidatos de ACBs y tomar decisiones sobre la efectividad del control. Hay dos tipos básicos de la construcción de tablas de vida: horizontales y verticales (Gotelli, 2008). Las tablas de vida horizontales se construyen siguiendo una cohorte de individuos a lo largo de su vida. Las tablas de vida verticales se obtienen realizando sucesivos muestreos en una población que se presume en equilibrio en donde al mismo tiempo conviven distintos estadios o edades, para luego realizar una estimación con las muestras tomadas. La obtención de la tasa reproductiva neta (R_0 , descendencia promedio de un individuo durante su vida) e intrínseca (r_m , tasa de aumento per cápita) permiten evaluar el crecimiento de una población: cuando éstas son positivas ($R_0 > 1$ y $r_m > 0$), indican que la población aumentará. Para el caso de parasitoides el seguimiento de inmaduros en una tabla horizontal es realizado en un momento diferente al de adultos, pudiéndose distinguir tablas de supervivencia de inmaduros y tablas de fertilidad respectivamente. Se han elaborado tablas de vida horizontales para *G. legneri* en diversos hospederos como son *C. pomonella*, *A. transitella*, *P. gossypiella* y *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) (Ehteshami et al., 2012; Gordh et al., 1983; Laumann et al., 2000b) mostrando un buen potencial reproductivo. Se obtuvieron R_0 entre 91-160 hembras por hembra, y las tasas r_m variaron entre 0,145 a 0,205.

En este Capítulo se abordó el estudio del potencial reproductivo de *G. legneri* cuando parasita a *L. botrana* en el laboratorio por medio de tablas de vida y determinar así los parámetros biológicos. Dado que, entre los requisitos de un buen agente de ACBs, se considera que su producción masiva debe ser económicamente viable, es necesario evaluar las condiciones óptimas para su reproducción. El potencial reproductivo de una especie de parasitoide que exhiben cuidados parentales puede ser menor. Por lo tanto, para *G. legneri* se evaluó teniendo en cuenta dos condiciones de cría de la descendencia: - la condición natural, donde se permitió el cuidado parental (CP), y – una condición artificial, por medio de la oviposición continua (OC) mediante una oferta continua de hospederos a la hembra.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Hospedero y parasitoide

Hembras adultas de *G. legneri* provenientes del Centro de Multiplicación de Biocontroladores (CEMUBIO), Río Negro, Argentina, fueron usadas en los bioensayos. Los

parasitoides fueron criados sobre larvas de cuarto y quinto estadio de la polilla de la cera, *G. mellonella*, a 25 °C, fotoperiodo 24:0 (L:O). Fueron utilizadas hembras provenientes de distintas camadas para contemplar la posible variabilidad genética y, con presencia de machos para asegurar la cópula.

Las larvas de polilla de la vid provinieron de la cría artificial establecida desde el 2011 en la EEA Mendoza-INTA, Mendoza, material con el cual se realizaron los diferentes ensayos presentados en esta tesis. Esta población fue inicialmente colectada en la temporada 2010-2011 de un viñedo en Cruz de Piedra, departamento de Maipú en la provincia de Mendoza. Nuevos materiales de diferentes regiones de Mendoza fueron incorporados a las poblaciones de laboratorio cada año para refrescar las colonias y evitar efectos negativos de cruzamientos endogámicos. Para la cría artificial de *L. botrana* en laboratorio se sigue el procedimiento descrito por Herrera et al. (2016) con algunas modificaciones que disminuyen considerablemente los tiempos dedicados al mantenimiento de la misma. Las condiciones en el bioterio fueron de 22-25 °C, 30-40% H.R. y un fotoperíodo de 16:8 (Luz: Oscuridad); con un efecto atardecer conseguido mediante luz solar indirecta que entra por una ventana (0.4 m de alto x 0.7 m de largo) cuando las luces del bioterio se encuentran apagadas (a las 14:00 horas).

Adultos: Los adultos de la polilla que son obtenidos en una proporción de aproximadamente 1:1 de machos y hembras. Son colocados dentro de una cámara de copulación y postura que es una botella plástica (PEP) de 2000-3000 ml con un agujero en el centro donde es colocado algodón embebido en una solución de agua y ácido ascórbico. Las botellas son cambiadas tres veces por semana para retirar los huevos. El pasaje de los adultos de la botella “vieja” a la “nueva” se hace mediante una luz colocada en el extremo de la botella “nueva” y cubriendo la botella “vieja”.

Huevos: Los huevos adheridos a la botella son limpiados con agua corriente, detergente y posterior enjuagado, retirando de esta forma suciedad como heces y escamas de los adultos. Una vez secos son colocados (aprox. 300 huevos) en dieta artificial (Tabla 3.1) dentro de recipientes cerrados de 345 x 212 x 74 mm (3.600 ml) tipo “taper”.

Larvas: Los huevos eclosionan dentro del recipiente con la dieta y las larvas se alimentan allí hasta pasar al estado de pupa lo que demora alrededor de 15 días (Fig. 3.1).

Pupa: Los recipientes con la dieta y pupas son abiertos y reemplazada la tapa con tela voile para permitir el secado de la misma. Una vez seca la dieta es retirada del recipiente con una espátula y colocada en botellas con una abertura en el fondo donde se coloca tela voile

y en el otro extremo es colocado un tubo de ensayo de 16 mm Ø x 150 mm de largo. La botella se cubre permitiendo que los adultos se separen por diferencia de luminosidad pudiendo capturarlos en el tubo de ensayo colocado en el otro extremo más iluminado. Los tubos con adultos son reemplazados diariamente y colocados en las botellas de cópula y postura.

Tabla 3.1 Ingredientes de la dieta artificial
(cantidad en g)

Agua	500,00
Levadura de cerveza	32,50
Harina de maíz	32,50
Germen de trigo	31,00
Agar	10,00
Ácido ascórbico	3,20
Metil hidroxí benzoato	1,00
Ácido benzoico	1,00
Estreptomicina	0,65
Aceite de maíz	2,00



Figura 3.1 Larvas de quinto estadio de *Lobesia botrana* sobre sustrato artificial. Nótese la diversidad de coloraciones.

Se utilizó la dieta artificial descrita en Herrera et al. 2016 con algunas modificaciones (Tabla 3.1). Para la preparación se disuelve el agar en el agua fría y coloca en mechero hasta ebullición. Se deja enfriar por dos minutos para luego agregar el resto de los ingredientes previamente pesados que son incorporados con batidora eléctrica. La dieta es colocada en caliente en los recipientes formando una capa fina de unos 3-4 mm. Una vez fría se traza un reticulado con un elemento puntiagudo formando rombos de 4 cm de lado aprox. y se guardan a 5 °C por hasta 15 días.

3.2.2 Supervivencia y tiempos de desarrollo de estados pre-imaginales

Se colocó una cohorte de 50 hembras naïve (sin experiencia previa) de *G. legneri* de 24-48 h de edad, previamente copuladas individualmente en contenedores cilíndricos herméticos de 2,5 cm diámetro x 2,0 cm de alto junto a una larva de *L. botrana* del quinto estadio (L5). Las hembras fueron alimentadas con una solución hecha en una base peso/peso de: levadura de cerveza 25% y miel 25% y agua 50%. A las 24 h se evaluó si hubo parasitismo observando la presencia de huevos en las larvas paralizadas. Como *G. legneri* realiza cuidado parental, las larvas parasitadas se mantuvieron junto a cada avispa madre hasta que su progenie comenzó a tejer el cocón. El ensayo se realizó en condiciones ambientales controladas (fotoperiodo 14:10 L:O, 25 °C +/-1 °C 30-40% HR). Las larvas parasitadas se observaron diariamente contabilizando el número de individuos por camada, cuantos se encontraban vivos, muertos o ausentes y el estado en que se encontraban: huevo, larva, prepupa y pupa. El estado prepupal fue definido como el periodo en que la larva se encontraba inmóvil y había ya excretado el meconio y fue considerado concluido cuando los esbozos de los ojos aparecían (fácilmente reconocibles por su color rojizo) y la apariencia general cambiaba.

Con los datos obtenidos se calcularon para cada estado de *G. legneri* los tiempos de desarrollo, tasas y curvas de supervivencia sobre L5 de *L. botrana*. Asimismo, se realizaron observaciones comportamentales en el momento del ataque y horas posteriores, anotando las actividades que las hembras adultas realizaban.

3.2.3 Parámetros poblacionales

Para iniciar estos ensayos, se seleccionaron unas 60 hembras de *G. legneri* recientemente eclosionadas, siguiendo el mismo criterio de elección de individuos de distintas camadas, y

se mantuvieron por 24 h con machos para asegurar la fecundación. Posteriormente se colocaron individualmente en contenedores cilíndricos de igual tamaño a los ya descritos, junto a una L5 de *L. botrana*. Se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales que los ensayos anteriores. Para estimar los parámetros poblacionales, se distribuyeron las hembras en dos tratamientos, teniendo en cuenta el comportamiento de atención parental: 1) cuidado parental (CP) (n=25), reemplazando una L5 una vez que la descendencia del parasitoide comenzaba a tejer el cocón (cada cuatro días), y 2) oviposición continua (OC) (n=29) en donde una nueva L5 de *L. botrana* fue ofrecida después de que un evento de oviposición ocurría. Se realizaron observaciones entre las 9:00 y las 12:00 para registrar el número de huevos colocados por hembra. En ambos tratamientos, las hembras fueron alimentadas durante todo el ensayo con la solución de levadura y miel descrita para el punto 3.2.2. Todas las larvas parasitadas se mantuvieron en las mismas condiciones de cría para obtener los individuos adultos, que fueron contados y sexados. Con los datos obtenidos se calculó número medio de huevos puesto por día, longevidad, número de hospederos parasitados por hembra, progenie realizada (número promedio de adultos obtenidos por hembra), periodos de pre-oviposición (PPO) e inter-oviposición (PIO). Las proporciones sexuales se calcularon sobre los adultos obtenidos, denominándose en este caso secundarias, entendiéndose por primaria la proporción sexual medida al estado de huevo mediante técnicas moleculares (Khidr et al., 2013). La proporción sexual secundaria (PSS) fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{PSS} = n^{\circ} \text{ hembras} / n^{\circ} \text{ hembras} + n^{\circ} \text{ machos}.$$

El PPO fue definido como el tiempo transcurrido entre la emergencia de la hembra y la primera oviposición y el PIO como el tiempo transcurrido entre dos eventos de oviposición. En base a los datos obtenidos se elaboraron tablas de vida y fertilidad para ambos tratamientos. Se utilizaron los datos de tiempo de desarrollo y supervivencia de inmaduros calculados en el punto anterior para elaborar las tablas de vida horizontal. Se calcularon los siguientes parámetros poblacionales para ambos tratamientos:

- fecundidad bruta (M_x) = $\sum_{x=0}^w \frac{Ex}{N_x}$;
- fecundidad neta (m_x) = $M_x \cdot \text{proporción sexual}$;
- tasa de reproducción neta (R_0) = $\sum_x l_x \cdot m_x$;
- tiempo medio de la generación (T) = $\frac{\sum_{x=0}^w x \cdot l_x \cdot m_x}{R_0}$;
- tasa intrínseca de incremento (r_m) = $\sum_{x=0}^w e^{r_m x} l_x \cdot m_x = 1$ (Ecuación de Euler – Lotka);

- tiempo doble (DT) $= \frac{\log(2)}{r_m}$;
- tasa finita de incremento (λ) $= e^{r_m}$

Donde E_x = es la descendencia a una edad x , N_x = número de hembras vivas en la edad x y l_x = Supervivencia a la edad x

Análisis estadístico

Los valores de longevidad y PPO se analizaron estadísticamente mediante una prueba de Wilcoxon para muestras independientes. Otros valores obtenidos como el número de huevos colocados por hembra, la progenie realizada, el tamaño de camada o el número promedio de huevos por hospedero y el número de hospederos parasitados por hembra se analizaron estadísticamente mediante una prueba de t de Student para muestras independientes. Los parámetros demográficos obtenidos en las tablas de vida se analizaron mediante el método de remuestreo Jack-knife y comparados entre tratamientos mediante prueba de t Student, luego de probada la normalidad por test de Shapiro-Wilks. Los análisis fueron realizados con el software Infostat ver 2020 (Di Rienzo et al., 2011).

3.3 Resultados

3.3.1 Observaciones del comportamiento de oviposición de *G. legneri* sobre *L. botrana*

Goniozus legneri tuvo una aceptación del 100 % de las larvas L5 de *L. botrana* ofrecidas. Las larvas fueron atacadas por hembras naïve de 24-48 hs de edad en los primeros 5 minutos de ofrecidas. En el comportamiento de ataque se observó que el parasitoide se dirigía hacia la zona posterior de la larva sujetándose de la misma con sus patas anteriores e insertando su aguijón; luego caminaba por sobre ella hasta el extremo anterior para atacarla sujetándose con las mandíbulas por encima de la cabeza e inyectando el veneno en la zona ventral, cerca de la gula. Este comportamiento también se observó, pero atacando únicamente desde el extremo anterior de la larva. Una vez finalizado el ataque la avispa procedía a limpiarse la hemolinfa que impregnaba su cuerpo, siendo este acto el primer host-feeding. En el transcurso de horas se podía observar que el parasitoide sujetaba a su hospedero por encima de la cabeza y lo arrastraba contra los bordes del recipiente. Al cabo de un día se podían denotar zonas y heridas necróticas (Fig. 3.2.a) en el tegumento

de la larva donde la avispa adulta se habría alimentado, muchas veces también evidenciado por la presencia de deyecciones de color azul (Fig. 3.2.c), el mismo que posee la hemolinfa de la larva de *L. botrana*. El comportamiento de host-feeding en L5 de *L. botrana* fue concurrente. Los huevos fueron colocados agrupados en posición dorsal principalmente en la zona media. Las larvas del parasitoide tomaban el color del sustrato sobre el cual se alimentaban (Fig. 3.2.b). Se pudo apreciar comportamiento de cuidado por parte de la madre, rondando en los alrededores sin alejarse de su progenie (Fig. 3.2.d).

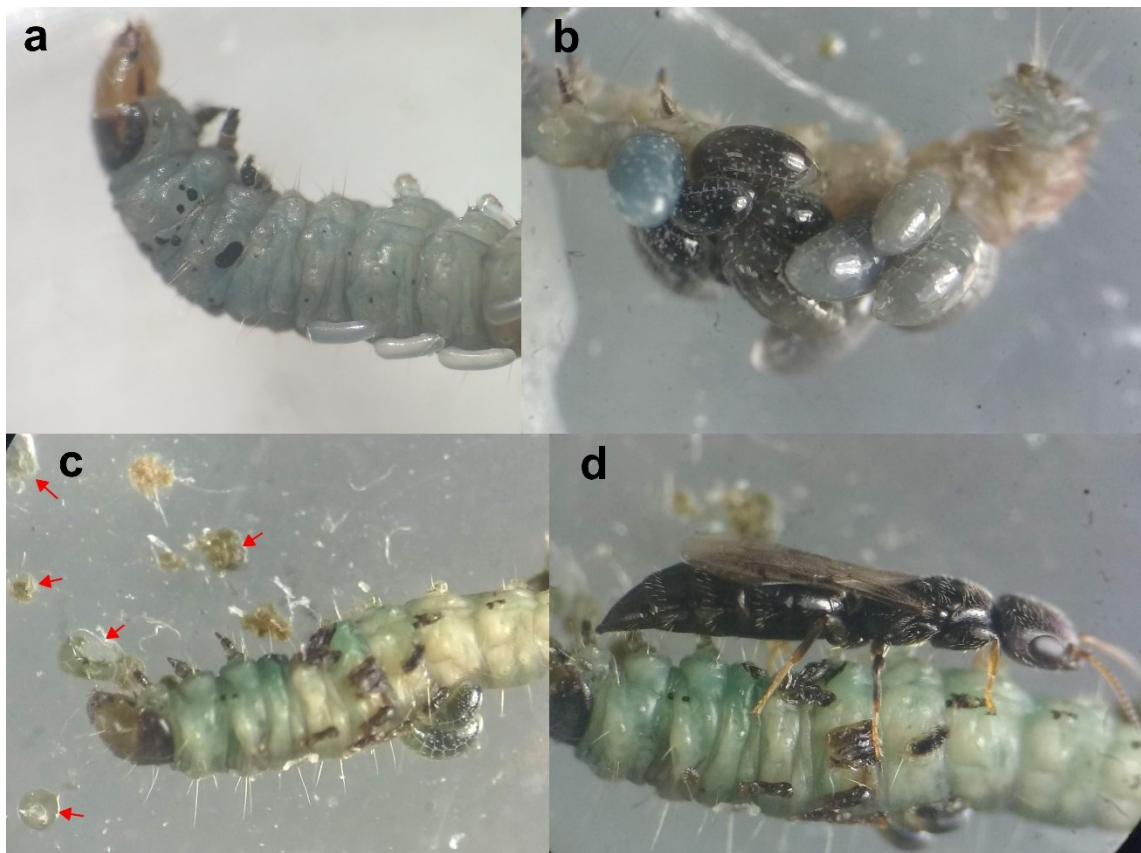


Figura 3.2 *Goniozus legneri* sobre larvas de *Lobesia botrana* **a.** Manchas necróticas provocadas por la alimentación del parasitoide adulto, junto a algunos huevos opalescentes himenopteriformes (oviposición concurrente). **b.** Grupo de 13 larvas del tercer estadio próximas desprenderse de su hospedante. **c.** larva de *L. botrana* parasitada junto a algunas deyecciones (flechas rojas) del parasitoide adulto. **d.** Hembra adulta sobre larva de *L. botrana* junto a su progenie en comportamiento de cuidado parental, a pesar de que su descendencia se encuentra muerta en mayor parte.

3.3.2 Supervivencia y tiempos de desarrollo de estados pre-imaginales

Se obtuvo una cohorte de 456 huevos del parasitoide distribuidos entre 50 larvas de *L. botrana*. El tamaño de la camada fue de unos $9,1 \pm 3,2$ huevos por larva. El tiempo de

desarrollo a 25 °C de huevo a adulto de *G. legneri* fue de ca. 15 días. Los tiempos de duración de cada estado son los que se muestran en la Tabla 3.2.

La supervivencia de huevo a adulto del parasitoide sobre larvas de *L. botrana* provenientes de la cría fue de 25,2% (Tabla 3.3) mostrando una curva de supervivencia generalizada tipo III (Fig. 3.3), con mayor mortalidad en los primeros estados. La mayor mortalidad se registró en el estado larval que alcanzó un valor del 67,9%.

Tabla 3.2 Tiempos de desarrollo de distintos estados de *Goniozus legneri* cuando parasita larvas de quinto estadio de *Lobesia botrana*.

	Estado				
	Huevo (n=434)	Larva (n=140)	Prepupa (n=122)	Pupa (n=115)	Tiempo total a adulto
Valor medio en días (±DE)	1,14 (±0,35)	4,56 (±0,67)	1,75 (±0,63)	7,50 (±0,92)	14,95 (±2,57)

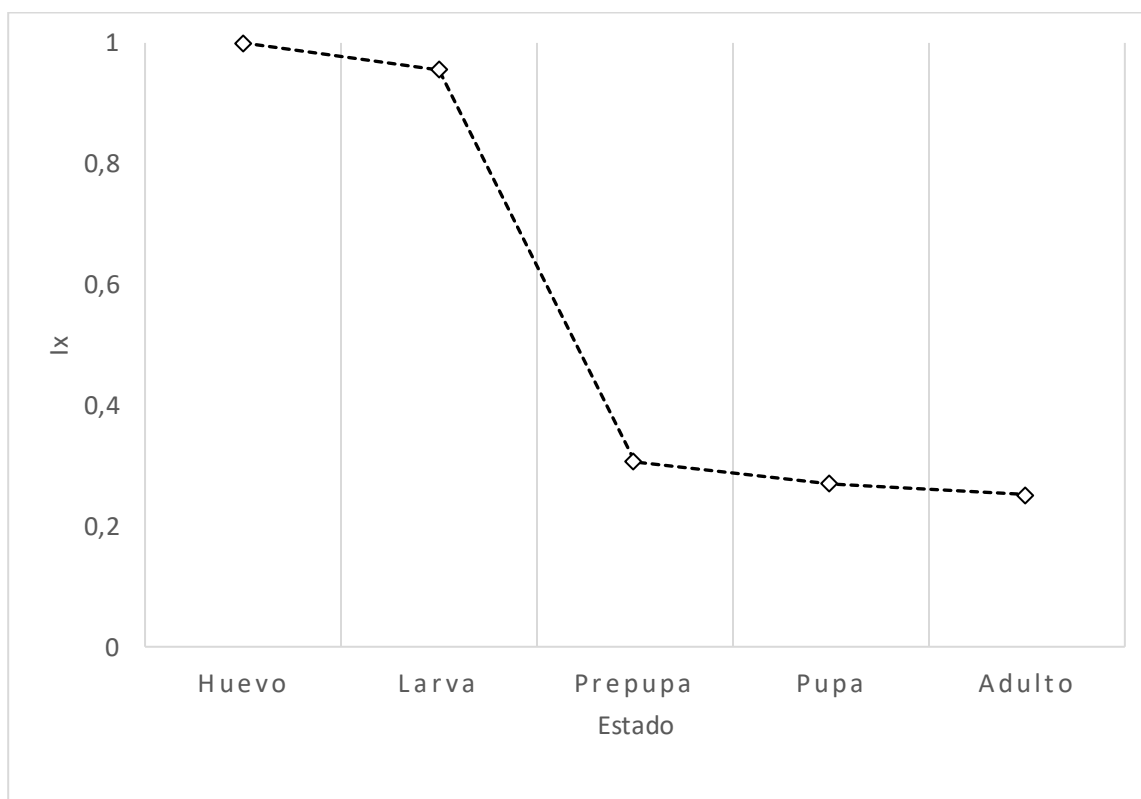


Figura 3.3 Curva de supervivencia generalizada de *Goniozus legneri* criado sobre larvas de quinto estadio de *L. botrana* provenientes de cría artificial. lx= proporción de individuos vivos.

Tabla 3.3 Tabla de supervivencia de *Goniozus legneri* sobre larvas de *Lobesia botrana* de quinto estadio obtenidas en la cría sobre dieta artificial.

Estado (x)	Nx	lx	px	qx	dx
Huevo	456	1,0000	0,9561	0,0439	0,0439
Larva	436	0,9561	0,3211	0,6789	0,6491
Prepupa	140	0,3070	0,8786	0,1214	0,0373
Pupa	123	0,2697	0,9350	0,0650	0,0175
Adulto	115	0,2522			

Ref.: Nx: número de individuos en el estado x. lx: proporción de individuos vivos en el estado x. px: proporción de individuos vivos en el estado x respecto al estado siguiente (x+1). qx: proporción de individuos muertos en el estado x respecto al estado siguiente (x+1). dx: proporción de individuos muertos en el estado x

3.3.3 Parámetros poblacionales

Los principales parámetros reproductivos obtenidos se computan en la Tabla 3.4. La longevidad fue más alta en CP respecto a OC, con un valor máximo en CP que alcanzó los 124 días. Algunas hembras con más de 90 días de edad, no eran capaces de paralizar completamente a sus hospederos, por consiguientes estos se podían retorcer causando el desprendimiento de los huevos y la consecuente muerte de los mismos.

Tabla 3.4 Parámetros reproductivos de *Goniozus legneri* cuando parasita a *Lobesia botrana* con dos tratamientos con diferentes tiempos de descanso entre hospederos sucesivos. Entre () se indica el error estándar

Parámetro	Oviposición Continua (OC)	Cuidado Parental (CP)	Valor p
Longevidad (días)	53,14 (±3,2)	77,9 (±6,7)	p=0,0064
Proporción sexual	0,60	0,52	
Huevos depositados	146,59 (±7,7)	91,48 (±9,3)	p<0,0001
Progenie realizada	47,93 (±3,3)	28,32 (±3,2)	p<0,0001
Hospederos parasitados/hembra	39,00 (±1,8)	12,52 (±1,1)	p<0,0001
PPO ^a (días)	3,07 (±0,15)	3,00 (±0,19)	p=0,6209
PIO ^b (días)	1,27 (±0,2)	5,00 (±0,0)	
Tamaño de camada (huevos/larva)	7,30 (±0,26)	3,76 (±0,1)	p<0,0001

OC: el hospedero es renovado cada vez que la oviposición es observada. CP: el hospedero es renovado cuando la progenie comienza a tejer el cocón. ^aPeriodo pre-oviposición. ^bPeriodo inter-oviposición.

La longevidad fue superior a CP 77,9 ($\pm 34,2$) días ($W=844$ $p=0,0064$) respecto a la OC cuyo valor fue de 53,14 ($\pm 17,2$). El promedio de huevos colocados por hembra también fue significativamente diferente ($T=-4.6$ $p<0,0001$) con valores a OC de 146,59 ($\pm 41,61$) y a CP de 91,48 ($\pm 46,45$). En el tratamiento a OC se obtuvo una descendencia de 47,93 ($\pm 17,87$) por hembra del parasitoide, parasitando unas 39 ($\pm 9,9$) larvas de *L. botrana*. Para CP nacieron en promedio 23,87 ($\pm 17,89$) por hembra del parasitoide parasitando unas 12,52 ($\pm 5,58$) larvas de *L. botrana*. El PPO fue de 3,07 ($\pm 0,8$) y 3,00 ($\pm 0,95$) días y para OC y CP respectivamente no mostrando diferencias significativas ($W=660$ $p=0.6209$). Mientras el PIO fue de 1,27 ($\pm 0,2$) y 5 días OC y CP respectivamente. Cuando las larvas fueron ofrecidas en el tratamiento CP la demora registrada en oviponer fue de un día. Se registró un mayor promedio de posturas para CP con 7.3 huevos/larva respecto OC que alcanzó los 3.76 huevos/larva ($T'=11.84$ $p<0.0001$). El promedio de posturas diarias fue de 2,1 ($\pm 1,1$) huevos para OC y 1,13 ($\pm 1,12$) huevos para CP, con rangos de 0-10 huevos y 0-18 huevos por camada respectivamente. Las curvas de fecundidad realizada por edad (Fig. 3.4) muestran una variación notoria en su forma: una mayor cantidad de posturas diarias promedio cuando larvas son ofrecida continuamente (OC) y para tener luego una rápida caída en las posturas diarias; a diferencia de cuando se ofrecían larvas cada cuatro días (CP) en dónde el número de posturas diarias fue más bajo, pero relativamente estable a lo largo del tiempo.

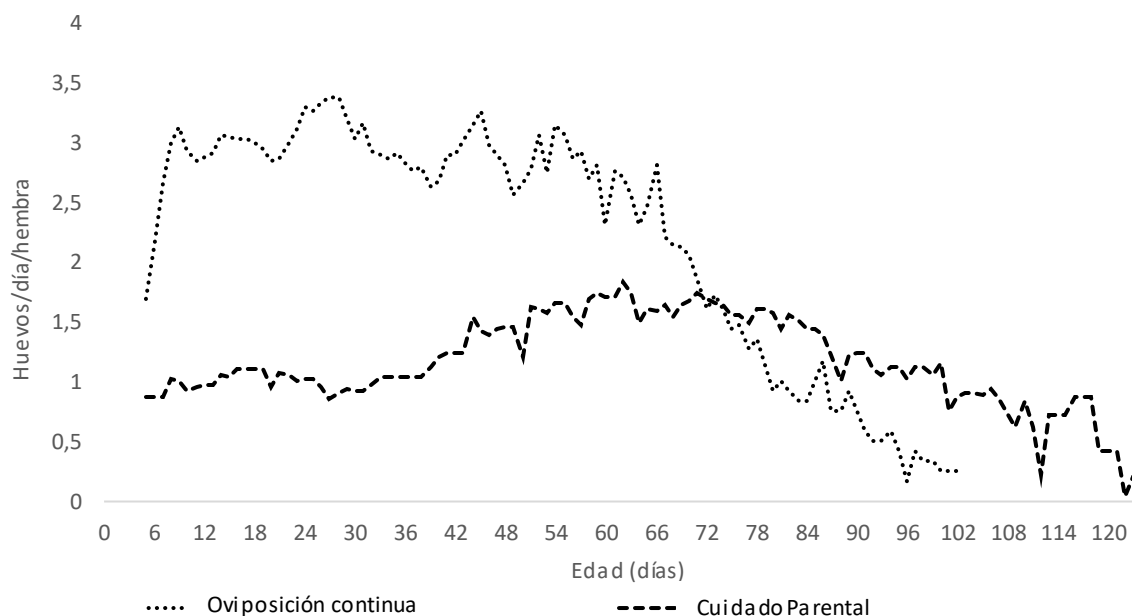


Figura 3.4 Curva de fecundidad realizada por edad (seis días media móvil). OC: tratamiento siembra constante (línea punteada), el hospedero es renovado cada vez que la oviposición es

observada. CP: tratamiento cocón visible (línea discontinua), el hospedero es renovado cuando la progenie comienza a tejer el cocón.

Los parámetros obtenidos a partir de tablas de vida se muestran en la Tabla 3.5. Los tratamientos mostraron diferencias significativas para todos los parámetros calculados. En el caso de la tasa intrínseca de incremento (r_m) en el tratamiento OC fue de casi el doble a aquellos obtenidos para CP, con valores de 0,089 y 0,053 respectivamente.

3.4 Discusión

El comportamiento observado durante el ataque de hembras de *G. legneri* cuando parasita a *L. botrana* es similar al reportado por otros autores para diversas especies de hospederos (Gordh et al., 1983; Laumann et al., 2000b). Sin embargo, en este estudio se observó un comportamiento de “arrastre” del hospedero hacia lugares más protegidos (bordes del recipiente) mediante la sujeción con las mandíbulas que no había sido reportado antes para la especie aunque sí para otros Bethyidae como es el caso de *Parascleroderma berlandi*, *Holepyris hawaiiensis*, *Laelius trogodermatis*, *L. anthrenivorus* y *Bethylus* spp., mientras que en *Epyris eriogoni* se ha citado inclusive comportamiento de carga de hospederos en el dorso y al lado del parasitoide (Evans, 1964; Rubink & Evans, 1979).

Tabla 3.5 Parámetros de *Goniozus legneri* sobre diferentes hospederos a 25 °C obtenidos de tablas de vida horizontal.

Hospedero	R_0	T (días)	DT (días)	λ	r_m	Ref.
<i>Lobesia botrana</i> (OC)	22,33 a	44,28 a	7,80 a	1,093 a	0,089 a	Este trabajo
<i>Lobesia botrana</i> (CP)	12,8 b	63,83 b	12,98 b	1,055 b	0,053 b	Este trabajo
<i>Cydia pomonella</i>	115,24	47,03	-	1,16	0,145	(Laumann et al., 2000b)
<i>Pectinophora gossypiella</i>	160,2	51,5	-	-	0,157	(Gordh et al., 1983)
<i>Amyelois transitella</i>	145,1	37,1	-	-	0,162	(Gordh et al., 1983)
<i>Ephesia kuehniella</i>	91	22	-	1,227	0,205	(Ehteshami et al., 2012)

R_0 : tasa reproductiva neta. T: tiempo medio generacional. DT: tiempo de duplicación. λ : tasa finita de incremento. r_m : tasa intrínseca de incremento. OC: Tratamiento oviposición continua, el hospedero es renovado cada vez que la oviposición es observada. CP: tratamiento cuidado parental, el hospedero es renovado cuando la progenie comienza a tejer el cocón. Letras distintas indican diferencias significativas en la misma columna ($p < 0,0001$, prueba de T)

Una comparación de los parámetros de *G. legneri* sobre diferentes hospederos, estimados en condiciones similares a este estudio dan cuenta algunas variaciones (Tabla 3.5). El tiempo de desarrollo de huevo a adulto de *G. legneri* (Tabla 3.2) es similar a los obtenidos sobre otros hospederos a la misma temperatura demorando alrededor de 15 días sobre *L. botrana*, 16,1 días sobre *C. pomonella*, 14,0-15,6 días sobre *P. gossypiella*, 14,3 días sobre *A. transitella* (Butler & Schmidt, 1985; Gordh et al., 1983; Laumann et al., 2000b). Esto podría indicar que la especie de hospedero y/o su calidad poseen poca influencia en los tiempos de desarrollo. Los acotados tiempos de 4-5 días de desarrollo larval pueden responder a una salida rápida de estado más vulnerable del parasitoide. En cambio, en los estados de pre-pupa y pupa con tiempos más prolongados de alrededor de 9 días, los individuos se encuentran resguardados por un capullo.

El PPO es similar a aquellos obtenidos en otros hospederos tales como *A. transitella* (3,12 días), *P. gossypiella* (4,05 días) y *C. pomonella* (4,01 días) (Gordh et al., 1983; Laumann et al., 2000b). Este periodo de pre-oviposición se debe a que el parasitoide no nace con oocitos maduros por ser sinovigénico (Jervis et al., 2008) y deben transcurrir unos días desde su emergencia hasta que finalmente puede colocar huevos. El PIO para el tratamiento de CP coincide con el observado en Bentley et al. (2009), es decir unos cuatro días para que la hembra deje a su hospedero y busque uno nuevo, un día más para oviponer, teniendo un total de 5 días de PIO. Cuando larvas de *L. botrana* son constantemente ofrecidas (OC) el PIO toma valores de alrededor de un día, muy diferentes a aquellos reportados para *C. pomonella* (3,91 días), pero similares a aquellos hallados en otros hospederos con aún mayor masa corporal como son *A. transitella*, *P. gossypiella*, *Corcyra cephalonica* (Stainton) (Lepidoptera: Pyralidae) (Hardy et al., 2000).

La longevidad es menor en las hembras a OC, esto puede ser debido al desgaste de parasitar una mayor cantidad de hospederos sin reposo como sugieren Butler & Schmidt (1985). En cambio, Gordh y colaboradores (1983) obtuvieron longevidades superiores de unos 97 y 96 días sobre *A. transitella* y *P. gossypiella* cuando se les dejaba a las hembras descansar un día entre parasitaciones. Butler & Schmidt (1985) obtuvieron longevidades muy inferiores con unos 32 días sobre *P. gossypiella*, se atribuyen esta baja longevidad a la falta de “descanso” entre posturas. Por otra parte, sobre *C. pomonella* los valores fueron muy similares (61,2 días) a los obtenidos en este trabajo. *Cydia pomonella* un hospedante de una mayor calidad que *L. botrana* para *G. legneri* por tener una mayor supervivencia (85%) y un mayor r_m (0,145). A pesar de que el comportamiento de cuidado parental ha sido

reportado para este parasitoide (Gordh et al., 1983), el tiempo dedicado a este no ha sido tenido en cuenta cuando se han elaborado tablas de vida previamente, probablemente sobreestimando el potencial reproductivo de *G. legneri*. Este periodo de cuidado parental (CP) permitió, como se menciona más arriba, un reposo entre parasitaciones lo que tuvo un efecto positivo sobre la longevidad incrementándola unos 25 días en promedio respecto al tratamiento OC.

Los parasitoides exhiben cuatro tipos de curva de fecundidad realizada por edad de acuerdo a su IO. Obteniéndose curvas tipo 1 y 2 en especies pro-ovigénicas y, 3 y 4 en especies sinovigénicas (Jervis et al., 2008). En curvas tipo 3, después de un periodo de pre-oviposición corto, las posturas se incrementan y luego disminuyen rápidamente. Curvas tipo 4 exhiben un mayor periodo de pre-oviposición y una tasa de posturas diarias más estable y extendida. *Goniozus legneri* es extremadamente sinovigénico, sin oocitos maduros al emerger (IO =0) (Gordh et al., 1983). La curva de fecundidad realizada por edad para el tratamiento OC y CP corresponden a una tipo 3 y 4 respectivamente (Fig. 3.4). Si características naturales son consideradas, como el cuidado parental, la forma de la curva de fecundidad realizada puede cambiar, resultando en que algunos ensayos de laboratorio oculten la verdadera forma de las curvas. Sin embargo, las fecundidades observadas son altas para estos tipos de curva (91-146 huevos por hembra). Esto puede ser debido al hecho de que *G. legneri* es un parasitoide gregario y longevo (60-90 días) (Gordh et al., 1983; Laumann, 1998).

Las PSS halladas son similares para ambos tratamientos (0,52-0,60) y bajas en relación a otros hospedantes. Las proporciones sexuales obtenidas sobre otros hospedantes resultan ser basadas en hembras con valores superiores a 0.80 (hembras/machos+hembras) (Laumann et al., 2000b; Legner & Warkentin, 1988). Hardy y colaboradores (2000) sugieren cinco hipótesis para la mayor presencia de machos en las camadas de *G. legneri*: (i) control de la elección del sexo imperfecto; (ii) mortalidad en el desarrollo de los machos; (iii) la capacidad de inseminación de los machos es limitada; (iv) más de una madre contribuye en la descendencia en el grupo de apareamiento local; (v) hay algo de apareamiento no-local. Según los autores la hipótesis (v) explicaría la presencia de más machos que podrían copular hembras receptivas de otras camadas. Sin embargo, Griffiths & Godfray (1988) también consideran a la hipótesis (ii) como causante de mayor cantidad de machos en las camadas. Asimismo, los resultados obtenidos en *L. botrana* también podrían sustentar la hipótesis (ii) ya que la mortalidad durante el desarrollo sobre *L. botrana* es elevada (74.8%

de huevo a adulto) y la proporción de machos se acerca a una relación de 1:1 respecto a las hembras. Debido a esta mayor mortalidad más machos deben ser asignados para asegurar la cópula de las hembras sobrevivientes. Por otra parte hay estudios que indican que más hembras de los parasitoides son colocadas en hospederos de mejor calidad (Charnov et al., 1981; Waage & Ng, 1984). Es por esto que la alta proporción de machos puede indicar que *L. botrana* es un hospedero de menor calidad para *G. legneri*.

Por otra parte, mayoría de camadas provenientes de hembras de más de 90 días de edad no desarrollaban hasta el estado adulto, por lo que no fue posible verificar el agotamiento de las reservas de esperma como es reportado para esta especie en *A. transitella* y *P. gossypiella* (Gordh et al., 1983). Excepto en un único caso donde solo camadas de machos fueron obtenidas del día 75 en adelante. En edades más tempranas, hembras fueron obtenidas en todas las camadas.

El número de larvas parasitadas fue mayor cuando larvas de *L. botrana* fueron constantemente ofrecidas (39 larvas), siendo mayores que los valores obtenidos en otros hospederos que van en un rango de 6,1 a 25,05 larvas parasitadas por hembra a 25 °C. Pero este valor se redujo a casi un cuarto cuando a la hembra se le permitió permanecer con su progenie hasta el final del periodo de cuidado parental.

La tasa de reproductiva neta, que nos indica cuantas hembras son obtenidas por cada hembra, resultan con valores muy por debajo a las obtenidas sobre otros hospedantes a la misma temperatura (25 °C) (ver tabla 3.5). Asimismo, el valor obtenido para CP es la mitad que el obtenido en OC tanto en cuanto a R_0 y r_m . Los tiempos generacionales y de duplicación también resultaron significativamente menores en el tratamiento CP. El bajo valor de r_m (0.09-0.05) indicaría que *G. legneri* no es un buen candidato por sí solo para un control biológico inoculativo, ya que el valor de esta tasa es superior para *L. botrana* (0.137) (Herrera et al., 2017).

Asimismo hay competencia intraespecífica en esta especie (Bentley et al., 2009; Goubault et al., 2006) y una reducción en el número de descendencia por hembra se detectó cuando la presencia de éstas por hospedero era mayor a uno (Legner & Warkentin, 1988). Por ejemplo, en *Goniozus nephantidis* (Muesebeck), la interferencia producida reduce el desempeño de este (Sreenivas & Hardy, 2016) y algo similar podría estar ocurriendo con *G. legneri* que exhibe asimismo comportamientos de cuidado parental. La interferencia entre conespecíficos podría finalmente reducir la descendencia y eficiencia por lo que habría que prestar especial cuidado en las dosis de liberación de este tipo de ACB.

A pesar de haberse obtenido bajos valores en los parámetros reproductivos, estos resultados no descartarían a *G. legneri* para ser empleado en liberaciones aumentativas/inundativas. En este enfoque de control biológico son más relevantes características como la habilidad de matar a su presa/hospedero, capacidad de hallar a su hospedero, producción en masa eficiente y económica, potencial de mercado y capacidad de sobrevivir en otros hospederos alternativos (van Lenteren et al., 2020). Es posible que esta alimentación sobre su hospedero sea además no concurrente, actuando como un depredador de estados de la plaga que no sean adecuados para oviponer (El-Basha & Mandour, 2006), lo que sería una característica ventajosa para la utilización en un control biológico inundativo.

En los Capítulos siguientes se abordarán otros aspectos relevantes para un ACB.

**Capítulo 4. Forrajeo del hospedero:
Pistas olfativas utilizadas y preferencia
por distintos hospedantes**



4.1 Introducción

El éxito de programas de control biológico depende de la eficiencia de los parasitoides en el forrajeo de las plagas. Si un parasitoide no es capaz de hallar a la plaga objetivo cuando éste se encuentra en una planta determinada su eficiencia en ese sistema será nula. Los parasitoides, al igual que otros animales, utilizan señales químicas (Wajnberg & Colazza, 2013), sonidos/vibraciones (Meyhöfer & Casas, 1999), características físicas y visuales (Benelli & Canale, 2012; Segura et al., 2007) para encontrar a sus hospederos. Deben localizar el hábitat, la potencial comunidad de hospederos, localizar el hospedero, reconocerlo y por último aceptarlo (Vinson, 1976). En un entorno repleto de diferentes compuestos orgánicos volátiles los parasitoides deben poder discernir y detectar aquellos relacionados con sus hospederos en un estado adecuado para ser parasitados. La ciencia que estudia las relaciones entre los distintos organismos y comunidades de un ecosistema mediadas por compuestos químicos es la *ecología química*. Los compuestos que transmiten las señales de comunicación son denominados *semioquímicos* encontrándose diferentes tipos de acuerdo a si son emanadas entre individuos de la misma especie (feromonas) o entre distintas especies (aleloquímicos) y cuales organismos son beneficiados o perjudicados (Fig. 4.1).

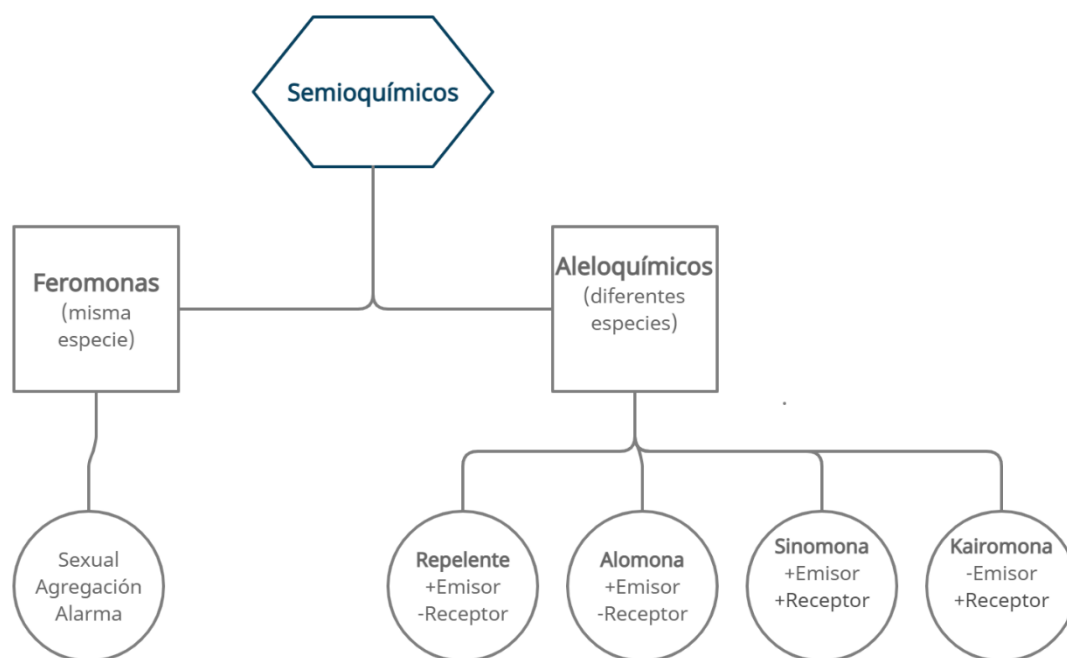


Figura 4.1 Clasificación de los semioquímicos (elaboración propia)

De particular interés para este trabajo de tesis es el rol que pueden cumplir las kairomonas emitidas por el hospedante o las sinomonas emitidas por la planta atacada por el fitófago, ya que pueden ser explotadas por el parasitoide a fin de localizar su hospedero (Murali-Baskaran et al., 2018; Wajnberg & Colazza, 2013). Estas últimas se conocen como volátiles inducidos por herbívoros (VIH) producidas por plantas infestadas o atacadas por un herbívoro. Los VIHs intervienen en una interacción tritrófica integrada por la planta, el herbívoro (consumidor primario) y el parasitoide (consumidor secundario) (Gullan & Cranston, 2010; Price et al., 2011; Wajnberg & Colazza, 2013). La utilización de los VIHs es el resultado de la co-evolución, dando lugar a especializaciones por parte de los parasitoides para detectar estas señales indirectas que las plantas emiten al interactuar con un fitófago (Murali-Baskaran et al., 2018; Wajnberg & Colazza, 2013).

Tanto los parasitoides generalistas como los especialistas, utilizan pistas químicas innatas o de nacimiento para localizar a sus hospederos. Sin embargo, los comportamientos de aprendizaje son más comunes en los de hábito más generalista (Steidle & Van Loon, 2003). En consecuencia, para este tipo de parasitoides, con un rango de hospederos más amplio, si se desea utilizar como agente de control biológico y se desarrollan, crían o prefieren alguna especie de hospedero que no sea la plaga blanco, pueden ser menos eficaces en controlarla (Men et al., 2019; Van Driesche et al., 2008). Otro aspecto interesante a considerar es que los parasitoides tienen preferencias innatas por algunas especies de hospederos sobre otras (Segura et al., 2016).

En el caso de los betílidos, estos son capaces de encontrar a sus hospederos escondidos en galerías, muchas veces excavadas muy profundas en los tejidos vegetales. Se ha determinado en varios trabajos que utilizan compuestos químicos volátiles producidos directa e indirectamente por sus potenciales hospederos (Aspin et al., 2021; Chiu-Alvarado et al., 2009; López-Rodríguez et al., 2009; Smith et al., 2006). Los volátiles producidos directamente por el hospedero son aquellos que emana la misma larva susceptible de ser parasitada y aquellos indirectos pueden ser producto de su alimentación como son los VIHs, estadios del herbívoro diferentes al susceptible de ser parasitado, huellas presentes en los tejidos, etc. (Wajnberg & Colazza, 2013).

Estos volátiles pueden ser más específicos de la interacción con una especie vegetal determinada o no. Se ha encontrado que *G. legneri* responde de manera innata a los restos de alimentación producidos por larvas de la polilla del algarrobo *E. ceratoniae* (Lepidoptera:

Pyrallidae) en frutos de granada y que prefiere a este hospedero por sobre su hospedero artificial *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Aleosfoor et al., 2014).

Una metodología clásica para determinar cuáles son los hospedantes más elegidos o preferidos por un parasitoide, cuando varios de ellos están presentes, es mediante las pruebas de preferencia en un arena grande que respeta el comportamiento natural del enemigo natural (Van Driesche & Murray, 2004). Estas pruebas permiten dilucidar si el organismo benéfico buscará al hospedero blanco y con ello, evaluar su potencial para el control de la plaga. Por ejemplo, la preferencia en viñedos europeos del parasitoide *C. capitator* (Hymenoptera: Ichneumonidae) ha sido evaluada respecto a las principales especies plagas (tróxicos) de la vid, *L. botrana* y *Eupoecilia ambiguella* (Moreau et al., 2019). Los resultados obtenidos en laboratorio se correspondieron con lo ocurrido en campo, donde mayores tasas de parasitismo fueron observadas sobre *L. botrana*. Asimismo, se ha evaluado la preferencia de *G. legneri* entre diferentes estadios larvales de *C. pomonella* pero no entre distintas especies (Laumann et al., 2000a)

Como se estableció en el Cap. 2 de esta Tesis, *G. legneri* fue encontrada asociada a una nueva plaga, *L. botrana* en la provincia de Mendoza y es capaz de localizar a las larvas del hospedador dentro de las galerías en las bayas. Dado que *G. legneri* tiene un rango de hospedadores de 17 especies, y que varias de ellas se encuentran presentes naturalmente en la región de estudio (Cap. 2), en este Capítulo se buscó evaluar la preferencia innata de *G. legneri* por dos de estas especies de hospedantes que han sido citadas en la bibliografía como hospedadores naturales, *C. pomonella* y *L. botrana*, y una especie “artificial”, pero que tiene potencial para ser utilizado para la cría masiva, como es *P. interpunctella*. Además, se propuso determinar si existe algún efecto sobre la descendencia de *G. legneri* debido a características diferenciales entre especies de hospederos (por ej., distinto tamaño corporal de las larvas). Finalmente, interesó investigar fuentes de estímulos olfativos que puede emplear la hembra de *G. legneri* para localizar al hospedero *L. botrana* en distintas etapas fenológicas del cultivo de vid, donde la plaga está presente: floración, bayas verdes, envero/maduración.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Material empleado

Parasitoides: Las hembras adultas utilizadas de *G. legneri* provinieron del Centro de Multiplicación de Biocontroladores (CEMUBIO), Río Negro. Las mismas fueron obtenidas sobre larvas de cuarto y quinto estadio de *Galleria mellonella* a 25 °C, L:O (24:0).

Hospederos: Se utilizaron tres especies de hospederos: *L. botrana* (LB), *C. pomonella* (Cp) y *P. interpunctella* (PI). Las larvas de LB provinieron de la cría establecida en la EEA Mendoza-INTA, Mendoza. Estas son alimentadas con una dieta artificial compuesta por: agua, harina de maíz, levadura desactivada, germen de trigo, agar, aceite de maíz, ácido ascórbico, ácido benzoico, hidroximetil benzoato, carbendazim y sulfato de estreptomicina (ver Cap. 3). Son mantenidas a 22-24 C°, con un fotoperiodo 16: 8 (L:O) y una HR de 20-30%. Las larvas Cp fueron obtenidas de una cría establecida la EEA Gral. Roca, Río Negro, en dieta artificial y mantenidas a 26 C°, con un fotoperiodo L:O 16: 8. Las larvas de PI provinieron de una cría en la EEA Mendoza- INTA, Mendoza. El pie de cría se obtuvo en el año 2018 a partir de marcos apícolas con restos de cera de un establecimiento ubicado en Los Corralitos, Guaymallén, Mendoza. Esta especie fue elegida por lo sencillo de su cría (Cap. 2) y por poseer un tamaño similar a LB. Para su cría se formaron grupos de 10 adultos aproximadamente, con una proporción de sexos de 0,5 los que fueron colocados en un vaso transparente descartable (500 ml) con tapa y provistos con 50 g de polen seco. Las tapas tenían un orificio (1,5 cm diámetro) cubierto con tela voile para permitir la aireación. Los vasos fueron colocados bajo las mismas condiciones ambientales con las que se cría *L. botrana*. A los 30-40 días las larvas de último estadio comienzan a pupar. El ciclo completo transcurre en el mismo vaso sin agregar alimento adicional. Los adultos emergen al cabo de unos 50 días aprox. y son nuevamente recolectados para colocarlos en un vaso con alimento nuevo.

4.2.2 Ensayo de doble elección de hembras de *G. legneri* frente a distintas especies de hospederos

Para evaluar la preferencia por diferentes especies de hospedero por parte de hembras adultas de *G. legneri*, se realizaron ensayos de doble elección con larvas de las tres especies de lepidópteros, con las combinaciones posibles de a pares: Cp/LB, LB/PI y PI/Cp. Se utilizaron larvas del quinto estadio, las que se colocaron de una por microtubo eppendorf

(2 ml) con un trozo de 1 cm² de papel absorbente para evitar la condensación de humedad. Al tubo se le realizó una perforación circular en el centro de la tapa (1 mm) para permitir la entrada del parasitoide (Fig. 4.2.a), de modo de simular el comportamiento de búsqueda y oviposición de las hembras de *G. legneri* que buscan en sitios estrechos como grietas y orificios (Gordh et al., 1983). Las larvas se pesaron inicialmente (n=30 por especie) el día anterior a realizar el ensayo con una precisión de décima de miligramo (0,1 mg) para determinar las diferencias en la masa corporal de los hospedantes empleados en los ensayos, y luego se mantuvieron dentro de los tubos por 24 h en heladera (8-10 °C). Como arena experimental se emplearon cajas Petri plásticas de 14 cm de diámetro a las cuales se le removieron con una cuchilla los tabiques (que evitan la condensación) que posee la tapa para lograr un sellado lo más hermético posible y evitar el escape de la avispa parasitoide. Se colocaron dos tubos eppendorf por caja de Petri en simultáneo que contenían larvas de diferentes especies (una por tubo). Los tubos se dispusieron dentro de la arena cercanos a los bordes de la misma lo más distanciados posible (Fig. 4.2.b). Se utilizaron hembras de *G. legneri* naïve, copuladas, de 48-72 h de edad, previamente alimentadas con una solución compuesta por una parte de miel, una de levadura (desactivada) y dos de agua. Durante este tiempo fueron mantenidas con un macho para asegurar la fecundación, si esta no se había producido en el cocón.

Las hembras del parasitoide fueron colocadas en el medio de la arena experimental con un pincel fino embebido en la solución alimenticia. Cada hembra se utilizó una única vez y las posiciones de las larvas en la caja de Petri fueron alternándose, al igual que la orientación de la caja para evitar sesgo en este sentido. Los ensayos fueron realizados en el laboratorio, a partir de las 8 am, a una temperatura de 25 °C, bajo la luz de dos tubos led luz fría a 0,7 m altura. Se realizaron unas 50 repeticiones, de a grupos de a diez, en forma simultánea.

Se observó la elección y preferencia en ataque/paralización. La elección se definió como el ingreso al tubo correspondiente a alguna de las 2 especies de larvas hospederas ofrecidas, realizando la observación a las 4 h de iniciado el experimento. La preferencia de ataque/paralización se determinó cuando la hembra permaneció sin cambiar posición por 24 h junto al huésped paralizado. El experimento tuvo una duración total de 28 h.

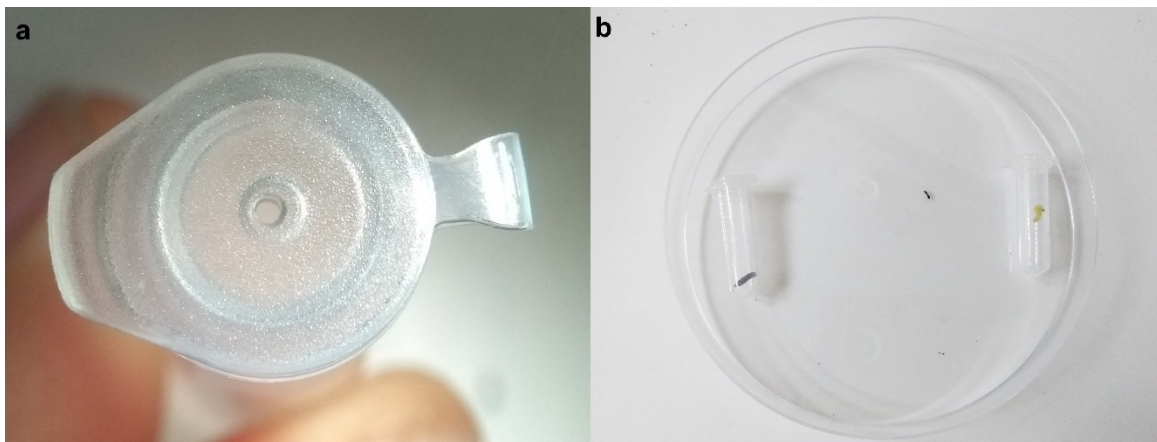


Figura 4.2 a. Tubo que contiene la larva hospedera con perforación para permitir el ingreso del parasitoide. **b.** Arena experimental en el ensayo de doble elección para evaluar la preferencia por la búsqueda y oviposición de *G. legneri* frente a larvas de *Lobesia botrana*, *Cydia pomonella* y *Plodia interpunctella*. Se pueden observar las cajas de Petri con los 2 tubos eppendorf conteniendo larvas de una de las dos especies de lepidópteros, ofrecidos a una hembra de *G. legneri*.

4.2.3 Tamaño corporal de la progenie de *G. legneri* según la especie del hospedero sobre la que se desarrollan

Para estimar posibles efectos sobre el tamaño de la descendencia de *G. legneri* criada sobre las especies hospederas LB y PI, se utilizaron hembras naïve copuladas de *G. legneri* de 48-72 h de edad, previamente alimentadas con la solución descrita anteriormente. Se colocaron individualmente en un contenedor cilíndrico hermético (2,5 cm diámetro x 2,0 cm alto) junto a una larva de quinto estadio de alguna de las dos especies de lepidóptero y se mantuvieron a 25 °C, L:O (14:10) hasta obtener la descendencia. Luego, se realizó un estudio morfométrico de los individuos de las progenes provenientes de estos hospederos y la del CEMUBIO, criadas sobre *G. mellonella*. Para ello, fueron sacrificados, colocándolos a -7 °C durante 1 minuto y luego en alcohol 70° para lograr una postura distendida del ejemplar muerto. Se midió el largo del tórax (mesosoma) y el largo del cuerpo, desde el ápice de la cabeza hasta el extremo abdominal (Fig.4.3), con una precisión de 0,1 µm en microscopio estereoscópico Stemi 2000-C ZEISS equipada con una cámara Axiocam ERc 5s ZEISS con un aumento de 16x y con la ayuda del software de procesamiento de imágenes ZEN 2.3.

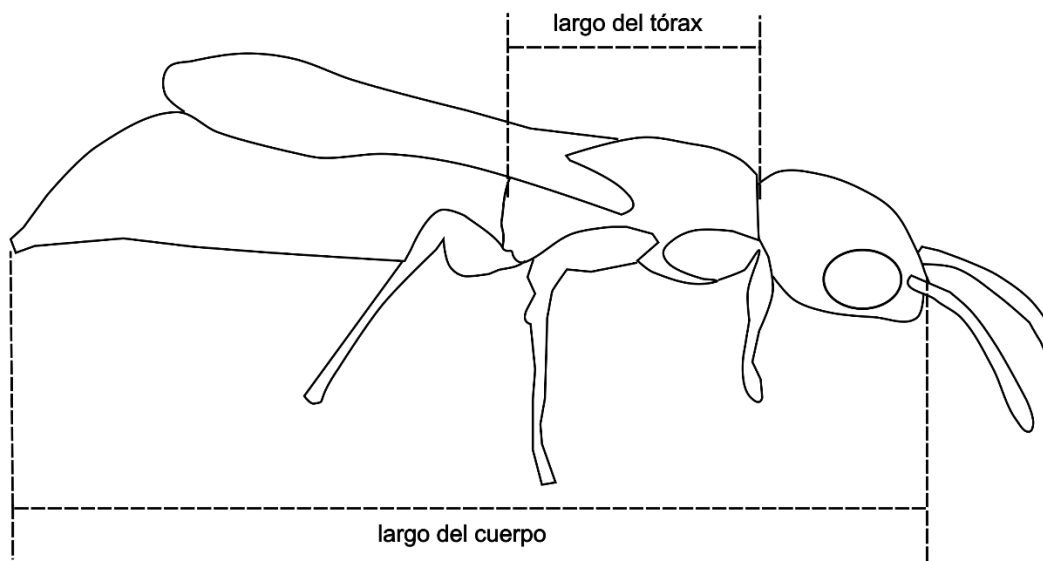


Figura 4.3 Mediciones realizadas para determinar el tamaño corporal de los ejemplares de *Goniozus legneri*.

4.2.4 Pistas olfativas utilizadas por *Goniozus legneri* en el forrajeo de la polilla de la vid *L. botrana* en interacción con racimos de vid (*Vitis vinifera* var. Malbec)

Para evaluar el comportamiento de orientación de avispas de *G. legneri* hacia señales olfativas emanadas por la plaga y la planta, se realizó un experimento donde se utilizó un olfatómetro en Y (Fig. 4.4) similar al descrito en Vander Meer et al. (1988).

El olfatómetro consta de una bomba impulsora de membrana conectada a un caudalímetro para regular el flujo de aire. El caudalímetro se conectó a un Erlenmeyer (500 ml) sellado con junta de goma con carbón activado en pellets en su interior. De allí pasa a otro Erlenmeyer similar donde se hace burbujear el aire filtrado en agua tridestilada. De esta forma se filtró y humedeció el aire previo a su ingreso a los receptáculos con las muestras. Los receptáculos para las muestras (fuentes de olor o estímulos) consistieron en cilindros de vidrio (2 L), donde se colocaron las distintas fuentes de olor. El tubo en Y de vidrio se conectó a los receptáculos de la muestra mediante una unión de teflón y las conexiones a los receptáculos de las muestras se ubicaron en forma simétrica para evitar diferencias de flujos en los brazos de la Y. Se utilizó un flujo de aire con un caudal de 0,2 L/min regulado mediante un caudalímetro. Aunque no se analizó el perfil de volátiles emitidos por las distintas fuentes de olor, pero a los fines del diseño del dispositivo se consideró que el parasitoide respondería a posibles compuestos orgánicos volátiles disueltos en el aire. Es

por ello por lo que en términos de respuesta se refiere a compuestos orgánicos volátiles emitidos por las distintas fuentes.

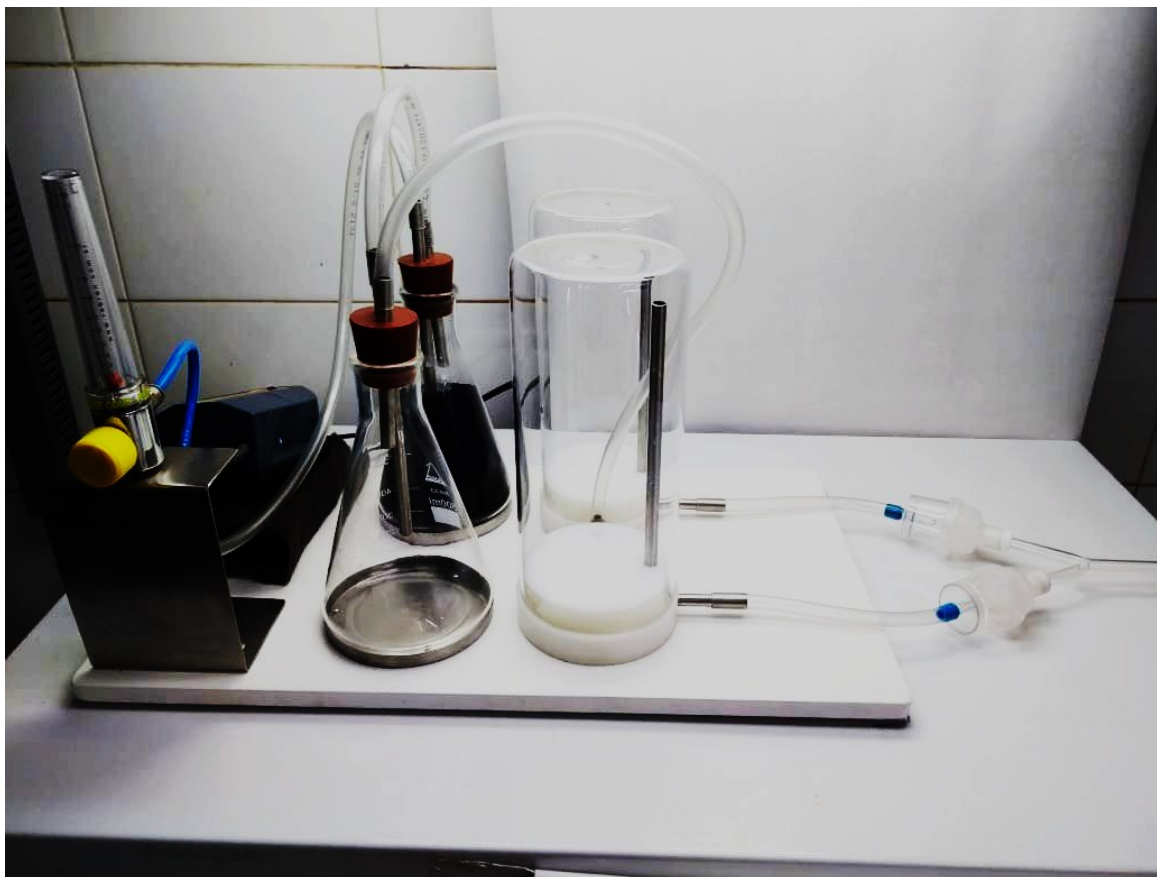


Figura 4.4 Olfatómetro en Y utilizado en los ensayos de forrajeo de *Goniozus legneri*

Se utilizaron hembras naïve de *G. legneri* de 72-96 h de emergidas, no alimentadas y copuladas. Para cada repetición en la medición se usó una hembra nueva. En uno de los brazos se colocó el estímulo mientras que el otro brazo circuló aire limpio. Se colocó una nueva muestra (estímulo) y lavó la Y con alcohol 96° después de cada repetición. Cada cuatro repeticiones, se cambió de posición el estímulo para evitar sesgos por la ubicación y se limpió el aparato completamente con etanol 96°. Las fuentes de estímulos fueron: 1) un racimo de vid en los estados de inflorescencia/bayas verdes/bayas en envero con la presencia de daño de *L. botrana*, seis larvas en el quinto estadio y sus heces (racimo entero); 2) seis larvas de *L. botrana* de quinto estadio solas que fueron alimentadas en racimos de cada estado fenológico considerado anteriormente (larvas); 3) heces de larva alimentadas en cada estado fenológico de la planta (heces); 4) racimos dañados por *L.*

botrana pero sin larvas solo con presencia de seda tejida por el hospedero en cada estado fenológico (racimo dañado). Los racimos sanos que se infestaron para obtener las distintas fuentes de estímulos fueron colectados en un viñedo conducido en espaldero var. Malbec ubicado en el predio de la EEA Mendoza, INTA en el distrito de Mayor Drummond, Luján de Cuyo, Mendoza. Se utilizaron racimos de esta variedad por ser la más representativa en superficie de Argentina. En el viñedo no se realizaron aplicaciones fitosanitarias de ningún tipo para permitir un desarrollo óptimo de la polilla de la vid. Los racimos fueron retirados de la planta y en el extremo proximal del raquis se colocó un eppendorf con agar para evitar deshidratación. Estos se introdujeron en envases (500 ml) cerrados con una tapa perforada con un orificio (1 cm) cubierto con tela voile para evitar la condensación y formación de hongos. Se colocaron en una cámara a 22-24 °C y 30% de humedad relativa en donde se infestaron con larvas de 4to y 5to estadio de LB provenientes de la cría en dieta artificial permaneciendo unos 3-4 días hasta ser utilizados. Este tiempo se determinó como suficiente para que se consumieran varias bayas y se generaran heces, condición visible en el fondo del recipiente. Se emplearon racimos de vid de tres momentos distintos de desarrollo: flor, baya verde y baya en envero (inicio maduración), coincidentes con las tres generaciones de *L. botrana* observadas en la región (ver Cap. 1).

La duración máxima de cada observación fue de 5 minutos. Se registró el tiempo de permanencia en cada brazo hasta que el parasitoide ingresó al receptáculo de captura o culminaban los 5 min., dando por concluida la prueba. Los comportamientos se registraron manualmente por observación visual directa con ayuda del programa EthoLog 2.2 (Ottoni, 2000) que permite establecer un tiempo de sesión (5 min.) y registrar los distintos tiempos de duración los eventos observados así como de eventos puntuales.

Análisis estadístico

Para determinar la especie preferida en el ensayo de doble elección se usó un test binomial a dos colas contra la hipótesis nula de una probabilidad de 0,5 en la elección de las especies presentadas utilizando el software RStudio ver. 1.1.43. La diferencia en el peso de las larvas de las tres especies de lepidópteros se analizó mediante prueba de Kruskal-Wallis y posterior comparación de a pares. El tamaño corporal de la progenie resultante de las tres especies elegidas se analizó mediante ANOVA y un test de Tukey con un alfa de 0,05, previo a probar la distribución normal de los datos mediante prueba de normalidad de Shapiro-Wilks utilizando el software Infostat 2020. Los tiempos de permanencia en los

brazos del olfatómetro se analizaron mediante un test de Wilcoxon para muestras apareadas con el programa Infostat 2020.

4.3 Resultados

4.3.1 Ensayo de doble elección de hembras de *G. legneri* frente a distintas especies de hospederos

El dispositivo elaborado (Fig. 4.2) mostró funcionar correctamente, pudiendo las hembras *G. legneri* ingresar por el orificio practicado en el tubo eppendorf y paralizar a su hospedero. De las pruebas de doble elección se pudo observar, en primer lugar, que una vez ingresadas al tubo, las hembras paralizaron, ovipusieron y permanecieron con su hospedero, independientemente de la especie, sin salir del mismo hasta que las larvas se desarrollaron. También se verificó el comportamiento de cuidado parental, característico de esta especie de parasitoide. Por este motivo, los eventos de elección y preferencia en ataque/paralización fueron coincidentes y concurrentes con la oviposición. Se presentan entonces únicamente los resultados en términos de elección.

Goniozus legneri mostró una marcada preferencia por PI por sobre los otros dos hospederos (Fig. 4.5): por sobre LB (n=35, p = 0,0005), con más del 80% de las hembras PI (Fig. 4.5.B) y por sobre Cp, un 86% de las hembras (n=37, p < 0.0001) (Fig. 4.5.C). *Goniozus legneri* no mostró preferencia por Cp o LB (n=29, p = 1) (Fig. 4.5.A).

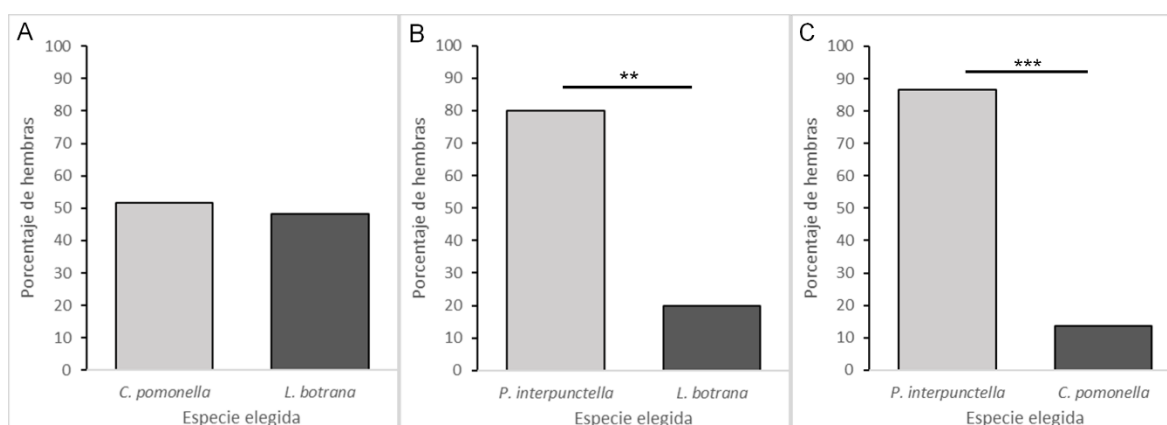


Figura 4.5 Prueba de preferencia de doble elección. Porcentajes de hembras de *G. legneri* que eligieron a los diferentes hospederos ofrecidos en una arena durante 4 horas. Hospederos ofrecidos: **A.** *Cydia pomonella* y *Lobesia botrana*. **B.** *Plodia interpunctella* y *Lobesia botrana*. **C.** *Plodia interpunctella* y *Cydia pomonella*. Asteriscos indican diferencias significativas: **p < 0,01, *** p < 0,001

Asimismo, el peso de las larvas ofrecidas (Tabla 4.1) no difirió significativamente entre LB y PI, pero ambos difirieron de Cp, que mostró una masa más de tres veces superior respecto a las otras dos especies de hospederos.

Tabla 4.1 Peso (promedio $\pm$ EE) de las larvas de las tres especies de lepidópteros ofrecidas a hembras de *G. legneri* en las pruebas de doble elección (n=30).

Hospedero	<i>Lobesia botrana</i>	<i>Plodia interpunctella</i>	<i>Cydia pomonella</i>
Peso (mg)	13,07 $\pm$ 0,22 a	13,34 $\pm$ 0,38 a	46,00 $\pm$ 1,4 b

Letras diferentes mostraron diferencias significativas prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,01$).

4.3.2 Tamaño corporal de la progenie de *G. legneri* según la especie del hospedero sobre la que se desarrollan

Se pudo observar que las hembras de *G. legneri* obtenidas a partir de larvas de *G. mellonella* son significativamente más grandes que las obtenidas sobre LB y PI con unos 3,38, 3,05 y 2,95 mm de longitud de cuerpo respectivamente (Fig. 4.6.A y 4.6.B). En cuanto a la longitud del tórax también se encontró una diferencia significativa en las hembras provenientes de *G. mellonella* respecto a las criadas en LB y PI con medidas de 1,28, 1,11 y 1,13 mm respectivamente. La hembra más grande medida fue obtenida a partir de *G. mellonella* de unos 4,27 mm de largo y la más pequeña provino de LB de 1,74 mm.

En el caso de los machos no se encontraron diferencias significativas entre los parasitoides criados en diferentes especies en la longitud del tórax ni del cuerpo (Fig. 4.6.A y 4.6.B). Estos fueron de menor tamaño que las hembras promediando unos 2,631, 2,455 y 2,123 mm para *G. mellonella*, LB y PI respectivamente. La longitud de tórax vario entre unos 1,023 mm a unos 881 mm siendo el de *G. mellonella* el superior y PI el inferior.

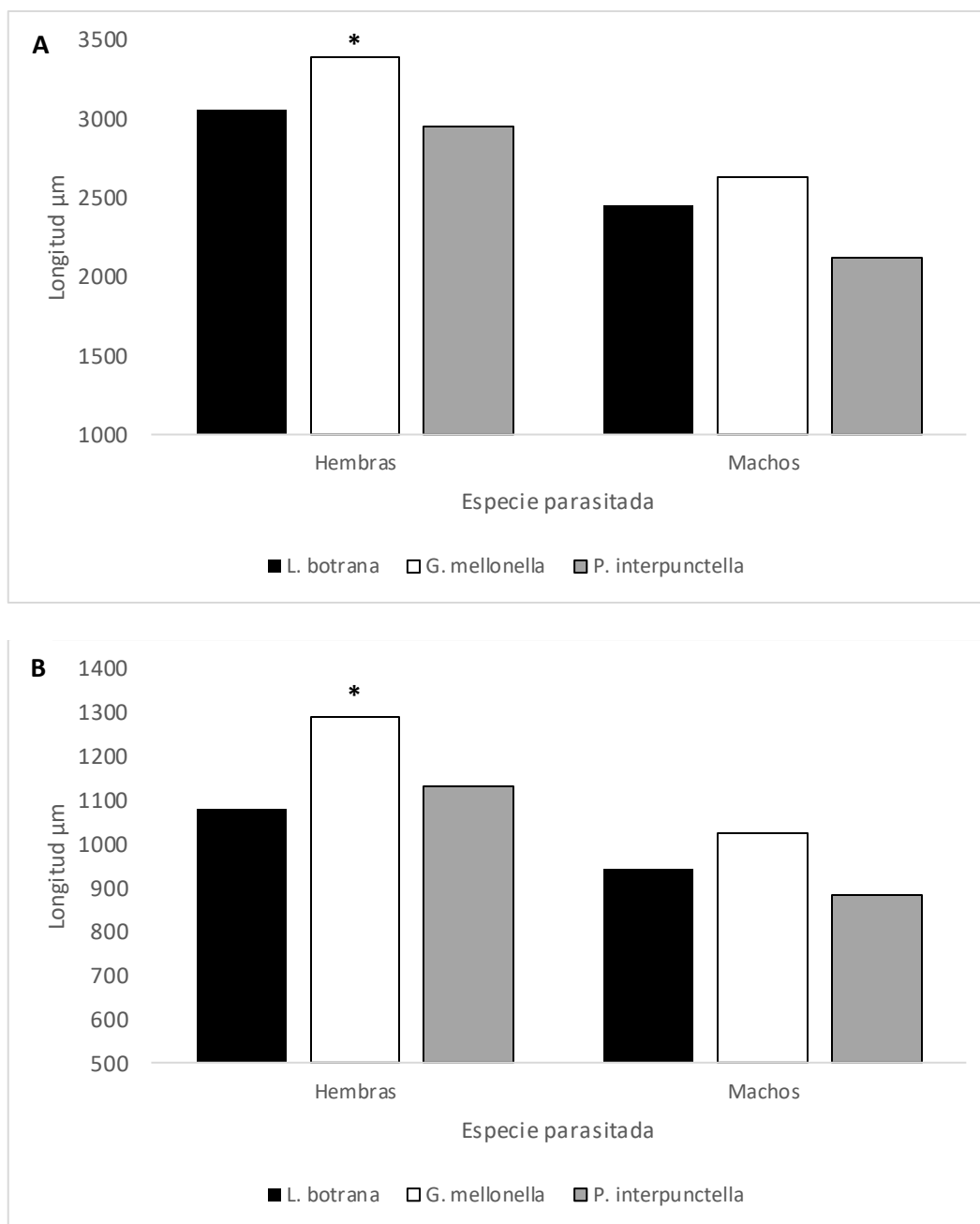


Figura 4.6 Tamaño de la progenie de *G. legneri* resultante de parasitar a *Lobesia botrana*, *Galleria mellonella* y *Plodia interpunctella*. **A.** Longitud del cuerpo de *G. legneri* discriminado por machos y hembras y por especie parasitada. **B.** Longitud del tórax de *G. legneri* discriminado por machos y hembras y por especie parasitada. * Indican diferencias significativas (ANAVA test Tukey $\alpha=0,05$)

4.3.3 Pistas olfativas utilizadas por *Goniozus legneri* en el forrajeo de la polilla de la vid *L. botrana* en interacción con racimos de vid (*Vitis vinifera* var. Malbec)

El tiempo de permanencia de hembras del parasitoide fue diferente cuando se les ofreció racimos con larvas, daño y heces en el estado de baya verde (75" vs. 46") con respecto al control (el aire limpio) ($Z=2,52$ $p=0,0126$) y para racimos solo con daño (84" vs. 35") ($Z=2,19$, $p=0,0156$), en este mismo estado del racimo (Tabla 4.2). En cuanto a los estados de fenológicos de flor y baya en envero, no se encontró una orientación definida hacia ningún estímulo (Tabla 4.2).

Tabla 4.2 Respuesta de *Goniozus legneri* a los distintos estímulos provenientes del accionar de larvas de *Lobesia botrana* en flores de vid, bayas verdes y bayas en envero (inicio maduración). Tiempo de permanencia en segundos en los brazos del olfatómetro en Y.

	Fuente de olor (estímulo)	Estímulo ($\pm$ EE)	Control ($\pm$ EE)	P- valor
	Control (izq./der.)	89,2 ($\pm$ 11,7)	94,2 ($\pm$ 9,8)	0,5288
Flores de vid	Racimo entero ^a	107,9 ($\pm$ 20,3)	99,7 ($\pm$ 19,3)	0,7326
	Racimo dañado ^b	37,8 ($\pm$ 9,03)	91,1 ($\pm$ 24,1)	0,1766
	Heces	81,2 ($\pm$ 14,3)	72,6 ($\pm$ 12,7)	0,5394
	Larvas	72,6 ($\pm$ 17,4)	49,9 ($\pm$ 13,4)	0,1436
Bayas verdes de vid	Racimo entero ^a	75,0 ($\pm$ 10,1,7)	45,7 ($\pm$ 8,5)	0,0126*
	Racimo dañado ^b	83,9 ($\pm$ 16,7)	34,9 ($\pm$ 10,4)	0,0156*
	Heces	66,0 ($\pm$ 12,4)	58,7 ($\pm$ 10,1)	0,8550
	Larvas	64,6 ($\pm$ 13,2)	47,3 ($\pm$ 5,7)	0,5724
Bayas en envero de vid	Racimo entero ^a	58,8 ($\pm$ 7,7)	68,2 ($\pm$ 8,8)	0,3698
	Racimo dañado ^b	40,4 ($\pm$ 9,2)	42,6 ($\pm$ 7,4)	0,7736
	Heces	60,1 ($\pm$ 10,4)	46,0 ($\pm$ 9,7)	0,2606
	Larvas	60,9 ($\pm$ 12,6)	43,3 ($\pm$ 10,9)	0,1576

^a Racimo con 6 larvas, bayas/flores dañadas y heces. ^b Racimo sin larvas ni heces, pero con presencia de daño y seda. * indica diferencias significativas $p < 0,05$.

4.4 Discusión

Las larvas del último estadio de Cp poseen una masa cuatro veces mayor respecto a PI o LB y este mayor tamaño permite camadas más grandes con hembras de mayor tamaño corporal (Mayhew & Hardy, 1998). A pesar de ello se encontró una preferencia hacia larvas de PI sobre Cp, que podría deberse a que los lepidópteros de la familia Pyralidae fueron encontrados como posibles hospederos primarios en las primeras colectas de la especie (Legner & Silveira-Guido, 1983). El peso corporal de las larvas de PI y LB no mostraron diferencias significativas, por lo que si hubiera un sesgo por peso en este caso se podría descartar. Ha sido demostrado que hay una relación directa entre el número de huevos colocados por *G. legneri* y el tamaño del hospedero, poniendo más huevos en hospederos más grandes (Gordh et al., 1983; Lee, 1992). El número de posturas por larva que se registran en *L. botrana* en los ensayos del Capítulo 3 para hembras naïve (9,1), en el tratamiento OC (3,8) y PC (7,3) fue menor que los obtenidos para *C. pomonella* en otros estudios, cuyas larvas son de mayor tamaño (10,6-15,3) (Garrido et al., 2018; Laumann et al., 2000b). El número promedio de huevos por larva fue aún menor cuando las posturas fueron sucesivas sobre varios hospederos en el tratamiento OC, bajando a valores similares a los obtenidos para *L. botrana* en ensayos previos que alcanzaron también los 3,8 huevos (Garrido et al., 2018). El número de huevos colocados fue más bajo a los reportados sobre otros hospedantes de mayor tamaño, donde se han registrado hasta 35 huevos en larvas parasitadas de *G. mellonella* (datos no publicados) cuya masa corporal alcanza más de 200 mg, mientras que *L. botrana* posee una masa de 13 mg.

Sin embargo, dentro de una misma especie hospedera la preferencia si puede ser influenciada por el tamaño corporal. Un estudio donde se evaluaron preferencias por distintos estadios de larvas de Cp, *G. legneri* mostró preferencias por larvas del quinto estadio probablemente porque sobre estas se pueden desarrollar una mayor cantidad de individuos (Laumann et al., 2000a). Sin embargo, en este mismo estudio no se pudo determinar una preferencia en la oviposición entre larvas de cuarto y quinto estadio.

Por otra parte, en los estudios de preferencia como el desarrollado sobre *C. pomonella* por Laumann et al. (2000), las larvas fueron ofrecidas de forma “libre”, es decir, no ocultas o protegidas como en el presente trabajo, lo que pudo haber conducido a errores por ataques casuales o por la disponibilidad más fácil de los hospederos y por ello *G. legneri* puede no

haber elegido. Legner & Warkentin (1988) ensayaron varias densidades de larvas de *A. transitella* ofrecidas de esta misma forma en una caja de Petri de 8 cm de diámetro y observaron el número de larvas atacadas. Encontraron que un solo parasitoide atacó un promedio de 9,2 larvas con densidades de 15-25 larvas de *A. transitella*, no halladas en la naturaleza. El dispositivo utilizado en el presente trabajo evita el contacto directo con la larva durante la elección, impide que estas se desplacen o cambien de posición y simula el hábito críptico de esta especie de parasitoide al ofrecer un orificio pequeño para acceder a la larva. A diferencia de lo ensayos realizados por Laumann et al. (2000a) y Legner & Warkentin (1988), no se registró ataque o parasitismo a más de una larva. De esta forma se considera que los resultados son más robustos en cuanto la elección y preferencia de oviposición. Por ello el mismo método puede ser utilizados en parasitoides con hábitos similares, cuando no es posible ofrecer los hospederos en el sustrato natural.

En cuanto a la relación entre el tamaño del hospedero (masa corporal) y el tamaño de las hembras del parasitoide, se pudo observar al comparar las obtenidas a partir de *G. mellonella* estas fueron significativamente más grandes que las criadas sobre LB y PI. La masa corporal de una larva de quinto estadio de *G. mellonella* ronda los 200 mg mientras que la de larvas de LB y PI se encuentran alrededor de los 13 mg. Hembras de *G. legneri* más grandes poseen un mejor desempeño por que podrían alcanzar un mayor número de oocitos maduros y depositar huevos de mayor tamaño (O'Neill & Skinner, 1990). De esta forma pueden parasitar un mayor número de hospederos en un menor tiempo. En hembras de *Asobara tabida* Förster (Hymenoptera: Braconidae) se encontró una relación entre un mayor tamaño una mayor longevidad y fecundidad, así como una mayor capacidad de dispersión lo que en definitiva es un mejor desempeño de individuos más grandes (Ellers et al., 1998). Asimismo, hembras más grandes de *Aphidius nigripes* Ahsmead (Hymenoptera: Braconidae) resultantes de áfidos parasitados con un mayor tamaño, poseían incrementos poblacionales más rápidos y mayor atracción de machos que las hembras más pequeñas (Cloutier et al., 2000).

Por otro lado, los ensayos de olfatometría mostraron evidencias de que *G. legneri* se orienta a compuestos disueltos en el aire producidos por racimos dañados con restos de seda y heces de *L. botrana* cuando esta se alimenta de bayas verdes. Sin embargo, en los muestreos realizados a campo también se ha encontrado a *G. legneri* atacando a LB en el estado fenológico de baya envero/maduración, aunque en los ensayos de olfatometría no se detectó una orientación en este estado fenológico. Cuando se registró la orientación

hacia este tipo de fuente, se pudo discriminar que esta se produce por los compuestos emitidos por la actividad de alimentación de las larvas que comprende uvas dañadas, seda y aserrín (restos no digeridos de alimento masticado) y no por las larvas en sí o sus heces. Esto coincide en parte los resultados obtenidos sobre *G. legneri* en olfatómetro de seis vías donde se mostró una mayor elección de los olores producidos por restos de alimentación (heces más aserrín) de *E. ceratoniae* y una menor preferencia cuando se ofrecieron larvas solas (Aleosfoor et al., 2014), aunque no se pudo discriminar las heces de otros restos de alimentación por el hábito barrenador de ese hospedero.

A pesar de que *G. legneri* y *L. botrana* corresponden a una nueva asociación donde no han co-evolucionado, el parasitoide es capaz de hallar y de utilizar pistas producidas por la larva cuando se alimenta de racimos de vid. *Goniozus indicus* (Ahsmead) (Hymenoptera: Bethyridae) ha mostrado una preferencia por los volátiles producidos por umbelas de *Cyperus papyrus* L. atacadas por *Eldana saccharina* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) y los restos de alimentación (heces más aserrín), pero no mostró atracción cuando *E. saccharina* se alimentaba de caña de azúcar, lo que indicaría una adaptación específica a plantas de *C. papyrus* (Smith et al., 2006). Sin embargo previamente sobre esta misma especie no se habría encontrado una discriminación por la especie de la cual el hospedero se alimentaba (Smith et al., 1994), por lo que no es posible concluir que hembras del género *Goniozus* utilizan pistas específicas en relación a una especie de planta. Un avance importante respecto al conocimiento sobre el comportamiento de forrajeo en betílidos es el que se obtuvo al estudiar en un túnel de viento a *Goniozus jacintae* Farrugia (Aspin et al., 2021). Justamente este betílido es controlador de un tortricido, *Epiphyas postvittana* (Walker), que afecta a los viñedos en Australia (Danthanarayana, 1980; Paull & Austin, 2006). Se pudo observar una respuesta diferencial a los distintos estados siendo más fuerte la respuesta a larvas de estadios más avanzados que producen más volátiles, seda y heces. Asimismo, en las proximidades del hospedero el parasitoide caminaba a una velocidad menor para poder hallar a su objetivo, lo que puede estar relacionado con los mayores tiempos de permanencia en estímulos atractivos.

Cuando el parasitoide es liberado en viñedos, la menor preferencia por *L. botrana* podría generar una dispersión en búsqueda de hospedantes más atractivos con consecuentemente menores tasas de ataque en campo. Aunque cuando no hay otros hospedantes disponibles, *G. legneri* puede ser capaz de atacar y parasitar a *L. botrana* como se ha mostrado en los capítulos anteriores. Asimismo *G. legneri* es capaz de localizar

a LB utilizando pistas olfativas producidas por su actividad de alimentación en racimos, y en ausencia de componentes vegetales también el parasitoide fue capaz de hallar a LB en un compartimento cerrado.

Capítulo 5. Liberaciones inundativas en jaulas de inclusión



5.1 Introducción

El método propuesto por Paul DeBach del acceso manipulativo, mediante experimentos, es una forma directa de evaluar el efecto de enemigos naturales sobre poblaciones de insectos o ácaros (DeBach, 1964). El mismo compara la densidad de la plaga en presencia y ausencia de enemigos naturales.

Este método requiere la exclusión o restricción de los enemigos naturales de interés, condición que se puede lograr de las siguientes maneras (Luck et al., 1999; Van Driesche et al., 2007):

1. Diseño antes y después: Utilizado más en enfoques de control biológico clásico, en regiones donde la plaga se encuentra presente pero el enemigo natural no. Requiere realizar mediciones de las densidades poblacionales de la plaga durante varios años, y observar cómo se comporta la misma plaga una vez introducido el enemigo natural. La presencia- ausencia del enemigo natural se da en una escala temporal. En plagas con gran movilidad, como es el caso de lepidópteros, este método es de difícil aplicación ya que la variabilidad en las parcelas puede no deberse a factores locales.
2. Diseño espacial: En este caso, la presencia – ausencia del enemigo natural se logra en el espacio físico y no en el tiempo, como es en el “diseño antes y después”. Para ello, el enemigo natural es liberado en parcelas elegidas aleatoriamente, mientras que otras se dejan como testigos/control, es decir sin liberación y con la presencia de la plaga. Una de las dificultades que presenta este método es que debe conocerse previamente la distancia mínima entre las parcelas con y sin liberación del enemigo natural para que las parcelas testigo no sean afectadas por el mismo.
3. Diseño de exclusión: se utilizan principalmente jaulas o mangas elaboradas de tela que no permiten el ingreso del/los enemigo/s natural/es de interés para aislar su efecto en la densidad poblacional de la plaga. Se aplica principalmente para evaluar el control biológico natural que pueden estar ejerciendo enemigos nativos o de presencia espontánea en los cultivos. En este caso los tratamientos utilizados son: a) con jaula cerrada; b) jaula abierta (permite el ingreso del enemigo natural), y c) sin jaula para determinar la magnitud del “efecto jaula”. Este último permite evaluar el efecto de la jaula *per se* en el experimento, como por ejemplo, variaciones microclimáticas como de la temperatura (generalmente superior en las jaulas), sombreado y mayor humedad relativa. Asimismo, la jaula puede restringir el movimiento de los organismos, lo que se vuelve una limitación para estudios de más de una generación en plagas más móviles.

4. Diseño de inclusión: en esta metodología, las jaulas pueden ser utilizadas para encerrar al enemigo natural de interés junto a la plaga; así sus densidades pueden ser manipuladas experimentalmente (Birkhofer et al., 2017). El área interior de las jaulas puede variar desde lo que ocupa parte de una planta hasta una parcela ocupada por un cultivo. La principal ventaja de esta técnica es que tanto la composición y abundancia de la plaga como la del enemigo natural pueden ser definidas (Lang et al., 1999). El encierro afecta el movimiento de los insectos, por lo que es adecuado para experimentos de corto plazo (por ejemplo, una generación). Por estas características, en un enfoque de control biológico aumentativo, la utilización de jaulas de inclusión puede resultar de interés en el caso de evaluar un enemigo natural que se libera en una dosis específica con una población plaga determinada.

Se cuenta con antecedentes de ensayos con jaulas en un diseño de inclusión realizados en especies de parasitoides de la familia Bethyridae. Por ejemplo, para medir la magnitud de control por predación o “host-feeding” del parasitoide *C. stephanoderis* (Hymenoptera: Bethyridae) sobre la broca del café -*H. hampei* (Coleoptera: Scolytidae)- se usaron mangas entomológicas de tela voile en donde, además de manipular las dosis del fitófago y del parasitoide, se consiguieron distintos tiempos de infestación en simultáneo (Aristizabal et al., 1998). Otro caso es el empleado para *G. legneri* para ver el efecto residual de insecticidas sobre el desempeño del parasitoide (Garrido, 2010). En este caso se encerraron ramas de manzano tratadas con diferentes insecticidas utilizados en la agricultura orgánica y luego se liberaron parasitoides junto con el estadio susceptible de *C. pomonella*. Las diferencias encontradas entre los ensayos en laboratorio y semicampo en ese estudio fueron notorias, demostrando que el efecto nocivo de algunos insecticidas sobre el parasitoide se atenuó en condiciones de semicampo o potenció en otros casos.

Por otra parte, en Argentina se han realizado liberaciones aumentativas de otra especie de *Goniozus*. En el año 1976 se llevó a cabo un programa de control biológico con el parasitoide *Goniozus nigrifemur* (sin. *Parasierola nigrifemur* (Ash.)) para el control de *Rhyacionia buoliana* (Den. et Shiff.), tortricido que ataca brotes de pino (Escudero et al., 1979). Los ensayos se realizaron en plantaciones forestales de dos especies de pino, *Pinus taeda* y *P. insignis* en la zona de Yacanto, Córdoba. Es interesante destacar que en este caso se crio y utilizó este parasitoide ya presente en la región para el control de una plaga exótica invasora, ambos coincidentes con las familias abordadas en esta tesis. Se probaron dosis de liberación de unas 6400-25600 avispas por hectárea liberadas una única vez,

alcanzando con la dosis más alta un 18% de incidencia del parasitoide en brotes atacados, no habiéndose registrado los niveles de parasitismo. Desafortunadamente, posteriores estudios en esta asociación no fueron continuados. Otro ejemplo de liberaciones, ya con *G. legneri*, fueron realizadas en montes de peral en un sitio piloto de Cmte. Guerrico, Río Negro para el control de *C. pomonella*. Se emplearon dosis de parasitoides que alcanzaron alrededor de 30.000 individuos/ha, que junto con el empleo de la TCS se logró eliminar el uso de pesticidas contra esta plaga. Se obtuvieron tasas de parasitismo del 40% con niveles de daño del 0,11% (Garrido et al., 2019).

En Europa el parasitoide más ampliamente distribuido y con los mayores porcentajes de parasitismo (más del 50%) sobre *L. botrana* es *C. capitator* (Hymenoptera: Ichneumonidae) (Bagnoli & Lucchi, 2006; Coscolla, 1980; Di Giovanni et al., 2022; Moreau et al., 2010; Scaramozzino et al., 2018; Thiéry & Xuereb, 2003). Es un endoparasitoide solitario larval, koinobionte, parasita larvas del segundo estadio y emerge antes de que *L. botrana* forme la pupa. Debido a su mayor eficiencia y gran especificidad en su lugar de origen (Scaramozzino et al., 2018) en un acuerdo de cooperación entre entomólogos chilenos e italianos se está desarrollando la cría masiva de este parasitoide, superando los obstáculos antes encontrados para su reproducción (Lucchi et al., 2017). En el año 2016 se introdujeron a Chile ejemplares de *C. capitator* colectados en *Daphne gnidium* sobre *L. botrana* en la región de La Toscana, Italia (Salgado, 2021). En 2018, luego de cuarentena y pruebas de especificidad, fueron liberados los primeros ejemplares en Chile. Posteriormente han sido realizadas pruebas en parrales domésticos junto a la TCS para controlar la plaga en áreas urbanas. El parasitoide se ha podido recuperar, pero porcentajes de parasitismo aún no han sido reportados.

Para determinar si un enemigo natural es eficaz, además de conocer cuál es el nivel de mortalidad que inflige a la plaga a controlar, i.e. el porcentaje de parasitismo que produce, es importante que reduzca el nivel poblacional de la plaga por debajo del nivel de daño económico (NDE) (ver Capítulo 1). Este NDE no se tiene en cuenta en muchos casos de estudio, probablemente debido a la dificultad o imposibilidad de determinación (Collier & Van Steenwyk, 2004).

En base a los antecedentes anteriormente mencionados, el objetivo de este Capítulo fue determinar el grado de control y la reducción de daño de *L. botrana* mediante liberaciones confinadas en jaulas del parasitoide *G. legneri* en un cultivo de vid, información necesaria para desarrollar un programa de control biológico aumentativo. Para ello se tuvieron en

cuenta tres eventos de sueltas de parasitoides, coincidiendo con las tres generaciones que presenta la plaga en cultivos de vid de Mendoza.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Material empleado

Para la ejecución de los bioensayos se utilizaron hembras adultas de *G. legneri* provenientes del Centro de Multiplicación de Biocontroladores (CEMUBIO), Río Negro, Argentina. El parasitoide fue criado sobre larvas de la polilla de la cera, *G. mellonella* (cuarto y quinto estadio larval), a 25 °C y fotoperiodo de 24:0 (L:O). Solamente se utilizaron hembras de camadas mixtas, es decir, con presencia de machos asegurando la cópula.

Por otra parte, se mantuvo una colonia de la polilla de la vid establecida en la EEA Mendoza-INTA, Mendoza. Las larvas fueron criadas en dieta artificial como se describe en el Capítulo 3 de esta tesis. Esta población fue inicialmente colectada en la temporada 2010-2011 de un viñedo en Cruz de Piedra, departamento de Maipú en la provincia de Mendoza. Nuevos materiales de diferentes regiones de Mendoza fueron incorporados a las poblaciones de laboratorio cada año. *Lobesia botrana* fue mantenida en condiciones ambientales controladas a 22 ± 1 °C y $30 \pm 10\%$ HR, con un fotoperiodo de 16:8 L:O.

5.2.2 Área de estudio

Los ensayos de campo se realizaron en un viñedo ubicado dentro del área restringida por una cuarentena para la polilla de la vid en Mendoza, con presencia de la plaga constatada por trampas delta con cebo (Pherocon® EGVM) de feromona sexual específica (ver Capítulo 1). La parcela elegida fue del varietal Bonarda, por ser esta variedad representativa de la zona Este del oasis Norte de Mendoza. Además, la var. Bonarda presenta una mayor susceptibilidad a podredumbres del racimo porque este es muy cerrado o apretado, lo que hace a la tercera generación de la plaga más dañina en este tipo de racimos. El viñedo de 2 ha de superficie, se ubica en el distrito de Los Corralitos, Guaymallén, Mendoza ($32^{\circ}52'51.61''$ S, $68^{\circ}43'58.21''$ O). El sistema de conducción es en espaldero con poda Guyot doble, riego por superficie mediante surcos. El manejo sanitario se realizó con productos permitidos para la agricultura orgánica sin uso de plaguicidas de ningún tipo, empleando únicamente la TCS para controlar la polilla de la vid (ver Capítulo 1) y azufre mojeable para el control de enfermedades fúngicas.

5.2.3 Experimento de liberación confinada de *G. legneri*

Para estimar la capacidad de control de *G. legneri* sobre *L. botrana*, se realizó un experimento de liberación en jaulas de inclusión donde se probó una densidad relativa de parasitoide: hospedador 1: 1. Para ello, se tuvieron en cuenta tres tratamientos de acuerdo a la fenología del cultivo, coincidente con las tres generaciones de la plaga: 1) floración, 2) baya verde, y 3) baya inicio de maduración (envero). En cada generación se dejaron jaulas control (n=20) que contenían únicamente a la plaga. Se seleccionaron aleatoriamente 20 plantas por tratamiento. El experimento se repitió durante tres temporadas agrícolas: 2018-19, 2019-20 y 2020-21, sumando un total de 120 plantas durante todo el ensayo.

Las jaulas de inclusión se confeccionaron con tela voile de 1 m de alto y 0,5 m de ancho, encerrando un pámpano (brote resultante de la yema formada la primavera anterior) (Fig. 5.1), que contiene dos racimos. Para colocar las jaulas se tomó el pámpano del extremo norte de la planta y se cerró sujetando las jaulas en la base con hilo de algodón reforzado.



Figura 5.1 Jaulas de inclusión utilizadas para encerrar el brote o pámpano. Izq. Vista completa. Der. Dispositivo utilizado para liberar larvas del tercer estadio de *L. botrana* dentro de la jaula de inclusión, estado fenológico de floración-cuaje de frutos.

Las jaulas se colocaron al inicio de la brotación para asegurar que la yema era viable y evitar el ingreso de enemigos naturales y otros insectos que pudieran interferir. La infestación de los racimos se realizó con larvas de *L. botrana* del tercer estadio (L3), apartadas el mismo día de la liberación (determinado según grados día, ver más adelante). En cada jaula se colocaron dos tubos eppendorf (1,5 ml) con tres L3 cada uno, junto a un trozo de 1 cm² de papel absorbente para evitar condensación, sujetos al racimo por

medio de un alambre (Fig. 5.1), dando un total de seis L3. Luego de asegurada la unidad experimental, se procedió a abrir los tubos para permitir la salida de las larvas hacia los racimos.

Se dejó transcurrir un período de 5 a 7 días, tiempo suficiente para que las larvas se instalaran en la planta, se alimentaran y pasaran al quinto estadio, permitiendo de esta forma la formación del nido y/o penetración de la larva dentro de la baya. La determinación de este momento se realizó inspeccionando jaulas de seguimiento que contenían solo *L. botrana* colocadas para tal fin (n=6). Transcurrido este tiempo se liberaron 6 hembras de *G. legneri* de 48-72 h de edad por jaula, excepto en las jaulas control. Previo a la liberación, las avispas fueron acondicionadas y trasladadas en vasos herméticos cilíndricos (2 cm diámetro x 2,5 cm alto), con una pincelada con el alimento a base de miel y levadura (descrito en capítulos anteriores). Todo el material fue trasladado desde el laboratorio hasta el sitio de liberación dentro de heladeras portátiles refrigeradas. Transcurrida una semana desde la liberación de los adultos de *G. legneri* se procedió a la evaluación de las muestras. Para ello, el pámpano fue sustraído en su totalidad.

Para establecer los momentos de infestación de las jaulas con larvas de *L. botrana* se aplicó la metodología de los grados-día (GD), una medida de la acumulación de calor requerido para el desarrollo de muchos insectos, calculados mediante el método de Touzeau (Touzeau, 1981), con la siguiente fórmula:

$$GD = \frac{T. \text{máx} + T. \text{mín}}{2} - T. \text{umbral}$$

GD= Grados Día

T máx. = Temperatura máxima diaria (°C)

T mín. = Temperatura mínima diaria (°C)

T umbral = Temperatura umbral inferior (°C)

Se considera como temperatura umbral inferior a 10 °C, temperatura debajo de la cual *L. botrana* no se desarrolla.

Se tomaron datos de temperatura máxima y mínima diaria de la estación meteorológica Montecaseros por ser la más cercana al sitio del ensayo y con series de datos completos. Para calcular los grados días necesarios para alcanzar el tercer estadio larval (L3) en cada generación se sumaron los GD a eclosión de huevos más la mitad de los GD para culminar el desarrollo larval utilizando los valores de desarrollo de *L. botrana* en GD obtenidos en

Dagatti & Becerra (2015). Se obtuvieron como umbrales de desarrollo para L3 los presentados en la Tabla 5.1 mostrados junto a las fechas en que fueron alcanzados en cada temporada.

Tabla 5.1 Fechas de inicio de los experimentos de liberaciones confinadas para evaluar el control biológico ejercido por *G. legneri* sobre larvas de *L. botrana* en un cultivo de vid, var. Bonarda, en Los Corralitos-Guaymallén, Mendoza, Argentina, calculadas con un modelo de grados-día (GD) (Touzeau 1981). GD: grados-día que requirió el desarrollo de *L. botrana*, desde el estado de huevo hasta el tercer estadio larval.

Temporada	Tratamiento 1 inicio de floración	Tratamiento 2 baya verde	Tratamiento 3 envero
	365 GD	840 GD	1340 GD
2018-19	07/11/18	18/12/18	25/01/19
2019-20	06/11/19	05/12/19	15/01/20
2020-21	03/11/20	15/12/20	15/01/21

Cuando el umbral de GD era alcanzado se procedía a realizar la infestación con *L. botrana* en los racimos. De esta forma las infestaciones con L3 se realizaron en los estados fenológicos de inicio floración, grano arveja y envero correspondiendo a la primera, segunda y tercera generación respectivamente.

Una vez concluido cada experimento, las jaulas se abrieron y se registró en laboratorio la siguiente información:

- Primera generación: número de glomérulos por racimo, número de larvas parasitadas, número de larvas vivas y de pupas de *L. botrana*.
- Segunda y tercera generación: número de bayas afectadas por racimo, número de larvas parasitadas, número de larvas vivas y de pupas de *L. botrana*.

Análisis estadísticos

Luego de comprobar que los datos no poseen distribución normal mediante test de normalidad por Shapiro-Wilks, para evaluar posibles diferencias de todas las variables analizadas entre el control y el tratamiento con liberación en cada generación y en cada temporada, se emplearon ANOVAs no paramétricos con el método de Kruskal-Wallis. Se

utilizó un nivel de significancia de 95% ($p < 0,05$). Para ambos tipos de análisis se utilizó el software Infostat versión 2020 (Di Rienzo et al., 2011).

5.3 Resultados

Tabla 5.2 Número promedio por pámpano de: glomérulos (1ra generación), bayas dañadas, pupas y larvas de *L. botrana* y larvas parasitadas en ensayo de semicampo en un viñedo var. Bonarda de Guaymallén, Mendoza.

		1 ^{ra} generación		2 ^{da} generación		3 ^{ra} generación	
Variable		Control	Lib. GL	Control	Lib. GL	Control	Lib. GL
2018-19	N° glomérulos	4,36 (19)	4,06 (16)	-	-	-	-
	N° bayas dañadas	7,10 (19)	9,31 (16)	13,05 (19)	12,89 (18)	18,05 (20)	21,37 (19)
	N° pupas y larvas	4,00 (19)	3,75 (16)	4,00 (19)	3,50 (18)	3,50 (20)	4,32 (19)
	N° larvas parasitadas	-	0	-	0	-	0,1 (19)
2019-20	N° glomérulos	5,89 (18)	5,7 (20)	-	-	-	-
	N° bayas dañadas	-	-	13,4 (20)	15,75 (20)	13,2 (20)	15,67 (18)
	N° pupas y larvas	4,44 (18)	4,05 (20)	3,7 (20)	1,8 (20)	3,9 (20)	3,78 (18)
	N° larvas parasitadas	-	0	-	0,3 (20)	-	0 (18)
2020-21	N° glomérulos	**	**	-	-	-	-
	N° bayas dañadas	**	**	7,41 (17)	7,42 (19)	15,6 (20)	16,72 (18)
	N° pupas y larvas	**	**	2,65 (17)	1,74 (19)	4,15 (20)	3,39 (18)
	N° larvas parasitadas	**	**	-	0,42 (19)	-	0,05 (18)

Entre () número de repeticiones. Lib. GL = con liberación de 6 avispa de *G. legneri*. **Debido a que no se contó con el material de *G. legneri* a tiempo no se pudo realizar la liberación en la primera generación.

Mediante la colocación de larvas de *L. botrana* en el tercer estadio con el método descrito se obtuvo en promedio 3,5-4,4 larvas por pámpano (i.e. dos racimos) de quinto estadio en los controles por cada seis L3 liberadas (Tabla 5.2). En las jaulas dónde se liberó *G. legneri* fue posible recuperar adultos que en algunos casos se encontraban vivos y en otros muertos.

Los daños relevados en cada una de las generaciones (Fig. 5.2) resultan visualmente similares a los producidos en condiciones de campo. El nivel de daño no mostró diferencias significativas entre el control y la liberación de *G. legneri* en ninguno de los tres años estudiados (Fig. 5.3.A). Se registraron larvas parasitadas en todas las temporadas ensayadas, en la segunda y tercera generación de la polilla de la vid. Estas se encontraban mayoritariamente dentro de las galerías de las bayas (Fig. 5.4.a). Estas larvas representaron una fracción que varió del 0,05 a 0,4 larvas parasitadas por pámpano (Tabla 5.2), con valores más elevados en segunda generación. Se pudo constatar la presencia de larvas paralizadas y con signos de alimentación por el parasitoide (Fig. 5.4.b y c), en total unas 7 en los tres años considerados y unas 2 en la segunda generación de la temporada 2019-2020.



Figura 5.2 Daño provocado por *Lobesia botrana* encontrado y contabilizado dentro de las jaulas. a. glomérulo. b. bayas verdes dañadas. c. bayas maduras dañadas.

En cuanto al grado de control de la plaga, se encontró una disminución significativa ($p < 0,0005$; $H = 11,71$), de alrededor del 50% respecto al control, del número de individuos de *L. botrana* en los pámpanos donde se liberó *G. legneri* en la segunda generación (baya verde) de la temporada 2019-2020 (Fig. 5.3.B), pero no se observaron disminuciones significativas en ningún otro año o generación (Fig. 5.3.B). Sin embargo, también se observó una disminución en el número de individuos de *L. botrana* en la segunda y tercera generación de la temporada 2020-2021.

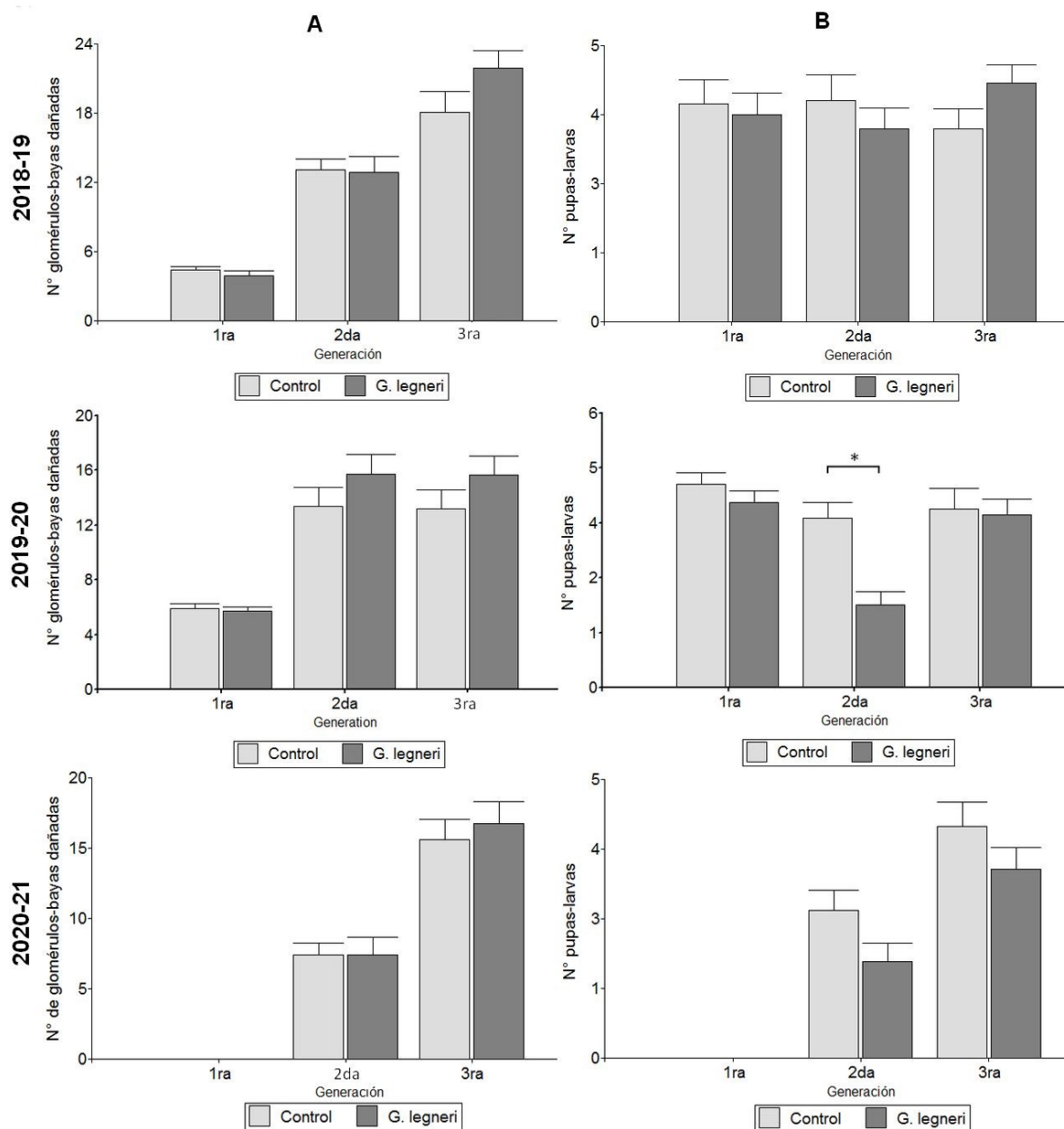


Figura 5.3 Ensayos de jaulas de inclusión en las tres temporadas: 2018-19, 2019-2020, 2020-21. A. Glomérulos formados (únicamente 1ra generación) y bayas dañadas por *L. botrana* por pámpano en cada generación en jaulas control y con liberación de *G. legneri*. B. Pupas y larvas remanentes de *L. botrana* por pámpano en cada generación en jaulas control y con liberación de *G. legneri*. No se pudieron recabar datos de la primera generación en la temporada 2020-21. * diferencia significativa ($p < 0,001$)



Figura 5.4 Larvas de *L. botrana* atacadas por *G. legneri* en el material recuperado de las jaulas. a. Hembra adulta junto a larva parasitada dentro de una baya verde. b y c. Larvas paralizadas de *Lobesia botrana* con signos de alimentación por parte de *G. legneri* (manchas necróticas).

5.4 Discusión

En primer lugar, es importante destacar que este estudio representa la primera prueba de liberación de *G. legneri* para el control de la polilla de la vid, en las tres generaciones que presenta en el cultivo de vid en la provincia de Mendoza, Argentina, arrojando muy buen resultado en la manipulación de ambos insectos. De las liberaciones realizadas, se pudo comprobar la mayor mortalidad de *L. botrana* por el parasitoide en la segunda generación (estado fenológico de baya verde) de la temporada 2019-2020, con diferencias significativas entre el control y el tratado con *G. legneri* de 3,7 y 1,8 larvas/pupas por pámpano respectivamente. Sin embargo, el número de larvas parasitadas no explica la totalidad del control efectuado sobre la plaga en esta segunda generación, ya que se encontraron unas 0,3 larvas parasitadas/pámpano en promedio alcanzando un porcentaje de parasitismo del 14%. Tampoco las larvas halladas atacadas explican el control en segunda generación de la temporada 2019-2020, ya que solamente se encontraron dos larvas paralizadas con signos de *host-feeding* en ese momento. El parasitismo registrado puede explicar solo en parte la mortandad encontrada de la plaga, esto se podría deber a la dificultad de detectar aun en condiciones de semicampo o ser más importante en magnitud el efecto depredador del parasitoide. Si bien la información obtenida en este estudio es relevante por cuanto se pudo manipular y registrar el parasitismo de *G. legneri* en condiciones de semicampo, a rasgos generales el nivel de parasitismo por sí solo no es suficiente para constatar el éxito de control, debido a que no se tiene en cuenta la densidad de la plaga o el NDE de la plaga (Badii et al., 2004; Collier & Van Steenwyk, 2004). En este sentido la densidad poblacional de *L. botrana* dentro de la jaula de inclusión sufrió un descenso de cerca del 50% respecto al control, lo que es un resultado alentador para el empleo de este parasitoide.

En un enfoque de control biológico aumentativo, la efectividad de un ACB puede estar dada si se logra reducir a las poblaciones de la plaga por debajo del NDE después de una liberación, en comparación con un testigo que mantuvo poblaciones por encima del NDE (Collier & Van Steenwyk, 2004). Al tratarse de una plaga cuarentenaria, en donde todavía se busca su erradicación (SENASA, 2023), no se ha estimado en la actualidad un NDE ni UDE para *L. botrana* para los viñedos de la región. De haberse obtenido el valor del NDE, no se hubiera podido constatar una efectividad del parasitoide porque se obtuvieron niveles de daño no significativamente distintos entre las jaulas control y donde se liberó el parasitoide. En este sentido, el nivel de daño no se vio significativamente afectado, aun cuando las densidades de la plaga disminuyeron un 50%. Un aspecto a considerar es que, de acuerdo a la biología del parasitoide, este parasita larvas hospederas de los últimos estadios, pudiendo haberse ya producido el daño directo a las bayas. Esta característica podría sin embargo ser complementaria, por ejemplo, al uso de parasitoides de huevos como tricogramátidos que si evitan el daño (Van Driesche et al., 2007).

Debido a esto, *G. legneri* se considera eficaz si ocasiona reducciones significativas de la población de la plaga, que en este caso solo se pudo evidenciar en la segunda generación en el estado de bayas verdes de la vid, aspecto que debe ser tenido en cuenta a la hora de decidir el mejor momento para liberar el parasitoide, si se optara por utilizar este ACB en liberaciones aumentativas.

Los ensayos de liberación del parasitoide realizados en la primera generación de la plaga dieron como resultado una baja disminución en la población del hospedero y esto puede deberse a que *G. legneri* no prefiera o le sea imposible encontrar a *L. botrana* en el estado de floración, como se describe en el Capítulo 4 de esta tesis.

Sin embargo, este mismo método al dar resultados podría ser empleado para futuros ensayos con este y otros parasitoides en vid. Entre los diseños posibles para evaluar el efecto de enemigos naturales en condiciones de campo se encuentran: “antes y después”, espacial y de exclusión con jaulas (Van Driesche et al., 2007). Las jaulas de inclusión fueron elegidas entre los diferentes métodos en campo por las siguientes razones:

- El diseño antes y después es difícil de realizar debido a que *G. legneri* se encuentra presente naturalmente y las aplicaciones de insecticidas contra la plaga son obligatorias, más en zonas con altos niveles de infestación lo que podría afectar el desempeño del parasitoide. Tampoco se dispone de datos históricos de daños o monitoreo de la densidad poblacional de la plaga en racimos.

- Las extensiones de los viñedos con un mismo tipo de manejo son pequeñas, lo que hace difícil distanciar las parcelas tratadas de las parcelas control para un diseño espacial.
- Las jaulas con las dos especies confinadas, i.e. la plaga y el parasitoide, permitieron manipularlas, sin liberar la especie dañina en el ambiente, atendiendo a las medidas cuarentenarias adoptadas en la provincia. Al aislar la unidad experimental del ambiente, también evitaron la acción de otros parasitoides o predadores (arañas, coccinélidos, ichneumonídeos, chinches, etc.) en los viñedos.

El diseño de este estudio estuvo dirigido a evaluar la acción de *G. legneri* sobre las tres generaciones de la plaga en el cultivo de vid en Mendoza, de forma independiente entre ellas. Por ello, no permitió medir el efecto en la misma población a lo largo de todo el ciclo. Para cumplir con ese próximo objetivo, se debería diseñar otro tipo de experimento o utilizar otra metodología que permita estimar el control que puede ejercer *G. legneri* a lo largo de toda la temporada del cultivo.

Otro factor de importancia a tener en cuenta cuando se plantea desarrollar un programa de control biológico aumentativo es el costo de la producción del agente de control y de su liberación. Se debe evaluar que fracción de los costos totales de la producción de un cultivo representa el control y considerarse la viabilidad (Collier & Van Steenwyk, 2004). El costo total de producción de un viñedo en espaldero con destino a elaboración de vino es de 7660 USD por ha (valor estimado para enero del 2023) y el costo de aplicar el control químico es de 70 USD por ha (Novello, 2023). En este sentido, si bien no se conoce el costo de liberar *G. legneri* en un viñedo, tampoco se cuenta con una estimación de los beneficios que conlleva el control biológico frente al control químico, es sabido que el control biológico presenta múltiples ventajas difíciles de cuantificar económicamente. Estas ventajas o beneficios son la baja peligrosidad para el aplicador, ser ambientalmente más amigable, no crear poblaciones resistentes o plagas secundarias, no dejar residuos en los alimentos, entre otros (Hajek, 2004; Nicholls Estrada, 2008; van Lenteren et al., 2018)

Otro aspecto que analizar a la luz de los resultados de este capítulo es la dosis de liberación del parasitoide utilizada. Para este ensayo se consideró la liberación de *G. legneri* a una relación de 1:1 respecto a las L3 de *L. botrana*, pero debido a la mortalidad de algunas larvas hospederas hasta llegar al quinto estadio (alrededor de cuatro larvas vivas/ 6), resultó en una densidad relativa parasitoide:hospedador de 1:0,6, esto puede haber ocasionado interferencias conespecíficas entre las hembras de la avispa por la búsqueda de

hospedadores sin parasitar. Por ejemplo, las liberaciones de *Anisopteromalus calandrae* Howard (Hymenoptera: Pteromalidae) en dosis altas no fueron más efectivas que en dosis bajas contra gorgojo del maíz debido a una interferencia mutua (Wen & Brower, 1994). Esto también fue demostrado en otra especie de betílido ya mencionada, *G. nephantidis*, cuya liberación mostró los mismos niveles de efectividad en el control de *Opisina arenosella* Walker (Lepidoptera: Xyloryctidae) en palmeras cocoteras cuando se liberó a razón de 10 parasitoides por palmera que cuando se liberaron 40 parasitoides por palmera (Venkatesan et al., 2006). Sin embargo, en estos casos no se mostró un efecto depresor en el grado de control al aumentar el número de individuos liberados. Finalmente, calculando una dosis de liberación igual a la utilizada para el caso de estudio en montes de peral descrito en Garrido et al. (2019), se estaría soltando en cada generación de *L. botrana* en vides de Mendoza unas 10.000 avispas/ha, pero esta dosis se debería ajustar a los niveles poblacionales de la plaga. Es por ello que los ensayos que prueben la efectividad de control de diferentes dosis del parasitoide serán necesarios en un futuro, para ajustar una relación óptima según los niveles poblacionales de la plaga y evitar así una posible interferencia entre conspecíficos.

Capítulo 6. Discusión y conclusiones generales



6.1 Discusión general

El objetivo de esta tesis fue generar conocimientos para la utilización del parasitoide nativo *G. legneri* – reconocido agente de biocontrol en EE.UU. y en Argentina para varias plagas - en la implementación de un programa de control biológico aumentativo para el manejo de *L. botrana*, en el cultivo de vid en la provincia de Mendoza, Argentina. Para ello, el trabajo se centró en torno a la hipótesis general de que *G. legneri* presenta atributos positivos para ser considerado en un enfoque de control biológico aumentativo de *L. botrana* en los viñedos de Mendoza.

En relación a la hipótesis principal se derivaron las siguientes afirmaciones:

1. Los parámetros poblacionales (fecundidad, longevidad del adulto, tasas de reproducción, entre otros) muestran que *G. legneri* se desarrolla adecuadamente sobre *L. botrana*.
2. *Goniozus legneri* muestra preferencia y es capaz de detectar y encontrar a larvas de *L. botrana* por compuestos orgánicos volátiles emitidos por esta polilla (kairomonas) o derivados de su actividad en los racimos (sinomonas) de *V. vinífera*.
3. El parasitoide reduce las poblaciones de *L. botrana* en viñedos en condiciones de cultivo

La afirmación (1) se corroboró parcialmente, ya que la supervivencia, proporción de sexos y la tasa intrínseca de incremento de *G. legneri* fueron bajas cuando se crio a expensas de *L. botrana*, en comparación con otros hospederos. Sin embargo, si se contempla un enfoque de control biológico aumentativo, aunque el parasitoide puede ocasionar mortalidad en las semanas posteriores a la liberación, la mayor mortalidad ocasionada sobre la plaga se espera que será alcanzada en el momento de la liberación. En este caso son más relevantes otras cualidades de los enemigos, como la capacidad de búsqueda y la preferencia sobre otros hospedantes presentes en el agroecosistema.

En este sentido la afirmación (2) se cumple en parte, ya que *G. legneri* no mostró preferencia por *L. botrana* por sobre *P. interpunctella*. Pero sí se observó una orientación por su hospedante en racimos con bayas verdes. Además, en cuanto a lo planteado en la afirmación (3), fue en el momento de baya verde dónde se pudo constatar que la liberación del parasitoide logró un control de alrededor del 50% de la plaga. Probablemente sea en este momento, coincidente con la segunda generación de *L. botrana*, en donde la liberación de *G. legneri* produzca los mejores resultados.

Sin embargo, es necesario considerar que la utilización de *G. legneri* puede no resultar exitosa debido a las siguientes cuestiones: a) ejercer un control parcial, b) no reducir el daño (cuando se libera en el momento óptimo para el parasitismo del hospedero), y c) mal desempeño al criarse sobre *L. botrana*. Asimismo, otras características no abordadas en esta tesis deben ser tenidas en cuenta, como es el costo de la aplicación de esta medida de control, su compatibilidad con los insecticidas utilizados en viñedos y el potencial perjuicio a lepidópteros no blanco. Hoy en día, hay consenso de que no hay combinación de atributos definida en los agentes de control biológico que incrementen la posibilidad de éxito (Mason et al., 2008). Sin embargo, Aguirre (2018) detallan aquellas características que son deseables, tales como: “...la compatibilidad ecológica y la sincronización temporal con la especie plaga, su facilidad de cría, un alto grado de especificidad, una capacidad dispersiva y reproductiva alta, niveles de parasitismo/depredación altos, y poseer una habilidad competitiva”. Muchos de estos atributos no se cumplen o no fueron estudiados en la asociación parasitoide-hospedero *G. legneri* y *L. botrana*. Pero estas características son más bien deseables en otros enfoques distintos a un control biológico inundativo, siendo más bien adecuados en control biológico clásico o inoculativo.

El control biológico aumentativo, ya sea utilizando a *G. legneri* u otro organismo, posee grandes ventajas en un manejo de grandes áreas como es el que se ha venido realizando con la polilla de la vid. Es un método que se puede llegar a emplear en áreas protegidas de aplicaciones por ser no contaminante o disruptivo. El costo puede ser bajo si el enemigo natural es capaz de reproducirse y aumentar su población por sí solo. Además, la efectividad (por ej. en aplicaciones aéreas) en un área extensa puede ser superior a un producto químico de contacto. Otros métodos como el control mecánico o químico pueden resultar demasiados costosos, ser contaminantes y afectar a la población que viven en las zonas afectadas (Barrientos et al., 2018; Mohan & Sathiamma, 2007). Tal vez, debido a la similitud entre el paradigma de los pesticidas con el control biológico inundativo, es más popular que las liberaciones inoculativas y la adopción puede resultar más sencilla (Menn & Hall, 1999).

6.2 Conclusiones generales

- Se determinó la presencia de *G. legneri* en distintas localidades del principal oasis productivo de vid en la provincia. Constituyó el primer reporte de la especie en la provincia de Mendoza, así como el primer registro de parasitismo natural sobre *L. botrana* en viñedos

de Argentina. Por otro lado, el uso de este parasitoide no se restringe únicamente a la polilla de la vid, siendo posible, como es en otras regiones del país, utilizarlo contra *C. pomonella* y *E. ceratoniae*, entre otros lepidópteros plaga. Esto se debe a la plasticidad adaptativa presente en este parasitoide que parasita diferentes hospederos en distintas especies vegetales y en diversidad de ambientes. Además, el aporte de fotos más detalladas de los ejemplares y fotos de la genitalia pueden ser de gran ayuda en futuras identificaciones del parasitoide de hallarse en otras regiones geográficas del país.

- Se evaluó el potencial de desarrollo del parasitoide sobre *L. botrana* mediante el conocimiento de los parámetros biológicos y poblacionales. Se encontró que el potencial reproductivo de *G. legneri* es considerablemente reducido, en condiciones de laboratorio, donde las hembras dedican un periodo de 4 días al comportamiento de cuidado parental, antes de buscar y oviponer un nuevo hospedador. Además, *G. legneri* es capaz de parasitar y reproducirse sobre *L. botrana*, con una $r_m > 0$ cuando se permite o no el cuidado parental, 0,53 y 0,89 respectivamente, por lo que se desarrolla sobre este hospedero. Sin embargo, la baja proporción sexual encontrada (0,52-0,60) y la baja supervivencia (25%) podría indicar que *L. botrana* es un hospedador de baja calidad para el desarrollo de la progenie del parasitoide. Las bajas tasas intrínsecas de incremento descartarían a la polilla de la vid como candidato para crías masivas de *G. legneri*, por lo que es necesaria su producción sobre hospederos alternativos en un programa de control biológico aumentativo para el control de *L. botrana*. Aunque en un contexto de control biológico mediante liberaciones aumentativas estas características pueden no ser definitorias en cuanto la efectividad como lo son la capacidad de hallar su hospedero y su preferencia por sobre otras especies presentes.

- Por otra parte, se determinó la preferencia sobre otros hospederos y la capacidad de orientarse a través de pistas volátiles producidas por la actividad de larvas de la polilla de la vid en bayas verdes de vid. De las pruebas de doble elección entre hospederos se pudo observar que hay una preferencia por el hospedero artificial *P. interpunctella* por sobre *C. pomonella* y *L. botrana*. Hembras más grandes, por consecuencia con mejor desempeño, fueron obtenidas a partir de hospederos de mayor masa corporal. Sin embargo, el tamaño del hospedante no fue determinante en la elección del mismo.

- *Goniozus legneri*, al igual que otros betílidos, utiliza pistas indirectas producidas por la alimentación de *L. botrana* sobre racimos en el estado de baya verde para localizarla. Es importante destacar que la capacidad de encontrar a *L. botrana* es innata, manteniéndola

aún después de haber sido criado sobre otro hospedante, lo que tiene importantes implicancias desde un enfoque de control biológico aumentativo.

- En viñedos donde el lepidóptero predominante es *L. botrana*, *G. legneri* podría ser capaz de encontrar y atacar esta plaga cuando se encuentra en los últimos estadios larvales. La eficiencia de búsqueda según los resultados en el ensayo con olfatómetro es superior cuando *L. botrana* se encuentra en segunda generación ya que es coincidente con el estado de baya verde.

- Asimismo, mediante la utilización de jaulas de inclusión en pámpanos de vid se pudo evaluar el efecto de una liberación aumentativa del parasitoide *G. legneri* sobre la densidad poblacional de *L. botrana*. Este método permitió manipular la cantidad presente de larvas de la polilla y adultos del parasitoide. Se encontraron larvas paralizadas con signos de *host-feeding* y también larvas parasitadas. Se observó una disminución significativa de la población de la plaga cuando el parasitoide es liberado en la segunda generación de *L. botrana*.

En coincidencia con los resultados obtenidos en el ensayo de olfatometría (Capítulo 4), únicamente se encontró un accionar efectivo del parasitoide en la segunda generación. Sin embargo, se registró parasitismo en la tercera generación, aunque sin lograr reducir significativamente las poblaciones de la plaga. Durante la tercera generación de *L. botrana* también se registró de forma natural parasitismo de *G. legneri* en viñedos de Mayor Drummond (Capítulo 2).

En base a los resultados obtenidos, si bien *G. legneri* no es capaz de controlar naturalmente, un enfoque de control biológico por conservación a la polilla de la vid podría ser considerada como una nueva línea de estudio, de modo de aportar conocimientos sobre la manipulación del hábitat (aumentar la provisión de recursos alimenticios, aumentar su reproducción, utilizar plaguicidas selectivos, entre otras técnicas) en favor de aumentar su desempeño. La información obtenida hasta el momento constituye la base para continuar estudiando el potencial de *G. legneri* como un agente de control biológico de *L. botrana*. Es por ello que se proponen investigaciones futuras para averiguarlo.

6.3 Investigaciones futuras

- Ensayos dirigidos a evaluar el efecto predador en los primeros estadios de la polilla de la vid son necesarios para estimar el nivel de control debido a *host-feeding*.

- Ensayos que evalúen distintas densidades relativas parasitoide: hospedador de liberación para determinar una dosis óptima de liberación.
- Evaluar la respuesta funcional del parasitoide frente a distintas densidades y/o estadios de la plaga en racimos.
- Estudios que evalúen el efecto de liberaciones a lo largo de las 3 generaciones de la plaga.
- Conocer la compatibilidad con otros enemigos naturales, como microorganismos o depredadores u otras técnicas utilizadas para el manejo de la plaga como el control químico o la TCS.

Bibliografía

- Aciar, M. I., Gorgolas, M. del C. F., Pinilla, E., & Brancher, N. (2001). Presencia en Catamarca de una etapa nativa de *Goniozus* parasito de larvas de *Cydia pomonella* L. (primera aproximación). *Revista de Ciencia y Técnica*, VII, 51–53.
- AERU University of Hertfordshire. (2023). *Pesticide Properties DataBase*. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/>
- Aguilera-Sammaritano, J., Caballero, J., Deymié, M., Rosa, M., Vazquez, F., Pappano, D., Lechner, B., & González-Teuber, M. (2021). Dual effects of entomopathogenic fungi on control of the pest *Lobesia botrana* and the pathogenic fungus *Eutypella microtheca* on grapevine. *Biological Research*, 54(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40659-021-00367-x>
- Aguirre, M. B. (2018). *Desarrollo de métodos cuantitativos para la selección de los mejores agentes de control biológico y sus estrategias de liberación: Nuevos criterios para incrementar el éxito en su aplicación*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. <http://digital.bl.fcen.uba.ar>.
- Akbarzadeh Shoukat, G. (2012). Larval parasitoids of *Lobesia botrana* (Denis and Schiffermüller, 1775) (Lepidoptera: Tortricidae) in Orumieh vineyards. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14, 267–274.
- Akbarzadeh Shoukat, G., & Ebrahimi, E. (2008). Egg parasitoids and their role in biological control of grape berry moth *Lobesia botrana* (Denis & Schiff.) (Lep. Tortricidae) in Orumieh vineyards. *Proceeding of 18th Iranian Plant Protection Congress*.
- Aleosfoor, M., Ehteshami, F., & Fekrat, L. (2014). A six-arm olfactometer for analysing olfactory responses of *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethyridae), the larval ectoparasitoid of carob moth. *Journal of Entomological and Acarological Research*, 46(3), 119. <https://doi.org/10.4081/jear.2014.3787>
- Altieri, M. A. (1999). *Agroecología: Bases científicas para una agricultura sustentable*. Editorial Nordan–Comunidad.
- Altieri, M. A., Nicholls, C. I., Ponti, L., & York, A. (2005). Vineyards Through Habitat Management. *Practical Winery & Vineyard*, May/June(January), 6.
- Altimira, F., De La Barra, N., Godoy, P., Roa, J., Godoy, S., Vitta, N., & Tapia, E. (2022). *Lobesia botrana*: A biological control approach with a biopesticide based on entomopathogenic fungi in the winter season in Chile. *Insects*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/insects13010008>
- Aristizabal, L. F. A., Bustillo, A. E. P., Orozco, J. H., & Chaves, B. C. (1998). Efecto depredador del parasitoide *Cephalonomia stephanoderis* (Hymenoptera: Bethyridae) sobre los estados inmaduros de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) en condiciones de campo. *Revista Colombiana de Entomología*, 24(1–2), 35–42. <https://doi.org/10.25100/socolen.v24i1.9829>
- Arn, H., Rauscher, S., Guerin, P., & Buser, H. R. (1988). Sex Pheromone blends of three tortricids pests in European vineyard. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 21, 111–117.
- Aspin, E., Keller, M. A., Yazdani, M., & Hardy, I. C. W. (2021). Walk this way, fly that way:

- Goniozus jacintae* attunes flight and foraging behaviour to leafroller host instar. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 169(4), 350–361. <https://doi.org/10.1111/eea.13028>
- Azevedo, C. O., Alencar, I. D. C. C., Ramos, M. S., Barbosa, D. N., Colombo, W. D., Vargas, J. M. R., & Lim, J. (2018). Global guide of the flat wasps (Hymenoptera, Bethylidae). En *Zootaxa* (Vol. 4489, Número 1). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4489.1.1>
- Azevedo, C. O., Lanes, G. O., & Gobbi, F. T. (2014). Bethylidae. En S. Roig-Juñent, J. J. Morrone, & L. E. Claps (Eds.), *Biodiversidad de Artrópodos Argentinos* (2020ª ed., Vol. 4, pp. 185–201). Editorial INSUE - UNT.
- Badii, M. H., Flores, A. E., Ponce, G., Quiroz, H., Salas, J. A. G., & Foroughbakhch, R. (2004). Formas de Evaluar los Enemigos Naturales en Control Biológico. *CULCyT*.
- Bagnoli, B., & Lucchi, A. (2006). Parasitoids of *Lobesia botrana* (Den. & Schiff.) in Tuscany. *IOBC/WPRS Bulletin*, 29(11), 139–142.
- Bale, J. S., van Lenteren, J. C., & Bigler, F. (2008). Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363, 761–776. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2182>
- Barnay, O., Hommay, G., Gertz, C., Kienlen, J. C., Schubert, G., Marro, J. P., Pizzol, J., & Chavigny, P. (2001). Survey of natural populations of *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae) in the vineyards of alsace (France). *Journal of Applied Entomology*, 125(8), 469–477. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0418.2001.00575.x>
- Barrientos, M. J., Ferrer, C., & Manzur, T. (2018). Controversias socio-técnicas en torno a las fumigaciones aéreas con agro tóxicos en la provincia de Mendoza. *X Congreso ALASRU, Montevideo-Uruguay*, 23.
- Becerra, V. C., Herrera, M. E., Gonzalez, M., Mendoza, G. B., & Dagatti, C. V. (2015). Vid. *Lobesia botrana* Den et Schiff. (Polilla europea del racimo). En *Plagas Cuarentenarias de frutales de la República Argentina. Avances en los resultados* (p. 275). Ediciones INTA.
- Becerra, V. C., & Portillo, V. (2014). Cuantificación de los daños ocasionados por *Lobesia botrana* y medición de la pérdida de producción generada por podredumbre de los racimos. *II Simposio Argentino de Viticultura y Enología y II Simposio Internacional sobre uva de mesa y pasa*.
- Begum, M., Gurr, G. M., Wratten, S. D., Hedberg, P. R., & Nicol, H. I. (2006). Using selective food plants to maximize biological control of vineyard pests. *Journal of Applied Ecology*, 43(3), 547–554. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2006.01168.x>
- Bellows, T. S., Van Driesche, R. G., & Elkinton, J. S. (1992). Life-Table construction and analysis in the evaluation of natural enemies. *Annu. Rev. Entomol*, 37, 587–614.
- Benelli, G., & Canale, A. (2012). Learning of visual cues in the fruit fly parasitoid *Psytalia concolor* (Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae). *BioControl*, 57(6), 767–777. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9456-0>
- Bentley, T., Hull, T. T., Hardy, I. C. W., & Goubault, M. (2009). The elusive paradox: Owner-intruder roles, strategies, and outcomes in parasitoid contests. *Behavioral Ecology*, 20(2), 296–304. <https://doi.org/10.1093/beheco/arp007>

- Biobichos Ltda. (2022). *Productos - Goniozus legneri*.
<http://biobichos.cl/index.php/es/goniozus-legneri>
- Biondi, A., Mommaerts, V., Smagghe, G., Viñuela, E., Zappalà, L., & Desneux, N. (2012). The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. *Pest Management Science*, 68(12), 1523–1536. <https://doi.org/10.1002/ps.3396>
- Birkhofer, K., Bylund, H., Dalin, P., Ferlian, O., Gagic, V., Hambäck, P. A., Klapwijk, M., Mestre, L., Roubinet, E., Schroeder, M., Stenberg, J. A., Porcel, M., Björkman, C., & Jonsson, M. (2017). Methods to identify the prey of invertebrate predators in terrestrial field studies. *Ecology and Evolution*, 7(6), 1942–1953. <https://doi.org/10.1002/ece3.2791>
- Bridwell, J. C. (1920). Some notes on Hawaiian and other Bethylidae (Hymenoptera) with the description of a new genus and species (2nd paper). *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*, 4(2), 291–314.
- Bustillo Pardey, A. E. (2005). El papel del control biológico en el manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 29(110), 55–68. <https://doi.org/10.35486/at.v2i1.143>
- Butler, G. D., & Schmidt, K. M. (1985). *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethylidae): Development, Oviposition, and Longevity in Relation to Temperature. *Annals of the Entomological Society of America*, 78(3), 373–375. <https://doi.org/10.1093/aesa/78.3.373>
- Cabello, T., Gallego, J. R., Fernandez, F. J., Gamez, M., Vila, E., Del Pino, M., & Hernandez-Suarez, E. (2012). Biological control strategies for the south American tomato moth (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouse tomatoes. *Journal of Economic Entomology*, 105(6), 2085–2096. <https://doi.org/10.1603/EC12221>
- Cardé, R. T. (2007). Using pheromones to disrupt mating of moth pests. En M. Kogan & P. Jepson (Eds.), *Perspectives in Ecological Theory and Integrated Pest Management* (Número June 2007, pp. 122–169). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511752353.006>
- Carrasco, A. E., Sánchez, N. E., & Tamagno, L. E. (2012). *Modelo agrícola e impacto socio-ambiental en la Argentina: monocultivo y agronegocios* (J. L. (LISEA) Frang (ed.); Primera ed). SeDiCI, UNLP.
- Casale, A. (1991). Some notes on the parental and parasocial behaviour of *Sclerodermus domesticus* Latreille (Hymenoptera Bethylidae). *Ethology Ecology & Evolution*, 3(1), 35–38. <https://doi.org/10.1080/03949370.1991.10721905>
- Charnov, E. L., Hartogh Los-den, R. L., Jones, W. T., & van den Assen, J. (1981). Sex ratio evolution in a variable environment. *Nature*, 289(1/8), 27–33.
- Chiu-Alvarado, P., Barrera, J. F., & Rojas, J. C. (2009). Attraction of *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethylidae), a Parasitoid of the Coffee Berry Borer (Coleoptera: Curculionidae), to Host-Associated Olfactory Cues. *Annals of the Entomological Society of America*, 102(1), 166–171. <https://doi.org/10.1603/008.102.0119>
- Chkhubianishili, T. A., & Malaniya, I. G. (1986). Granulosis virus against the European grape moth. *Zashchita Rastenii*, 5, 33.

- Civolani, S., Boselli, M., Butturini, A., Chicca, M., Fano, E. A., & Cassanelli, S. (2014). Assessment of Insecticide Resistance of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) in Emilia-Romagna Region. *Journal of Economic Entomology*, 107(3), 1245–1249. <https://doi.org/10.1603/EC13537>
- Cloutier, C., Duperron, J., Tertuliano, M., & McNeil, J. N. (2000). Host instar, body size and fitness in the koinobiotic parasitoid *Aphidius nigripes*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 97(1), 29–40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2000.00713.x>
- Cock, M. J. W. W., van Lenteren, J. C., Brodeur, J., Barratt, B. I. P. P., Bigler, F., Bolckmans, K., Cònsoli, F. L., Haas, F., Mason, P. G., & Parra, J. R. P. (2010). Do new Access and Benefit Sharing procedures under the Convention on Biological Diversity threaten the future of biological control? *BioControl*, 55(2), 199–218. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9234-9>
- Collier, T., & Van Steenwyk, R. (2004). A critical evaluation of augmentative biological control. *Biological Control*, 31(2), 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.05.001>
- Conlong, D. E., Graham, D. Y., & Hastings, H. (1988). Notes on the natural host surveys and laboratory rearing of *Goniozus natalensis* Gordh (Hymenoptera: Bethyilidae), a parasitoid of *Eldana saccharina* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) larvae from *Cyperus papyrus* L. in Southern Africa. *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*, 51(1), 115–127. <http://content.ajarchive.org/cgi-bin/showfile.exe?CISOROOT=/0012-8789&CISOPTR=1219>
- Coscolla, R. (1980). Aproximacion al estudio del parasitismo natural sobre *Lobesia botrana* Den. y Schiff. en las comarcas viticolas Valencianas. *Bol. Serv. Plagas*, 6, 5–15.
- Costanza, R., D'Arge, R., Groot, R. de, Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R. V., Paruelo, J., Raskin, R. G., Sutton, P., & van den Belt, M. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, 387, 253–260. <https://doi.org/10.1038/387253a0>
- COVIAR. (2018). *Impacto de la vitivinicultura en la economía argentina* (Carlos Fio). <https://fce.uncuyo.edu.ar/upload/impacto-de-la-vitivinicultura-en-la-economia-argentina.pdf>
- Cozzi, G., Haidukowski, M., Perrone, G., Visconti, A., & Logrieco, A. (2009). Influence of *Lobesia botrana* field control on black aspergilli rot and ochratoxin A contamination in grapes. *Journal of Food Protection*, 72(4), 894–897. <https://doi.org/10.3390/toxins5010049>
- Cucchi, N. J. A. (2020). *Agricultura sin plaguicidas sintéticos : manejo agroecológico de plagas en cultivos argentinos*. INTA Ediciones.
- Dagatti, C. V., & Becerra, V. C. (2015). Ajuste de modelo fenológico para predecir el comportamiento de *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) en un viñedo de Mendoza, Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 74(3–4), 117–122.
- Danne, A., Thomson, L. J., Sharley, D. J., Penfold, C. M., & Hoffmann, A. A. (2010). Effects of native grass cover crops on beneficial and pest invertebrates in Australian

- vineyards. *Environmental Entomology*, 39(3), 970–978.
<https://doi.org/10.1603/EN09144>
- Danthanarayana, W. (1980). Parasitism of the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker), by its larval ectoparasite, *Goniozus jacintae* Farrugia (Hymenoptera: Bethyilidae), in natural populations in Victoria. *Australian Journal of Zoology*, 28(6), 685–692. <https://doi.org/10.1071/ZO9800685>
- De Santis, L. (1970). Las especies argentinas del género *Cephalonomia* (Hymenoptera, Bethyilidae). *Revista Sociedad Entomológica Argentina*, 32((1-4)), 17–21.
- DeBach, P. (1964). *Biological Control of Insect Pests and Weeds* (1st ed.). Cambridge University Press.
- Delbac, L., & Thiéry, D. (2017). *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) larval population assessment by damage to grape flowers: could empty larval nests monitoring be useful? *IOBC-WPRS Bulletin*, 128, 37–44.
- Delrio, G., Luciano, P., & Prota, R. (1987). Researches on grape-vine moths in Sardinia. En A. A. Balkema (Ed.), *E.C. Experts Group "Integrated pest control in viticulture"*.
- Di Giovanni, F., Ricciardi, R., Loni, A., Scaramozzino, P. L., Benelli, G., & Lucchi, A. (2022). Back to the Wild: The Parasitoid Community of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) in a Grapevine-Free Natural Environment. *Insects*, 13(7), 1–17.
<https://doi.org/10.3390/insects13070627>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2011). *InfoStat* (versión 24). Universidad Nacional de Córdoba.
<http://www.infostat.com.ar/>
- Doutt, R. L. (1973). Maternal Care of Immature Progeny by Parasitoids. *Annals of the Entomological Society of America*, 66(2), 486–487.
- Dry, P. R., Longbottom, M. L., McLoughlin, S., Johnson, T. E., & Collins, C. (2010). Classification of reproductive performance of ten winegrape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 47–55. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00085.x>
- Dudley, N., Attwood, S. J., Goulson, D., Jarvis, D., Bharucha, Z. P., & Pretty, J. (2017). How should conservationists respond to pesticides as a driver of biodiversity loss in agroecosystems? *Biological Conservation*, 209, 449–453.
- Dueñas-López, M. A. (2022). *Eupoecilia ambiguella* (European grape berry moth). *CABI Compendium*. CABI International.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1079/cabicompendium.14313>
- Ehteshami, F., Aleosfoor, M., Allahyari, H., & Alich, M. (2012). Two sex life table of *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethyilidae), on flour moth (*Ephestia kuehniella* Zeller), under laboratory conditions. *20th Iranian Plant Protection Congress*, 745.
- Ehteshami, F., Aleosfoor, M., Allahyari, H., Alich, M., Akrami, M. A., & Kiany, M. (2010). First record of *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethyilidae), the larval ectoparasitoid of carob moth, in Iran. *19th Iranian Plant Protection Congress*.
- El-Basha, N. A., & Mandour, N. S. (2006). Effect of *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethyilidae) on the life table of *Palpita unionalis* Hb. (Lepidoptera:

- Pyralidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 16(1), 5–11.
- Ellers, J., Van Alphen, J. J. M., & Sevenster, J. G. (1998). A field study of size–fitness relationships in the parasitoid *Asobara tabida*. *Journal of Animal Ecology*, 67, 318–324. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.1998.00195.x>
- Escudero, G. S., Arenas, E. C., & Rübenacker, M. C. (1979). Acción de *Parasierola nigrifemur* (Ahs.) (Hym. Bethylidae) sobre *Rhyacionia buoliana* (Den & Schiff) (Lep. Tortricidae) en pinares artificiales. I. Periodo 1976 - 1977. *Acata zoológica Lilloana*, 35, 777–784.
- Evans, H. E. (1964). A synopsis of the American Bethylidae (Hymenoptera, Aculeata). *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 133, 1–222.
- Faltlhauser, A. C., Varone, L., & Garrido, S. (2018). Evaluación preliminar de *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethylidae) como agente de control de *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae). *X Congreso Argentino de Entomología, Mendoza*, 362.
- Fermaud, M. (1989). Association of *Botrytis cinerea* with Grape Berry Moth Larvae. En *Phytopathology* (Vol. 79, Número 6, p. 651). <https://doi.org/10.1094/phyto-79-651>
- Ferrero, A., Laumann, R., Gutierrez, M. M., & Stadler, T. (2000). Evaluación en laboratorio de la toxicidad de insecticidas en *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) y en su enemigo natural *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethylidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, 26, 559–575.
- Fruitos, A., & Marcucci, B. (2022). Bethylidae presentes en viñedos con diferentes manejos en Mendoza, Argentina. XI CAE y XII CLE. *Publicación Especial Sociedad Entomológica Argentina*, 4, 332.
- Fundación para el Desarrollo Frutícola. (2018). *Informe técnico y de gestión final. Proyecto: “Desarrollo de la técnica de insecto estéril (TIE) mediante radiación ionizante, para el control de la plaga cuarentenaria Lobesia botrana, técnica amigable y sustentable con el medio ambiente”*.
- Gallardo, A., López, M., Lara, M., Maistrello, L., Molejón, A., Ocete, R., Á., López, M., Lara, M., Maistrello, L., Molejón, A., Ocete, R., López, M., Lara, M., Maistrello, L., Molejón, A., & Ocete, R. (2016). Resurgence of minor pests following the implementation of mating disruption against *Lobesia botrana* (Denis & Schifferrmüller) (Lepidoptera, Tortricidae) in Sherry vineyards (Spain). *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 55(1), 37–43. <https://doi.org/10.5073/vitis.2016.55.37-43>
- Garrido, S. (2010). Efecto secundario de insecticidas biológicos, naturales y botánicos sobre la mortalidad y capacidad de parasitoidismo de *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethylidae) en manzanos del Alto Valle de Río Negro. En *Universidad Nacional del Tucumán, Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo*.
- Garrido, S., Cichón, L., Claps, L., Lago, J., Navarro, D., Gómez, C., & Leonelli, E. (2019). Uso de *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethylidae) en control biológico inundativo y su incidencia en la reducción de insecticidas en perales. *SEMIÁRIDA Revista de la Facultad de Agronomía UNLPam*, 29(Supl.), 27–29.
- Garrido, S., Cichón, L., & Fernández, D. (2007). Control Biológico de carpocapsa. La utilización de enemigos naturales como herramienta complementaria para la reducción de poblaciones plagas. *Fruticultura y Diversificación*, 54, 26–33.

- Garrido, S., Cichón, L., Fernández, D., & Azevedo, C. (2005). Primera cita de la especie *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethylidae) en el Alto Valle de Río Negro, Patagonia Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 64(1–2), 14–16.
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0373-56802005000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Garrido, S., Cichón, L., Lago, J., Navarro, M. D., Herrera, M. E., & Becerra, V. (2018). Evaluación de la oviposición de *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethylidae) sobre distintos lepidópteros de interés frutihortícola. *IV RAP Acta zoológica lilloana*, 62, 118–121.
- Gerding, M., Castro, D., Rodríguez, M., & Cabezas, P. (2014). Enemigos naturales útiles en el manejo de *Lobesia botrana*. *Fitosanidad*, 36–37.
- Gholizad, L. M., Demir, I., Nalcacioglu, R., & Demirbag, Z. (2017). Microbial control potential of some entomopathogenic agents against the European grapevine moth, *Lobesia botrana* Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 27(1), 35–39.
- Gilburn, A. S., Bunnefeld, N., Wilson, J. M., Botham, M. S., Brereton, T. M., & Al., E. (2005). Are neonicotinoid insecticides driving declines of widespread butterflies? *PeerJ*, 3(e), 1402.
- Gilligan, T. M., Epstein, M. E., Passoa, S. C., Powell, J. A., Sage, O. C., & Brown, J. W. (2011). Discovery of *Lobesia botrana* ([Denis & Schiffermiller]) in California: An invasive species new to North America (Lepidoptera: Tortricidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 113(1), 14–30. <https://doi.org/10.4289/0013-8797.113.1.14>
- Gonçalves, A., Palumbo, R., Guimarães, A., Gkrillas, A., Dall'Asta, C., Dorne, J. Lou, Battilani, P., & Venâncio, A. (2020). The route of mycotoxins in the grape food chain. *American Journal of Enology and Viticulture*, 71(2), 89–104.
<https://doi.org/10.5344/ajev.2019.19039>
- Gordh, G. (1982). A new species of *Goniozus* (Hymenoptera: Bethylidae) imported into California for the biological control of the navel orangeworm (Lepidoptera: Pyralidae). *Entomological news*, 93(5), 136–138.
- Gordh, G., Woolley, J. B., & Medved, R. A. (1983). Biological studies on *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethylidae) a primary external parasite of the navel orangeworm *Amyelois transitella* and pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Pyralidae, Gelechiidae). *Contributions to the American Entomological Institute*, 20, 433–467.
- Gotelli, N. J. (2008). *A Primer of Ecology: Vol. 4 th ed.* Sinauer Associates, Inc.
- Gothilf, S., & Mazor, M. (1987). Release and recovery of imported parasites of the carob moth, *Spectrobates ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae), in Israel. *Israel Journal of Entomology*, XXXI, 19–23.
- Goubault, M., Batchelor, T. P., Linforth, R. S. T., Taylor, A. J., & Hardy, I. C. W. (2006). Volatile emission by contest losers revealed by real-time chemical analysis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1603), 2853–2859.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3655>

- Gray, M. E., Ratcliffe, S. T., & Rice, M. E. (2009). The IPM paradigm: concepts, strategies and tactics. En *Pest Management: Concepts, Tactics, Strategies and Case Studies* (pp. 1–13). Cambridge University Press.
- Greco, N. M., Walsh, G. C., & Luna, M. G. (2020). Biological Control in Argentina. En J. C. van Lenteren, V. H. P. Bueno, Y. C. Colmenarez, & M. G. Luna (Eds.), *Biological Control in Latin America and the Caribbean: Its Rich History and Bright Future* (pp. 21–42). CAB International 2020.
- Griffiths, N. T., & Godfray, H. C. J. (1988). Local mate competition, sex ratio and clutch size in bethylid wasps. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 22(3), 211–217. <https://doi.org/10.1007/BF00300571>
- Gullan, P. J., & Cranston, P. S. (2010). *The Insects: an outline of entomology*. Wiley-blackwell.
- Hajek, A. E. (2004). *Natural Enemies: An Introduction to Biological Control*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1002/9781444314076>
- Hang, S. (2010). Comportamiento de agroquímicos en el suelo. *Revista del Colegio de Ingenieros Agrónomos de la provincia de Córdoba*, 82.
- Hardy, I. C. W., & Blackburn, Ti. M. (1991). Brood guarding in a bethylid wasp. *Ecological Entomology*, 16(1), 55–62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1991.tb00192.x>
- Hardy, I. C. W., Griffiths, N. T., & Godfray, H. C. J. (1992). *Clutch Size in a Parasitoid Wasp: A Manipulation Experiment*. 61(1), 121–129.
- Hardy, I. C. W., Stokkebo, S., Bønløkke-Pedersen, J., & Sejr, M. K. (2000). Insemination capacity and dispersal in relation to sex allocation decisions in *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethyidae): Why are there more males in larger broods? *Ethology*, 106(11), 1021–1032. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2000.00621.x>
- Hawkins, B. A., & Cornell, H. V. (2004). *Theoretical Approaches to Biological Control*.
- Heit, G., Sione, W., & Cortese, P. (2015). Three years analysis of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) flight activity in a quarantined area. *J. Crop Prot*, 2015, 605–615.
- Herrera, M. E. (2019). *Efectividad de insecticidas biorracionales sobre Lobesia botrana Den. et Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae). Evaluación de efectos letales y subletales*. Universidad Nacional de la Plata.
- Herrera, M. E., Dagatti, C. V., & Becerra, V. C. (2017). Life table and population parameters of *Lobesia botrana* (Den. et Schiff.) under laboratory conditions. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 76(3–4), 27–32. <https://doi.org/10.25085/rsea.763404>
- Herrera, M. E., Dagatti, C. V., & Becerra, V. C. (2016). Método práctico de cría masiva de *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) en condiciones de laboratorio. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 75(3–4), 160–164.
- Hoffmann, C., Köckerling, J., Biancu, S., Gramm, T., Michl, G., & Entling, M. H. (2017). Can flowering greencover crops promote biological control in German vineyards? *Insects*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/insects8040121>

- Hokkanen, H., & Pimentel, D. (1984). New Approach for Selecting Biological Control Agents. *The Canadian Entomologist*, 116, 1109–1121.
<https://doi.org/10.4039/Ent1161109-8>
- Hokkanen, H., & Pimentel, D. (1989). New associations in biological control: theory and practice. *The Canadian Entomologist*, 121(10), 829–840.
<https://doi.org/10.4039/Ent121829-10>
- Ibrahim, R. (2004). *Biological control of grape berry moths Eupoecilia ambiguella Hb. and Lobesia botrana Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) by using egg parasitoids of the Genus Trichogramma*. Justus Liebig University, Giessen, Germany.
- INV. (2022). *Informe anual de superficie cultivada de vid 2021*. Instituto Nacional de Vitivinicultura. <https://www.argentina.gob.ar/inv/vinos/estadisticas/superficie/anuarios>
- Ioriatti, C., Anfora, G., Tasin, M., De Cristofaro, A., Witzgall, P., & Lucchi, A. (2011). Chemical ecology and management of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, 104(4), 1125–1137.
<https://doi.org/10.1603/EC10443>
- Ioriatti, C., Lucchi, A., & Bagnoli, B. (2008). Grape areawide pest management in Italy. *Areawide pest management: theory and implementation*. CABI International, Wallingford, United Kingdom, 208–225. <https://doi.org/10.1079/9781845933722.0208>
- ISCAMEN. (2018). *Evaluación del comportamiento de aplicaciones de químicos específicos vía pulverización aérea en cultivos de vid para control de Lobesia botrana (Den. & Schiff.)*.
http://www.iscamen.com.ar/publicaciones/INFORMES_TECNICOS/LOBESIA_PULVERIZACION_AEREA_informe.pdf
- ISCAMEN. (2020, enero 29). Primera liberación de insectos estériles de *Lobesia botrana*. www.iscamen.com.ar. <http://www.iscamen.com.ar/noticia.php?idNoticia=861>
- Jeffs, C. T., & Lewis, O. T. (2013). Effects of climate warming on host-parasitoid interactions. *Ecological Entomology*, 38(3), 209–218.
<https://doi.org/10.1111/een.12026>
- Jervis, M. A., Ellers, J., & Harvey, J. A. (2008). Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. *Annual Review of Entomology*, 53, 361–385. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093433>
- Jervis, M. A., & Kidd, N. A. C. (1986). Host-feeding strategies in hymenopteran parasitoids. *Biological Reviews*, 61, 395–434.
- Khidr, S. K., Mayes, S., & Hardy, I. C. W. (2013). Primary and secondary sex ratios in a gregarious parasitoid with local mate competition. *Behavioral Ecology*, 24(2), 435–443. <https://doi.org/10.1093/beheco/ars181>
- Krupke, C. H., Holland, J. D., Long, E. Y., Eitzer, B. D. (2017). Planting of neonicotinoid-treated maize poses risks for honey bees and other non-target organisms over a wide area without consistent crop yield benefit. *Journal of Applied Ecology*, 54, 1449–1458.
- Lang, A., Filser, J., & Henschel, J. R. (1999). Predation by ground beetles and wolf spiders on herbivorous insects in a maize crop. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 72, 189–199.

- Laumann, R. A. (1998). *Evaluación en laboratorio de Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethylidae) nuevo enemigo natural de *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) en cultivos de nogal de la Provincia de Catamarca, República Argentina. Universidad Nacional del Sur.
- Laumann, R. A., Ferrero, A. A., & Stadler, T. (2000a). Comportamiento de selección de larvas de *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) por el parasitoide *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethylidae). *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 26(4), 551–558.
- Laumann, R. A., Ferrero, A. A., & Stadler, T. (2000b). Evaluación en laboratorio de *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethylidae) enemigo natural de *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) en cultivos de nogal de la provincia de Catamarca, República Argentina. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas*, 26, 537–550.
- Lee, H. J. (1992). Ovipositional mechanism of an ecto-parasitoid, *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethylidae). *Chinese J. Entomol.*, 12, 193–199.
- Legner, E. F., & Gordh, G. (1992). Lower navel orangeworm (Lepidoptera: Phycitidae) population densities following establishment of *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethylidae) in California. *Journal of Economic Entomology*, 85(6), 2153–2160. <https://doi.org/10.1093/jee/85.6.2153>
- Legner, E. F., & Silveira-Guido, A. (1983). Establishment of *Goniozus emigratus* and *Goniozus legneri* [Hym: Bethylidae] on navel orangeworm, *Amyelois transitella* [Lep: Phycitidae] in California and biological control potential. *Entomophaga*, 28(2), 97–106. <https://doi.org/10.1007/BF02372133>
- Legner, E. F., & Warkentin, R. W. (1988). Parasitization of *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethylidae) at increasing parasite and host, *Amyelois transitella* (Lepidoptera: Phycitidae), densities. *Annals - Entomological Society of America*, 81(5), 774–776. <https://doi.org/10.1093/aesa/81.5.774>
- López-Rodríguez, M. A., Chiu-Alvarado, P., & Rojas, J. C. (2009). Factores que afectan la atracción de *Prorops nasuta* Waterson (Hymenoptera: Bethylidae) a los olores emitidos por los desechos de su huésped, la broca del café. *Acta Zool. Mex.*, 25(1), 49–60.
- López García, G. P., Mazzitelli, M. E., Fruitos, A., González, M., Marcucci, B., Giusti, R., Alemanno, V., del Barrio, L., Portela, J., & Debandi, G. (2019). Biodiversidad de insectos polinizadores y depredadores en agroecosistemas vitícolas de Mendoza, Argentina: Consideraciones para el manejo del hábitat. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, 51(1), 309–322. <https://bdigital.uncu.edu.ar/13695>
- López Plantey, R., Papura, D., Couture, C., Thiéry, D., Pizzuolo, P. H., Bertoldi, M. V., & Lucero, G. S. (2019). Characterization of entomopathogenic fungi from vineyards in Argentina with potential as biological control agents against the European grapevine moth *Lobesia botrana*. *BioControl*, 64(5), 501–511. <https://doi.org/10.1007/s10526-019-09955-z>
- Louis, F., Schirra, K. J., & Feldhege, M. (1997). Mating disruption in vineyards: determination of population densities and effects on beneficials. *IOBC/WPRS Bulletin*, 20(1), 95–99.

- Lucchi, A., Ladurner, E., Iodice, A., Savino, F., Ricciardi, R., Cosci, F., Conte, G., & Benelli, G. (2018). Eco-friendly pheromone dispensers - a green route to manage the European grapevine moth? *Environmental Science and Pollution Research*, 25(10), 9426–9442. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1248-3>
- Lucchi, A., Ricciardi, R., Loni, A., Cosci, F., Alvarez, A. R., Beeche, M., & Scaramozzino, P. L. (2017). Rearing *Campoplex capitator* Aubert in Italy and in Chile: preliminary achievements. *Future IPM 3.0 towards a sustainable agriculture*, 370.
- Lucchi, A., & Scaramozzino, P. L. (2022). *Lobesia botrana* (European grapevine moth). *CABI Compendium*. CABI International.
- Lucchi, A., Scaramozzino, P. L., Michl, G., Loni, A., & Hoffmann, C. (2016). The first record in Italy of *Trichogramma cordubense* Vargas & Cabello 1985 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) emerging from the eggs of *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller, 1775) (Lepidoptera: Tortricidae). *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 55(4), 161–164. <https://doi.org/10.5073/vitis.2016.55.161-164>
- Luck, R. F., Shepard, B. M., & Kenmore, P. E. (1999). Evaluation of biological control with experimental methods. En T. S. Bellows & T. W. Fisher (Eds.), *Handbook of Biological Control* (pp. 225–242). Academic Press.
- Luna, M. G., Pereyra, P. C., Coviella, C. E., Nieves, E., Savino, V., Gervassio, G. S., Luft, E., Virla, E., & Sánchez, N. E. (2015). Potential of biological control agents against *Tuta absoluta* (Lepidoptera : Gelechiidae): current knowledge in Argentina. *Florida Entomologist*, 98(2), 489–494. <https://doi.org/10.1653/024.098.0215>
- Luna, M. G., Sánchez, N. E., & Pereyra, P. C. (2007). Parasitism of *Tuta absoluta* (Lepidoptera, Gelechiidae) by *Pseudapanteles dignus* (Hymenoptera, Braconidae) under laboratory conditions. *Environmental Entomology*, 36(4), 887–893. [https://doi.org/10.1603/0046-225X\(2007\)36\[887:POTALG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0046-225X(2007)36[887:POTALG]2.0.CO;2)
- MAGyP. (2018, diciembre 13). En Mendoza se redujo un 95 % la plaga *Lobesia botrana*. *argentina.gob.ar*. <https://www.argentina.gob.ar/noticias/en-mendoza-se-redujo-un-95-la-plaga-lobesia-botrana>
- Maher, N., & Thiéry, D. (2006). *Daphne gnidium*, a possible native host plant of the European grapevine moth *Lobesia botrana*, stimulates its oviposition. Is a host shift relevant? *Chemoecology*, 16(3), 135–144. <https://doi.org/10.1007/s00049-006-0339-7>
- Marchesini, E., & Montá, L. D. (1994). Observations on natural enemies of *Lobesia botrana* (Den. & Schiff.) (Lepidoptera, Tortricidae) in Venetian vineyards. *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura*, 26(2), 201–230.
- Marcucci, B., Mazzitelli, M. E., Garrido, S. A., Cichón, L. I., Becerra, V. C., & Luna, M. G. (2023). Presencia de *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethyridae) y su asociación con lepidópteros plaga en el oasis cultivado Norte de la provincia de Mendoza, Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 82(2), 63–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.25085/rsea.820209>
- Marcucci, B., Mazzitelli, M. E., Puebla, H. D., & Becerra, V. C. (2022). Parasitoides de *Lobesia botrana* (Lepidoptera : Tortricidae) presentes en viñedos de Mendoza , Argentina. *XI Congreso Argentino y XII Congreso Latinoamericano de Entomología*.
- Martinez, M., Coutinot, D., Hoelmer, K., & Denis, J. (2006). Suitability of European Diptera

- tachinid parasitoids of *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) and *Eupoecilia ambiguella* (Hübner) (Lepidoptera Tortricidae) for introduction against grape berry moth, *Paralobesia viteana* (Clemens) (Lep. *Redia*, 89, 87–97.
- Mason, P., De Clercq, P., Heimpel, G., & Kenis, M. (2008). Attributes of Biological Control Agents Against Arthropods: What Are We Looking For? En P. Maso, D. R. Gillespie, & C. Vincent (Eds.), *Proceedings of III International Symposium on Biological Control of Arthropods* (pp. 385–392). USDA Forest Service.
- Mayhew, P. J., & Hardy, I. C. W. (1998). Nonsiblicidal behavior and the evolution of clutch size in bethylid wasps. *American Naturalist*, 151(5), 409–424. <https://doi.org/10.1086/286129>
- Men, J., Zhao, B., Cao, D. D., Wang, W. C., & Wei, J. R. (2019). Evaluating host location in three native *Sclerodermus* species and their ability to cause mortality in the wood borer *Aromia bungii* (Coleoptera: Cerambycidae) in laboratory. *Biological Control*, 134(April), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.04.007>
- Mendoza, G. B., Becerra, V. C., Portillo, V. A., Vicchi, F. R., Bergas, V., & Van den Bosch, M. E. (2018). Pérdida de rendimiento por *Lobesia botrana* en un viñedo cv . Tocai Friulano en Mendoza, bajo condiciones predisponentes para podredumbre de los racimos. *X Congreso Argentino de Entomología*.
- Menn, J. J., & Hall, F. R. (1999). *Biopesticides: Use and Delivery* (F. R. Hall & J. J. Menn (eds.)). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-515-8:1>
- Meyhöfer, R., & Casas, J. (1999). Vibratory stimuli in host location by parasitic wasps. *Journal of Insect Physiology*, 45(11), 967–971. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00060-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00060-8)
- Miranda, O., & Novello, R. (2013). Documento de la cadena Uva de Mesa. Informe técnico. En *Programa Nacional Frutales*.
- Mohan, C., & Sathiamma, B. (2007). Potential for lab rearing of *Apanteles taragamae*, the larval endoparasitoid of coconut pest *Opisina arenosella*, on the rice moth *Corcyra cephalonica*. *BioControl*, 52, 747–752.
- Moreau, J., Buffenoir, N., Thiéry, D., & Vogelweith, F. (2019). *Lobesia botrana* as a preferred host of *Campoplex capitator*, the most occurring larval parasitoid in European vineyards. *Entomologia Generalis*, 39(3–4), 307–312. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2019/0809>
- Moreau, J., Villemant, C., Benrey, B., & Thiéry, D. (2010). Species diversity of larval parasitoids of the European grapevine moth (*Lobesia botrana*, Lepidoptera: Tortricidae): The influence of region and cultivar. *Biological Control*, 54(3), 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.05.019>
- Moschos, T. (2005). Yield loss quantification and assessment of economic injury level for the anthophagous generation of the European grapevine moth *Lobesia botrana* Den. et Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae). *International Journal of Pest Management*, 51(2), 81–89. <https://doi.org/10.1080/09670870500107566>
- Moschos, T. (2006). Yield loss quantification and economic injury level estimation for the carpophagous generations of the european grapevine moth *Lobesia botrana* Den. et Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae). *International Journal of Pest Management*, 52(2),

- 141–147. <https://doi.org/10.1080/09670870600639179>
- Murali-Baskaran, R. K., Sharma, K. C., Kaushal, P., Kumar, J., Parthiban, P., Senthil-Nathan, S., & Mankin, R. W. (2018). Role of kairomone in biological control of crop pests-A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 101, 3–15. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.07.004>
- NAPPO. (2016). *Phytosanitary Alert System: APHIS Declares Eradication of European Grapevine Moth (Lobesia botrana) and Eliminates All Quarantine Areas in California*. <https://www.pestalerts.org/es/official-pest-report/aphis-declara-la-erradicaci-n-de-la-palomilla-del-racimo-de-la-vid-lobesia>
- Nicholls, C. I., Altieri, M. A., & Ponti, L. (2008). Enhancing plant diversity for improved insect pest management in Northern California organic vineyards. *Acta Horticulturae*, 785(May), 263–278. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.785.32>
- Nicholls, C. I., Parrella, M., & Altieri, M. A. (2001). The effects of a vegetational corridor on the abundance and dispersal of insect biodiversity within a northern California organic vineyard. *Landscape Ecology*, 16, 133–146. <https://doi.org/10.1023/A>
- Nicholls Estrada, C. I. (2008). Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. En *Ciencia y Tecnología Universidad de Antioquia*. Editorial Universidad de Antioquia.
- Novello, R. (2023). *Estimación de costos de producción de vid para vinificar para el Oasis Este de Mendoza*.
- Noyes, J. S. (2017). *Universal Chalcidoidea Database*. <http://www.nhm.ac.uk/chalcidoids>
- Nuzzaci, G., & Triggiani, O. (1982). Note sulla biocenosi in Puglia della *Lobesia (Polychrosis) botrana* (Schifi.) (Lepidoptera: Tortricidae) infeudata a *Daphne gnidium* L. La. *Entomologica*, 17, 47–52.
- O'Neill, K. M., & Skinner, S. W. (1990). Ovarian egg size and number in relation to female size in five species of parasitoid wasps. *Journal of Zoology*, 220(1), 115–122. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1990.tb04297.x>
- Ottoni, E. B. (2000). EthoLog 2.2: A tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*, 32(3), 446–449. <https://doi.org/10.3758/BF0320814>
- Paull, C., & Austin, A. D. (2006). The hymenopteran parasitoids of light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) (Lepidoptera: Tortricidae) in Australia. *Australian Journal of Entomology*, 45(2), 142–156. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.2006.00524.x>
- Pavan, F., Bigot, G., Cargnus, E., & Zandigiacomo, P. (2014). Influence of the carpophagous generations of the European grapevine moth *Lobesia botrana* on grape bunch rots. *Phytoparasitica*, 42(1), 61–69. <https://doi.org/10.1007/s12600-013-0338-5>
- Pérez-Lachaud, G., Batchelor, T. P., & Hardy, I. C. W. (2004). Wasp eat wasp: Facultative hyperparasitism and intra-guild predation by bethylid wasps. *Biological Control*, 30(2), 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.03.003>
- Pérez Moreno, I., Marco Mancebón, V., Sáenz de Cabezón, F. J., & Marco, V. (2000). Evaluación del parasitismo natural sobre crisálidas hibernantes de polilla del racimo

- (*Lobesia botrana* Den. y Schiff.) en viñedos de La Rioja. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 26(4), 715–722.
- Pertot, I., Caffi, T., Rossi, V., Mugnai, L., Hoffmann, C., Grando, M. S., Gary, C., Lafond, D., Duso, C., Thiery, D., Mazzoni, V., & Anfora, G. (2017). A critical review of plant protection tools for reducing pesticide use on grapevine and new perspectives for the implementation of IPM in viticulture. *Crop Protection*, 97, 70–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.025>
- Pisa, L. W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Downs, C. A., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., McField, M., Morrissey, C. A., Noome, D. A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J. D., Van der Sluijs, J. P., Van Dyck, H., & Wiemers, M. (2015). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut Res*, 22, 68–102.
- Price, P. W., Denno, R. F., Eubanks, M. D., Finke, D. I., & Kaplan, I. (2011). *Insect Ecology: Behavior, Populations and Communities*. Cambridge University Press.
- Roditakis, N. E., & Karandinos, M. G. (2001). Effects of photoperiod and temperature on pupal diapause induction of grape berry moth *Lobesia botrana*. *Physiological Entomology*, 26(4), 329–340. <https://doi.org/10.1046/j.0307-6962.2001.00253.x>
- Roehrich, R., & Boller, E. (1991). Tortricid pests, their biology, natural enemies and control. En L. P. S. van der Geest & H. H. Evenhuis (Eds.), *Tortricids in vineyards* (pp. 507–514). Elsevier Science Publishers.
- Roerich, R. (1978). Recherches sur la nuisibilité de *Eupoecilia ambiguella* Hb. et *Lobesia botrana* Den. et Schiff. *Def- Vég.*, 191, 106–124.
- Romero, J. C., Ellington, J. J., & Richman, D. B. (2001). Pecan nut casebearer *Acrobasis nuxvorella* Neunzing parasites collected in Doña Ana Country, NM, and El Paso, TX. *Southwest. Entomol.*, 26, 269–270.
- Rubink, W. L., & Evans, H. E. (1979). Notes on the nesting behavior of the bethylid wasp, *Epyris erigoni* Kieffer, in southern Texas. *Psyche*, 86, 313–320.
- Rusch, A., Delbac, L., Muneret, L., & Thiéry, D. (2015). Organic farming and host density affect parasitism rates of tortricid moths in vineyards. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 214, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.08.019>
- Salgado, J. E. (2021). *Uso de Campoplex capitator (Aubert) (Hymenoptera: ichneumonidae) como alternativa sostenible para el control biológico de Lobesia botrana, en áreas urbanas de Chillán URBANAS DE CHILLAN*. Universidad Católica del Maule.
- Sammaritano, J. A., Deymié, M., Herrera, M., Vazquez, F., Cuthbertson, A. G. S., López-Lastra, C., & Lechner, B. (2018). The entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* for the European grapevine moth, *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) and its effect to the phytopathogenic fungus, *Botrytis cinerea*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(83), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0086-4>
- Sánchez-Bayo, F., & Wyckhuys, K. A. G. (2019). Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation*, 232(September 2018), 8–27. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>

- Saour, G. (2014). Sterile insect technique and F1 sterility in the European grapevine moth, *Lobesia botrana*. *Journal of Insect Science*, 14(8), 1–10.
<https://doi.org/10.1673/031.014.08>
- Sarandón, S. J., Flores, C. C., Abbona, E. A., Dubrovsky Berensztein, N., Blandi, M. L., Bonicatto, M. M., Cerdá, E., Fernández, V., Gargoloff, N. A., Iermanó, M. J., Marasas, M. E., Mónaco, C. I., Paleologos, M. F., Sánchez Vallduví, G. E., & Stupino, S. A. (2014). *Agroecología: bases teóricas para el diseño y manejo de Agroecosistemas sustentables* (S. J. Sarandon & C. C. Flores (eds.)). Editorial Universidad Nacional de La Plata.
- Sarandón, S. J., Zuluaga, M. S., Cieza, R., Gómez, C., Janjetic, L., & Negrete, E. (2006). Evaluación de la sustentabilidad de sistemas agrícolas de fincas en Misiones, Argentina, mediante el uso de indicadores. *Revista Agroecología*, 1, 19–28.
- Scaramozzino, P. L., Di Giovanni, F., Loni, A., Ricciardi, R., & Lucchi, A. (2018). Updated list of the insect parasitoids (Insecta, Hymenoptera) associated with *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller, 1775) (Lepidoptera, Tortricidae) in Italy. 2. Hymenoptera, Ichneumonidae, Anomaloniinae and Campopleginae. *ZooKeys*, 2018(772), 47–95.
<https://doi.org/10.3897/zookeys.772.25288>
- Scaramozzino, P. L., Loni, A., & Lucchi, A. (2017). A review of insect parasitoids associated with *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller, 1775) in Italy. 1. Diptera Tachinidae and Hymenoptera Braconidae (Lepidoptera, Tortricidae). *ZooKeys*, 2017(647), 67–100. <https://doi.org/10.3897/zookeys.647.11098>
- Segura, D. F., Nussenbaum, A. L., Viscarret, M. M., Devescovi, F., Bachmann, G. E., Corley, J. C., Ovruski, S. M., & Cladera, J. L. (2016). Innate host habitat preference in the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata*: Functional significance and modifications through learning. *PLoS ONE*, 11(3), 1–18.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152222>
- Segura, D. F., Viscarret, M. M., Carabajal Paladino, L. Z., Ovruski, S. M., & Cladera, J. L. (2007). Role of visual information and learning in habitat selection by a generalist parasitoid foraging for concealed hosts. *Animal Behaviour*, 74(1), 131–142.
<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2006.12.005>
- SENASA. (2012). *Res. 302/2012*.
http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/normativas/archivos/anexo_res-302-2012.pdf
- SENASA. (2018). *La Técnica de Confusión Sexual muestra buenos resultados en el control de Lobesia botrana*. <http://www.senasa.gob.ar/print/14119>
- SENASA. (2023). *LOBESIA BOTRANA*. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. [http://www.senasa.gob.ar/cadena-vegetal/frutales/produccion-primaria/programas-fitosanitarios/lobesia-botrana#:~:text=Se trata de una plaga,como olivo%2C arándano y ciruela.](http://www.senasa.gob.ar/cadena-vegetal/frutales/produccion-primaria/programas-fitosanitarios/lobesia-botrana#:~:text=Se%20trata%20de%20una%20plaga,como%20olivo%20ar%C3%A1ndano%20y%20ciruela.)
- SENASA (2010). *Res.122/2010*. <https://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-122-2010-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>.
- Sharley, D. J., Hoffmann, A. A., & Thomson, L. J. (2008). The effects of soil tillage on beneficial invertebrates within the vineyard. *Agric For Entomol*, 10, 233–243.
<https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2008.00376.x>

- Shephard, G. S. (2008). Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 25(2), 146–151. <https://doi.org/10.1080/02652030701567442>
- Shoeb, M. A., Abul Fadl, H. A., & El-Heneidy, A. H. (2005). Biological aspects of the ectolarval parasitoid species, *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera : Bethyridae) on different insect host under laboratory conditions. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 15(1), 5–9.
- Smith, G. S., Allison, J. C. S., & Pammenter, N. W. (1994). Bio-assay study of response by a parasitoid to frass and feeding substrates of its host, the stalk borer *Eldana saccharina*. *Annals of Applied Biology*, 125(3), 439–446. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1994.tb04981.x>
- Smith, J. M., Conlong, D. E., Byrne, M., & Frerot, B. (2006). Response of *Goniozus indicus* (Hymenoptera : Bethyridae) to sugarcane and *Cyperus papyrus* volatiles. *Proc S Afr Sug Technol Ass*, 80, 250–255.
- Sreenivas, A. G., & Hardy, I. C. W. (2016). Mutual interference reduces offspring production in a brood-guarding bethylid wasp. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 159(2), 260–269. <https://doi.org/10.1111/eea.12412>
- Steidle, J. L. M., & Van Loon, J. J. A. (2003). Dietary specialization and infochemical use in carnivorous arthropods: Testing a concept. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 108(3), 133–148. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2003.00080.x>
- Strafile, D., & Becerra, V. (2001). Sanidad del viñedo Argentino. *Idia XXI*, 1, 53–56. <http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/fruta/pdf/sanidad.pdf>
- Taret, G. A. A., Azin, G., & Vanin, M. (2020). Area-Wide Management of *Lobesia botrana* in Mendoza, Argentina. En J. Hendrichs, R. Pereira, & M. J. B. Vreysen (Eds.), *Area-wide Integrated Pest Management: Development and Field Application* (pp. 597–614). CAB International 2020.
- Telenga, N. A. (1934). Parasiten und ihre Bedeutung in der Dynamik des Traubenwicklers (*Polychrosis botrana* Schiff.). *Journal of Pest Science*, 10(9), 101–106.
- Thiéry, D., Delbac, L., Villemant, C., & Moreau, J. (2011). Control of grape berry moth larvae using parasitoids : should it be developed ? *Integrated protection and production in viticulture IOBC/wrps Bulletin*, 67(June), 189–196. <https://doi.org/10.13140/2.1.3313.7442>
- Thiéry, D., Louâpre, P., Muneret, L., Rusch, A., Sentenac, G., Vogelweith, F., Iltis, C., & Moreau, J. (2018). Biological protection against grape berry moths. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(2). <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0493-7>
- Thiéry, D., & Xuereb, A. (2003). Relative abundance of several larval parasitoids of *Lobesia botrana* on different varieties of grapes. *IOBC/WPRS Bulletin*, 26(8), 145–150.
- Thomson, L. J., & Hoffmann, A. A. (2007). Effects of ground cover (straw and compost) on the abundance of natural enemies and soil macro invertebrates in vineyards. *Agricultural and Forest Entomology*, 9(3), 173–179. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2007.00322.x>

- Tomasoni, M. (2013). *No hay fumigación controlable: generación de derivas de plaguicidas*.
- Torres-Vila, L. M. (2001). Un aniversario aciago: dos siglos de historia como plaga de la polilla del racimo de la vid, *Lobesia botrana* Den. y Schiff. *Divulgación. Sociedad Española de Entomología Aplicada*.
<http://www.seea.es/conlupa/lbotrana/lbotrana.htm>
- Torres-Vila, L. M., Stockel, J., Lecharpentier, P., & Rodríguez-Molina, M. C. (1997). Artificial selection in pheromone permeated air increases mating ability of the European grape vine moth *Lobesia botrana* (Lep., Tortricidae). *Journal of Applied Entomology*, 121(4), 189–194. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1997.tb01392.x>
- Touzeau, J. (1981). Modélisation de l'évolution de l'Eudemis de la vignepour la région Midi-Pyrénées. *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura*, 16, 26–28.
- Van Driesche, R. G., Hoddle, M., & Center, T. (2008). Control of Pests and Weeds By Natural Enemies: An Introduction to biological control. En *Florida Entomologist*.
<https://doi.org/10.1653/024.092.0237>
- Van Driesche, R. G., Hoddle, M. S., & Center, T. D. (2007). Capítulo 20: Evaluación de los enemigos naturales sobre las plagas. En R. G. Van Driesche, M. S. Hoddle, & T. D. Center (Eds.), *Control de plagas y malezas por enemigos naturales* (p. 751). The Forest Health Technology Enterprise Team (FHTET).
- Van Driesche, R. G., & Murray, T. J. (2004). Overview of testing schemes and designs used to estimate host ranges. *Assessing host ranges for parasitoids and predators used for classical biological control: a guide to best practice*, 68–89.
- van Lenteren, J. C. (2012). The state of commercial augmentative biological control: Plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl*, 57(1), 1–20.
<https://doi.org/10.1007/s10526-011-9395-1>
- van Lenteren, J. C. (2020). Will the 'Nagoya Protocol on Access and Benefit Sharing' put an end to biological control? En M. J. B. Hendrichs, J., Pereira, R. and Vreysen (Ed.), *Area-wide Integrated Pest Management: Development and Field Application*. (pp. 655–667). FAO/IAEA.
- van Lenteren, J. C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W. J., & Urbaneja, A. (2018). Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl*, 63(1), 39–59. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>
- van Lenteren, J. C., Bueno, V. H. P., Luna, M. G., & Colmenarez, Y. C. (2020). *Biological control in Latin America and the Caribbean: Its rich history and bright future* (J. C. van Lenteren, V. H. P. Bueno, M. G. Luna, & Y. C. Colmenarez (eds.)). CABI International. <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>
- Vander Meer, R. K., Alvarez, F., & Lofgren, C. S. (1988). Isolation of the trail recruitment pheromone of *Solenopsis invicta*. *Journal of Chemical Ecology*, 14(3), 825–838.
<https://doi.org/10.1007/BF01018776>
- Vargas-Rojas, J. M., & Terayama, M. (2006). Familia Bethyridae. En F. Fernández & M. J. Sharkey (Eds.), *Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical* (pp. 427–442). Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia.
- Venkatesan, T., Jalali, S. K., Murthy, K. S., Rabindra, R. J., Rao, N. S., & Bhaskaran, T. V.

- (2006). Field evaluation of different doses of *Goniozus nephantidis* (Muesebeck) for the suppression of *Opisina arenosella* Walker on coconut. *International Journal of Coconut R & D*, 22(Special Issue).
- Vicente-Díez, I., Blanco-Pérez, R., Chelkha, M., Puelles, M., Pou, A., & Campos-Herrera, R. (2021). Exploring the use of entomopathogenic nematodes and the natural products derived from their symbiotic bacteria to control the grapevine moth, *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Insects*, 12(1033). <https://doi.org/10.3390/insects12111033>
- Vinson, S. B. (1976). Host Selection by Insect Parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 21(1), 109–133. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.21.010176.000545>
- Waage, J. K., & Ng, M. S. (1984). The reproductive strategy of a parasitic wasp : I . Optimal progeny and sex allocation in *Trichogramma evanescens*. *Journal of Animal Ecology*, 53(2), 401–415.
- Wagner, D. L. (2020). Insect declines in the anthropocene. *Annual Review of Entomology*, 65, 457–480. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025151>
- Wajnberg, E., & Colazza, S. (2013). Chemical ecology of insect parasitoids. En *Wiley-Blackwell*. <https://doi.org/10.5860/choice.51-2668>
- Wang, X., Tomajan, S. M., & Daane, K. M. (2014). Brood Guarding by an Adult Parasitoid Reduces Cannibalism of Parasitoid-Attacked Conspecifics by a Caterpillar Host. *Journal of Insect Behavior*, 27(6), 826–837. <https://doi.org/10.1007/s10905-014-9474-0>
- Wang, X., Wang, X. Y., Kenis, M., Cao, L. M., Duan, J. J., Gould, J. R., & Hoelmer, K. A. (2021). Exploring the potential for novel associations of generalist parasitoids for biological control of invasive woodboring beetles. *BioControl*, 66(1), 97–112. <https://doi.org/10.1007/s10526-020-10039-6>
- Wen, B., & Brower, J. H. (1994). Suppression of maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), populations in drums of corn by single and multiple releases of the parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Kansas Entomol. Soc.*, 67(4), 331–339.
- Whitfield, J. B. (1998). Phylogeny and Evolution of Host-Parasitoid Interactions in Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 43(1), 129–151. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.129>
- Wood, T. J., & Goulson, D. (2017). The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*, 24(21), 17285–17325.
- Zaviezo, T., Romero, A., Castro, D., & Wagner, A. (2007). Primer registro de *Goniozus legneri* (Hymenoptera: Bethyridae) para Chile. *Ciencia e investigación agraria*, 34(1), 57–61. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202007000100007>